



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

Total Phosphate Detection Kit

产品编号	产品名称	包装
S0195S	Total Phosphate Detection Kit	500次
S0195M	Total Phosphate Detection Kit	2500次

产品简介:

- 碧云天研发生产的Total Phosphate Detection Kit (总磷酸盐检测试剂盒), 也称总磷检测试剂盒(Total Phosphate Assay Kit), 是一种通过吸光度法快速、便捷、高灵敏地测定溶液样品中总磷酸盐含量的试剂盒。本试剂盒不仅可以检测无机磷酸盐, 例如磷酸氢二钠、磷酸二氢钾等, 也可以检测例如AMP、ADP和ATP等有机分子中含有的磷酸。本试剂盒在检测细胞培养上清液、血清、血浆、细胞及组织裂解液等生物样品中游离的有机磷与无机磷总量方面有广泛应用。
- 本产品主要用于样品中有机磷与无机磷的总磷含量的检测; 对于样品中游离无机磷的检测, 推荐使用碧云天生产的Malachite Green Phosphate Detection Kit (S0196)。
- 磷主要以无机磷与有机磷两种形式存在, 可参与生物体内多种代谢过程, 其含量是重要的生化指标。本试剂盒总磷含量检测的主要原理是先将样品中的无机磷酸盐(Inorganic phosphate)与有机磷酸盐(Organic phosphate)在强酸、氧化剂及高温的作用下转化为游离的无机正磷酸盐(Orthophosphate), 随后孔雀绿(Malachite green)、钼酸盐(Molybdate)和游离的无机正磷酸盐(Orthophosphate)形成绿色磷钼酸复合物(Molybdophosphoric acid complex), 而这种绿色磷钼酸复合物在620-640nm处的吸光度与溶液中游离的无机正磷酸盐浓度成正比例线性关系, 据此可实现溶液样品中总磷含量的高效、精确检测[1]。
- 碧云天生产的Total Phosphate Detection Kit (S0195)检测样品总磷含量的工作流程和原理请参考图1。

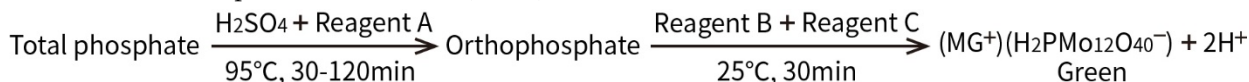


图1. 碧云天生产的Total Phosphate Detection Kit (S0195)检测样品总磷含量的工作流程和原理图。

- 本试剂盒可以用于96孔板、384孔板或比色皿中进行样品总磷含量的分析测定。
- 本试剂盒操作简单、检测速度快, 仅需约60分钟即可完成总磷含量的测定。
- 本试剂盒检测灵敏度高、线性范围广, 在0.1-10nmol范围内均有良好的检测灵敏度和线性关系。磷标准品在0-10nmol和0-2nmol范围内的检测结果请参考图2。

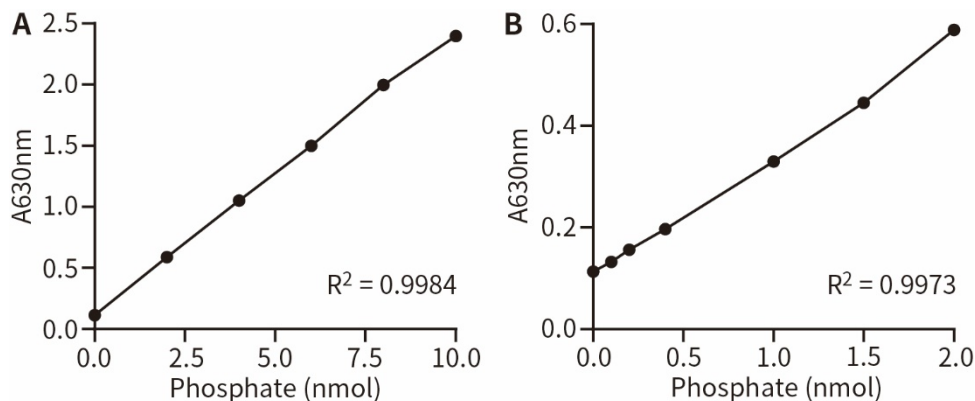


图2. 碧云天生产的Total Phosphate Detection Kit (S0195)的标准曲线效果图。将磷酸盐标准品按照说明书中的描述分别稀释后, 加入显色剂混匀, 室温反应30分钟。在630nm处测定吸光度并最终绘制成标准曲线。图A为在0-10nmol范围内的标准曲线; 图B为0-2nmol范围内的标准曲线。实际结果因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒使用96孔板进行检测时, 小包装足够进行500次检测, 中包装足够进行2500次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0195S-1	Reagent A	20ml
S0195S-2	Reagent B	24ml
S0195S-3	Reagent C	12ml

S0195S-4	5mM Phosphate Standard	0.4ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0195M-1	Reagent A	100ml
S0195M-2	Reagent B	120ml
S0195M-3	Reagent C	60ml
S0195M-4	5mM Phosphate Standard	2ml
—	说明书	1份

保存条件：

4℃保存，一年有效；Reagent B须避光保存。

注意事项：

- 须自备浓硫酸。浓硫酸有强腐蚀性，务必按照浓硫酸的相关操作规范，做好防护。
- 试剂在使用前必须回复至室温。
- 显色试剂须现配现用，配制后可以在4℃保存一天。
- 本试剂盒如果误置于-20℃保存等原因导致结冻，Reagent C须在95℃加热至完全溶解并混匀后使用，其余两种试剂常规解冻并混匀后即可使用。
- 本实验测定波长在620-660nm之间，630nm为最佳。如果没有酶标仪，也可使用分光光度计进行测定。在这种情况下，需按比例调整试剂、样本、标准品的体积，使最终待测体积符合比色皿的最小检测体积。
- 本试剂盒检测时涉及氧化还原反应，因此外源氧化剂或还原剂会干扰测定的灵敏度和准确性。如果样品中含有还原剂例如DTT、巯基乙醇等，并且无法避免这些还原剂时，则应尽量控制还原剂的总浓度低于待测样品中的巯基浓度；常用的Triton X-100、Tween-20等去垢剂都含有较高水平的过氧化物，如果必须使用去垢剂，推荐使用纯度较高并注明含较低过氧化物的去垢剂。
- 本试剂盒使用说明所述加样体积以96孔板为例，如果选择比色皿或384孔板，应按比例调整体积。
- 实验室清洁剂含有高浓度的磷酸盐，需确保实验器皿彻底清洗，防止磷酸盐污染。本试剂盒的所有实验操作均须在无磷酸盐污染的条件下进行，可用全新或一次性的实验器皿进行总磷含量检测，推荐使用碧云天BeyoGold™系列无菌吸头，锥形离心管，1.5ml离心管或PCR管等实验耗材进行体外溶液样品总磷含量的检测。
- 为获得更好的检测效果，推荐对于所有的标准品和待测样品设置平行孔或三复孔。
- 如果检测出来的吸光度偏低，可能是样品中总磷含量较低，需考虑加大样品用量、降低样品的稀释比例或对制备的样品进行浓缩以加大样品用量。
- Reagent A具有强氧化性和器官毒性，操作时请特别小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内，同时必须采取一切防范措施避免与可燃物混合。
- Reagent B呈强酸性，具有一定的腐蚀性，操作时请小心，并确保有效防护以避免直接接触人体，并须注意避免腐蚀其它物品。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

以下所有实验操作均以使用96孔板进行吸光度测定为例；如使用比色皿、384孔板或其他方式进行吸光度的检测，请根据每样所需最小检测体积等比例调整样品及试剂的加入量。

1. 标准品溶液的配制。

标准曲线所采用的磷浓度可以为0、1、2.5、5、10、20、30、40、50μM等。稀释方法如下：取10μl本试剂盒提供的5mM Phosphate Standard，加入990μl不含磷酸盐的超纯水，充分混匀，即为1ml 50μM磷酸盐标准品工作液。配制好的50μM的磷酸盐标准品工作液可参考下表用不含磷酸盐的超纯水逐步稀释为0、1、2.5、5、10、20、30、40、50μM等一系列浓度梯度的磷酸盐标准品溶液。

No.	50μM Phosphate (μl)	H ₂ O (μl)	Phosphate (μM)	Phosphate (nmol/200μl)
1	0	200	0	0
2	4	196	1	0.2
3	10	190	2.5	0.5
4	20	180	5	1
5	40	160	10	2
6	80	120	20	4
7	120	80	30	6
8	160	40	40	8
9	200	0	50	10

注1：标准品的每一步稀释均应充分混合均匀。

注2：稀释后的磷酸盐标准品可在4℃稳定保存至少一天；保存时间过长，可能会干扰标准曲线的绘制，推荐即配即用。

注3：请务必使用不含磷酸盐的超纯水进行标准品溶液的逐步稀释和配制，以免造成外源磷酸盐的污染，干扰检测结果，推荐使用碧云天生产的BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)进行磷标准品的配制和稀释工作。

注4：所有实验器皿必须是无磷酸盐污染的。

注5：若使用自行准备的试剂稀释标准品，需确保该试剂没有磷酸盐污染。

2. 样品预处理。

- a. 取200μl待测样品，分别加入10μl浓硫酸(自备试剂)、40μl Reagent A，吹打混合均匀。
- 注1：上述加样体积是以使用96孔板进行吸光度测定为例；若使用比色皿、384孔板或其他方式进行吸光度的检测，请根据每孔所需最小检测体积等比例调整样品及Reagent A的使用量。
- 注2：若样品体积不足，可使用不含磷酸盐的超纯水对样品进行稀释处理，推荐使用碧云天生产的BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。
- 注3：浓硫酸为自备试剂，建议在样品总磷含量检测前准备完成。
- 注4：同时进行多样品预处理时，可用多孔板混匀设备、涡旋振荡等方式充分混匀。
- 注5：若待测样品本底无颜色，待测样品空白对照管建议以等体积溶剂(或不含磷酸盐的超纯水)代替，其余操作同待测样品管。
- 注6：如果检测培养液、血清、血浆等本底带颜色的样品的总磷含量时，待测样品空白对照管建议以等体积阴性对照组样品代替，其余操作同待测样品管。
- 注7：建议使用处理后的全血样品进行总磷含量的检测，例如：全血经抗凝处理，高速离心后获得的血浆样品；或全血经凝血处理，获得的血清样品。
- b. PCR仪或带有压盖的金属浴95℃孵育30分钟，以使样品中的无机磷及有机磷充分转化成正磷酸盐。
- 注1：由于涉及浓硫酸并且处理温度较高，强烈推荐使用PCR仪或有压盖的金属浴进行加热，以大幅降低出现盖子弹开而导致液体飞溅的风险。
- 注2：请务必保持95℃高温处理，温度偏低会影响样品中磷消解转化成正磷酸盐的效率。
- 注3：也可适当延长95℃孵育处理时间，以将样品中的有机磷和无机磷充分转化为无机正磷酸盐。对于大多数生物样品中的有机磷，95℃孵育处理120分钟已可达到充分转化为无机正磷酸盐的目的，进一步延长孵育时间并不会改变测定结果。

3. 显色剂的配制。

根据样本的数量，计算需要配制显色剂的体积。Reagent B和Reagent C的使用比例为2:1。例如，20ml Reagent B和10ml Reagent C混合即可获得30ml显色剂。该显色剂在4℃避光保存，可稳定一天。

注1：在进行样品总磷含量检测时，是按照样品体积与显色剂体积20:7的比例进行加入的。

注2：显色剂须现配现用，配制后可在4℃稳定保存一天，推荐根据待测样品数量及吸光度的检测方式计算所需显色剂的总量，按需配制。

4. 总磷含量测定。

- a. 取预处理后的样品、一系列浓度梯度的磷标准品和空白对照管各200μl，加入70μl显色剂，混合均匀。
- 注1：上述加样体积是以使用96孔板进行吸光度测定为例；若使用比色皿、384孔板或其他方式进行吸光度的检测，请根据每孔所需最小检测体积等比例调整加入量。
- 注2：同时进行多样品总磷含量测定时，可用多孔板混匀设备、涡旋振荡等方式充分混匀。
- b. 室温孵育30分钟进行显色反应。
- c. 以不含磷酸盐的超纯水为参照，测定各样品在OD630nm处的吸光度。
- d. 建立标准曲线： $Y=bX+a$ ，其中Y为630nm处吸光度值，X为磷浓度，b为标准曲线斜率，a为Y轴截距。使用本产品进行检测及标准曲线的绘制效果请参考图2。
- 注：总磷标准曲线在0.1-10nmol (即0.5-50μM)范围内呈良好的检测灵敏度和线性关系。若待测样品总磷含量较高，需进行适当的稀释，以免超过总磷标准曲线的线性范围；若待测样品总磷含量较低，可考虑对样品进行浓缩，适当提高样品的总磷含量。
- e. 计算样品总磷含量：根据标准曲线及待测样品的稀释倍数计算出样品的总磷含量。

常见问题：

1. 如何降低实验中过高的背景？

本试剂盒是高灵敏的磷酸盐检测方法。任何外源性的游离磷酸盐都会干扰检测，所以必须确保标准品稀释液和实验室容器中不含游离磷酸盐。在实验前，所有使用的实验容器均要用蒸馏水或去离子水充分地清洗。

2. 如何去除水溶液中的沉淀？

- a. 二价阳离子(钙、镁、铜和锌)形成的磷酸盐具有低水溶性。为避免沉淀，磷酸盐标准品应使用双蒸水或不含钙、镁、铜和锌等会和磷酸根产生沉淀的阳离子的缓冲液进行稀释。
- b. 样本中磷酸盐浓度过高，也会形成沉淀，建议对样本进行适当稀释后再进行磷酸盐检测。

参考文献：

1. Attin T, Becker K, Hannig C, Buchalla W and Wiegand A. Clin Oral Investig. 2005. 9(3):203-7.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
S0192	Phosphate Sensor Assay Kit (磷酸根荧光检测试剂盒)	200次/1000次

S0195	Total Phosphate Detection Kit	500次/2500次
S0196	Malachite Green Phosphate Detection Kit	500次/2500次
FPT011	96孔板(平底, 带盖)	100个/箱
ST876	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml/500ml

Version 2025.05.06