

核酸检测试剂盒(定磷比色法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

核酸(nucleic acid)是由许多核苷酸聚合成的生物大分子化合物，是生命的基本物质之一，广泛存在于所有动植物细胞、微生物体内，根据化学组成不同，核酸可分为脱氧核糖核酸(简称 DNA)和核糖核酸(简称 RNA)，核酸分子中含有一定比例的磷，DNA 中磷含量为 9.2%，RNA 中磷含量为 9.0%

核酸检测试剂盒(定磷比色法)检测原理是在强酸条件下，核酸分子中的有机磷转化为无机磷，后者与钼酸铵形成黄色的磷钼酸铵，随后还原剂把高价钼离子还原成低价钼离子，进而形成蓝色的钼蓝，在一定浓度范围蓝色深浅与磷含量成正比，通过分光光度计在 660nm 处检测吸光度，通过检查标准曲线，获得磷含量，如果待测样品中有无机磷，应予以扣除，否则结果偏高。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

名称	规格	保存条件	
核酸检测试剂盒(定磷比色法)	50T	4℃	
试剂(A):磷标准(1mg/ml)	1ml	4℃	
试剂(B):玻璃珠	50 粒	RT 避光	
试剂(C):H ₂ O ₂	2×1ml	RT	
D1: 定磷试剂 A	100ml	4℃	
试剂(D):定磷试剂	D1: 定磷试剂 A	50ml	RT
	D2: 定磷试剂 B	20ml	RT
	D3: 定磷试剂 C	20ml	4℃避光
临用前，按 D1: D2: D3=3: 1: 1 混合，配制定磷试剂，即配即用。			
使用说明书	1 份		
有效期	6 个月		

自备材料：

- 1、蒸馏水、浓硫酸
- 2、离心管或试管

- 3、容量瓶
- 4、凯氏烧瓶
- 5、水浴锅
- 6、比色杯、分光光度计

操作步骤(仅供参考):

1、稀释标准品：取适量的磷标准(1mg/ml)，按磷标准(1mg/ml)：蒸馏水=1：49 的比例稀释标准品至 20 μg/ml。取干净离心管或试管，按下表进行标准品浓度的依次稀释，获得不同浓度的多个磷标准。

	0	1	2	3	4	5	6	7	8
磷标准(20 μg/ml)/ml	0	0.025	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35
蒸馏水/ml	1.5	1.475	1.45	1.4	1.35	1.3	1.25	1.2	1.15
磷含量/ μg	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7

2、制备待测样液：取样品(如核酸粗提物)0.05g，加入少量蒸馏水溶解（如果难以溶解，可滴加样品处理液至溶液 pH=7.0），准确定容至 25ml(此溶液样品含量 2mg/ml)，即为待测样液。

3、制备总磷测定液：取上述待测样液(2mg/ml)1ml，置于 50ml 凯氏烧瓶，加入 1ml 浓硫酸和 1 粒玻璃珠，凯氏烧瓶内插入一个小漏斗，放在通风橱内加热至溶液呈黄色时取出，稍冷却后加入 2~3 滴 H₂O₂，继续消化至透明，表示消化完成，冷却，转移消化液至 100ml 容量瓶中，用少量蒸馏水洗涤凯氏烧瓶 2 次，洗涤液一并倒入容量瓶，加蒸馏水定容至 100ml，混匀后待用，即为总磷测定液。

4、无机磷测定液(选做)：取上述待测样液(2mg/ml)1ml，置于 100ml 容量瓶中，加蒸馏水定容至 100ml，混匀后待用，即为无机磷测定液。

5、磷加样：按下表进行操作，依次加入下列溶液，如果样品中有无机磷，应同时检测无机磷，并将无机磷扣除。

加入物(ml)	标准管	无机磷测定管(选做)	总磷测定管
系列浓度磷标准(0~8 号)	1.5	—	—
无机磷测定液	—	1.5	—
总磷测定液	—	—	1.5
定磷试剂	1.5	1.5	1.5

6、磷测定：45℃ 孵育 10min，冷却后以分光光度计测定 660nm 处标准管、无机磷测定管、总磷测定管的吸光度(分别记为 A 标准、A 无机磷、A 总磷)。

计算：以磷含量(μg)(0~8 号)为横坐标，吸光度为纵坐标作图，得标准曲线。以 A 有机磷=A

总磷—A 无机磷之差值，在标准曲线查的有机磷的质量(μg)，再根据测定时取样 ml 数，求得有机磷的质量浓度(μg/ml)。按下列公式计算样品中核酸的质量分数：

$$\text{核酸质量分数(\%)} = CV \times 11/m \times 100\%$$

式中：C=有机磷的质量浓度(μg/ml)

V=样品的总体积(ml)

11=1 μg 磷相当于 11 μg 核酸

m=样品质量(μg)

注意事项：

- 1、待测样品如不能及时测定，应置于 2~8℃ 保存，3 天内稳定。
- 2、如果样品浓度过高，应用蒸馏水稀释后重测，结果乘以稀释倍数。
- 3、消化时间应视样品不同而不同，如果是 RNA 样品，一般在 800W 电炉上消化 45min。