

ATP含量检测试剂盒 高效液相色谱法

产品货号: BA1539

产品规格: 50管/48样

产品简介:

三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 被认为是一种在所有生物体生存和繁殖的细胞合成中必不可少的普遍能量来源。ATP可通过多种细胞途径产生。最典型的如在线粒体中通过氧化磷酸化由三磷酸腺苷合酶合成, 或者在植物的叶绿体中通过光合作用合成。ATP合成的主要能源为葡萄糖和脂肪酸。

ATP在254nm下有吸收峰, 可以利用高效液相色谱法测定其含量。

试验中所需的仪器和试剂:

高效液相色谱仪 (C18柱 (4.6×250mm), 紫外检测器 (VWD))、台式离心机、可调式移液枪、研钵/匀浆器、棕色EP管、针头式过滤器 (50个, 水系, 0.45 μ m), 注射器, 抽滤器, 滤膜 (有机系、水系), 棕色进样瓶 (50个, 2mL)、乙腈 (色谱纯, 500mL)、超纯水。

产品内容:

提取液一: 液体80mL ×1瓶, 4°C保存。

提取液二: 液体40mL ×1瓶, 4°C保存。

试剂一: 液体15mL ×1瓶, 4°C保存。临用前取3.5mL试剂一加入到1000mL超纯水中, 用试剂二调节其pH= 6.15, 形成流动相B, 密封。

试剂二: 液体5mL ×1瓶, 4°C保存。

标准品: 粉剂×1支, -20°C避光保存。临用前加入1.65mL蒸馏水配制成1 μ mol/mL ATP-Na₂标准溶液, -20°C冻存。为了保证ATP的完整性, 请避免反复冻融。

实验前准备工作:

1. 将500mL色谱纯乙腈 (流动相A) 和1000mL 配置好的流动相B用滤膜抽滤, 除去溶剂中杂质, 以防堵塞色谱柱。(乙腈采用0.45 μ m有机系滤膜抽滤, 配置好的流动相B采用0.22 μ m水系滤膜抽滤)。
2. 将配制好的流动相A、B超声30min, 除去溶剂中的气体, 防止阻塞色谱柱, 影响实验结果。
3. 标准品的配制: 将1 μ mol/mL的ATP-Na₂标准溶液采用倍比稀释的方法分别用蒸馏水稀释成0.5 μ mol/mL、0.1 μ mol/mL、0.05 μ mol/mL、0.01 μ mol/mL、0.005 μ mol/mL的ATP标准品溶液。(配制的标准品浓度仅供参考, 可根据实际样品浓度进行调整)。采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内待测 (测试前请提前放置常温状态, 以免对保留时间造成影响)。

操作步骤:

一、ATP 的提取:

1. 组织样本: 按照组织质量 (g): 提取液一体积 (mL) 1:5~10 的比例 (建议称取 0.3g 组织样本, 加入 1.5mL 提取液一) 加入提取液一, 冰浴匀浆, 然后冰浴浸提 40min。4°C条件下 10000rpm 离心 10min, 取上清液 750 μ L, 加入 750 μ L 的提取液二, 充分震荡 (5min) 混匀后, 再次在 4°C条件下 10000rpm 离心 10min, 取上清液, 采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内置常温待测(2h 之内)。
2. 细胞样本: 按照 1000 万 (个): 提取液一体积 (mL) 1000~500:1 的比例 (建议取 1000 万细胞样本, 加入 1mL 提取液一) 加入提取液一, 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300W, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 于 4°C, 10000rpm 离心 10min, 取 0.75mL 上清液, 再加入 0.75mL 提取液二, 充分震荡 (5min) 混匀后, 再次在 4°C条件下 10000rpm 离心 10min。取上清液, 采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内置常温待测(2h 之内),
3. 血清: 建议取 0.4mL 血清样本, 加入 0.6mL 提取液一, 冰浴浸提 40min。4°C条件下 10000rpm 离心 10min, 取上清液 0.75mL, 加入 0.75mL 的提取液二, 充分震荡 (5min) 混匀后, 再次在 4°C条件下 10000rpm 离心



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

10min, 取上清液, 采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内置常温待测(2 h 之内)。

二、测定步骤:

1. 开启电脑、打开液相色谱仪各模块开关按钮, 安装上色谱柱, 打开软件, 在方法组中设置进样量为 10 μ L, 柱温: 27 $^{\circ}$ C, 流速为 0.8mL/min, 波长为 254nm, 洗脱程序如下表, 走样时间 70min, 设置完毕保存方法组。
2. 流动相清洗柱子, 采用乙腈: 流动相 B (pH = 6.15) = 2 : 98 比例的流动相平衡柱子, 待基线稳定后开始进样。
3. 检测准备好的标准品溶液, 进样量为 10 μ L, 在 10min 内可分离 ATP, ATP 的保留时间为 7.8min 左右 (体系、柱子、流动相 pH 等不同, 保留时间有差异, 仅作为参考)。
4. 检测准备好的样品溶液, 进样量为 10 μ L, 在相应的保留时间处检测 ATP 的峰面积。

| 时间 (min) | 流动相 | |
|----------|------|------|
| | 溶剂 A | 溶剂 B |
| 0 | 2% | 98% |
| 10 | 2% | 98% |
| 15 | 70% | 30% |
| 50 | 70% | 30% |
| 55 | 2% | 98% |
| 70 | 2% | 98% |

三、ATP 含量计算

1. 标准曲线的建立

以标准品浓度 (μ mol/mL) 为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制 ATP 的标准曲线, 将样品的峰面积代入标准曲线, 计算样本中 ATP 的浓度 x (μ mol/mL)。

2. ATP 含量的计算:

(1) 按样本质量计算:

$$\text{ATP 的含量 } (\mu\text{mol/g}) = 2x \times V_{\text{提取}} \div W = 3x \div W$$

$$\text{ATP 的含量 } (\mu\text{g/g}) = 2x \times V_{\text{提取}} \times 507.18 \div W = 1521.54x \div W$$

V 提取: 加入提取液一的体积, 1.5mL; W: 样本质量, g; $M_{\text{ATP}}=507.18$; 2: 样本稀释倍数。

(2) 按样本体积计算:

$$\text{ATP 的含量 } (\mu\text{mol/mL}) = 2x \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{样}} = 5x$$

$$\text{ATP 的含量 } (\mu\text{g/mL}) = 2x \times V_{\text{提取}} \times 507.18 \div V_{\text{样}} = 2535.9x$$

V 提取: 加入提取液一后的总体积, 1mL; V 样: 提取液一中加入样本体积, 0.4mL; $M_{\text{ATP}}=507.18$; 2: 样本稀释倍数。

(3) 按细胞数量计算:

$$\text{ATP 的含量 } (\mu\text{mol}/10^4) = 2x \times V_{\text{提取}} \div \text{细胞数量} = 0.002x$$

$$\text{ATP 的含量 } (\mu\text{g}/10^4) = 2x \times V_{\text{提取}} \times 507.18 \div \text{细胞数量} = 1.014x$$

V 提取: 提取液一的体积, 1mL; $M_{\text{ATP}}=507.18$; 2: 样本稀释倍数; 细胞数量: 以万计, 1000 万。

注意事项:

1. 测试完毕后, 需要用高浓度的超纯水相冲洗色谱柱 (约 20-30 个柱体积), 以防阻塞色谱柱, 最后按柱子的种类规范冲洗, 防止损伤色谱柱。
2. 标准品的稀释倍数要根据样品中 ATP 的浓度确定, 样品中 ATP 的峰面积必须在不同浓度的标准品溶液的峰面积之内, 该标准品的稀释倍数只是一个参考。若样本中 ATP 浓度过高, 建议可稀释后再测。
3. ATP, 特别是提取后样品中的 ATP 在室温不太稳定, 需尽快操作。
4. 若样本量过大, 建议每天测试一次标准溶液 (一个标准溶液即可), 以确定相应的保留时间。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com