

核苷酸(ATP、ADP、AMP)含量检测试剂盒

产品货号: BA3182

产品规格: 50T

产品简介:

核苷酸具有重要的生物学功能,是一类由嘌呤碱或嘧啶碱、核糖或脱氧核糖以及磷酸三种物质组成的化合物,主要参与构成核苷。

三磷酸腺苷(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。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。

二磷酸腺苷(ADP)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。在生物体内,通常为三磷酸腺苷(ATP)水解失去一个磷酸根,即断裂一个高能磷酸键,并释放能量后的产物。

一磷酸腺苷(AMP)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中,是在机体内由ATP与ADP释放能量之后形成的。可以继续结合磷酸基团形成二磷酸腺苷(ADP)和三磷酸腺苷(ATP)。是ATP不完全水解的产物。

ATP、ADP、AMP在254nm下有吸收峰,可以利用高效液相色谱法根据不同的出峰时间和峰面积来测定不同核苷酸含量。

产品内容:

提取液一: 液体80mL×1瓶, 2-8℃保存。

提取液二: 液体40mL×1瓶, 2-8℃保存。

试剂一: 液体15mL×1瓶, 2-8℃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10mL×1瓶, 2-8℃保存。

ATP标准品: 粉剂×1支, -20℃保存。临用前加入1.8mL蒸馏水配制成1μmol/mL ATP标准溶液, -20℃冻存。

为了保证ATP的完整性,请避免反复冻融。

ADP标准品: 粉剂×1支, -20℃保存。临用前加入2.34mL蒸馏水配制成1μmol/mL ADP标准溶液, -20℃冻存。

为了保证ADP的完整性,请避免反复冻融。

AMP标准品: 粉剂×1支, -20℃保存。临用前加入2.0mL蒸馏水配制成1μmol/mL AMP标准溶液, -20℃冻存。

为了保证AMP的完整性,请避免反复冻融。

自备材料:

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,0.45μm),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。

实验前准备工作:

1. 将500mL色谱纯乙腈(流动相A)和1000mL配制好的流动相B用滤膜抽滤,除去溶剂中杂质,以防堵塞色谱柱。(乙腈采用0.45μm有机系滤膜抽滤,配制好的流动相B采用0.22μm 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. ATP标准品的配制: 将1μmol/mL的ATP标准溶液用蒸馏水稀释成0.5μmol/mL、0.1μmol/mL、0.05μmol/mL、0.01μmol/mL、0.005μmol/mL的ATP标准品溶液。
4. ADP标准品的配制: 将1μmol/mL的ADP标准溶液用蒸馏水稀释成0.5μmol/mL、0.1μmol/mL、0.05μmol/mL、0.01μmol/mL、0.005μmol/mL的ADP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)。
5. AMP标准品的配制: 将1μmol/mL的AMP标准溶液用蒸馏水稀释成0.5μmol/mL、0.1μmol/mL、0.05μmol/mL、0.01μmol/mL、0.005μmol/mL的AMP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)。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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、核苷酸的提取:

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)加入提取液一, 冰浴匀浆, 然后冰浴浸提40min。4℃条件下10000rpm离心10min, 取上清液750μL, 加入750μL的提取液二, 充分震荡(5min)混匀后, 再次在4℃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℃, 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℃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: 建议称取0.4mL血清样本, 加入0.6mL提取液一, 冰浴浸提40min。4℃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℃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)。

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 μL, 柱温: 27℃, 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 μL。在10min内可分离ATP、ADP、AMP, ATP的保留时间为7.8min左右, ADP的保留时间为6.7min左右, AMP的保留时间为5.4min左右。(体系、柱子、流动相pH等不同, 保留时间有差异, 仅作参考)。
4. 检测准备好的样品溶液进样量为10 μL, 在相应的保留时间处检测ATP、ADP、AMP的峰面积。

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

三、ATP、ADP、AMP含量计算

1. 标准曲线的建立

以标准品浓度(μmol/mL)为横坐标, 峰面积为纵坐标分别绘制ATP、ADP、AMP的标准曲线, 将样品的峰面积代入标准曲线, 计算样本中ATP、ADP、AMP的浓度x1、x2、x3(μmol/mL)。

2. ATP含量的计算:

(1)按样本质量计算:

$$\text{ATP的含量}(\mu\text{mol/g}) = 2x_1 \times V_{\text{提取}} \div W = 3 \times x_1 \div W$$

$$\text{ATP的含量}(\mu\text{g/g}) = 2x_1 \times V_{\text{提取}} \times 507.18 \div W = 1653.42 \times x_1 \div W$$

V提取: 加入提取液一的体积, 1.5mL; W: 样本质量, g; MATP=551.14; 2: 样本稀释倍数。

(2)按样本体积计算:

$$\text{ATP的含量}(\mu\text{mol/mL}) = 2x_1 \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{样}} = 5 \times x_1$$

$$\text{ATP的含量}(\mu\text{g/mL}) = 2x_1 \times V_{\text{提取}} \times 551.14 \div V_{\text{样}} = 2755.7 \times x_1$$

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; MATP=551.14; 2: 样本稀释



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

倍数。

(3)按细胞数量计算:

$$\text{ATP的含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell})=2 \times 1 \times V_{\text{提取}} \div N=2 \times x1 \div N$$

$$\text{ATP的含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=2 \times 1 \times V_{\text{提取}} \times 551.14 \div N=1102.28 \times x1 \div N$$

V提取: 提取液一的体积, 1mL; MATP=551.14; N: 细胞数量, 以万计; 2: 样本稀释倍数。

3. ADP含量的计算:

(1) 按样本质量计算:

$$\text{ADP的含量}(\mu\text{mol}/\text{g})=2 \times 2 \times V_{\text{提取}} \div W=3 \times x2 \div W$$

$$\text{ADP的含量}(\mu\text{g}/\text{g})=2 \times 2 \times V_{\text{提取}} \times 427.2 \div W=1281.6 \times x2 \div W$$

V提取: 加入提取液一的体积, 1.5mL; W: 样本质量, g; MADP=427.2; 2: 样本稀释倍数。

(2) 按样本体积计算:

$$\text{ADP的含量}(\mu\text{mol}/\text{mL})=2 \times 2 \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{样}}=5 \times x2$$

$$\text{ADP的含量}(\mu\text{g}/\text{mL})=2 \times 2 \times V_{\text{提取}} \times 427.2 \div V_{\text{样}}=2136 \times x2$$

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; MADP=427.2; 2: 样本稀释倍数。

(3) 按细胞数量计算:

$$\text{ADP的含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell})=2 \times 2 \times V_{\text{提取}} \div N=2 \times x2 \div N$$

$$\text{ADP的含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=2 \times 2 \times V_{\text{提取}} \times 427.2 \div N=854.4 \times x2 \div N$$

V提取: 提取液一的体积, 1mL; MADP=427.2; N: 细胞数量, 以万计; 2: 样本稀释倍数。

4. AMP含量的计算:

(1) 按样本质量计算:

$$\text{AMP的含量}(\mu\text{mol}/\text{g})=2 \times 3 \times V_{\text{提取}} \div W=3 \times x3 \div W$$

$$\text{AMP的含量}(\mu\text{g}/\text{g})=2 \times 3 \times V_{\text{提取}} \times 499.19 \div W=1497.57 \times x3 \div W$$

V提取: 加入提取液一的体积, 1.5mL; W: 样本质量, g; MAMP=499.19; 2: 样本稀释倍数。

(2)按样本体积计算:

$$\text{AMP的含量}(\mu\text{mol}/\text{mL})=2 \times 3 \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{样}}=5 \times x3$$

$$\text{AMP的含量}(\mu\text{g}/\text{mL})=2 \times 3 \times V_{\text{提取}} \times 499.19 \div V_{\text{样}}=2495.95 \times x3$$

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; MAMP=499.19; 2: 样本稀释倍数。

(3) 按细胞数量计算:

$$\text{AMP的含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell})=2 \times 3 \times V_{\text{提取}} \div N=2 \times x3 \div N$$

$$\text{AMP的含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=2 \times 3 \times V_{\text{提取}} \times 499.19 \div N=998.38 \times x3 \div N$$

V提取: 提取液一的体积, 1mL; MAMP=499.19; 细胞数量: 以万计, 1000万; 2: 样本稀释倍数。

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, 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不同核苷酸的浓度确定, 样品中不同核苷酸的峰面积必须在其对应的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。若样本中某一种核苷酸浓度过高, 建议可稀释后再测。
3. 建议采用鲜样进行提取, 提取后样品中的ATP、ADP、AMP在室温不太稳定, 需尽快操作。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com