核苷酸（ATP、ADP、AMP）含量检测试剂盒说明书

高效液相色谱法

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

规格：50T/48S

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。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。

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 254 nm 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。

试验中所需的仪器和试剂：

高效液相色谱仪（C18 柱（4.6×250 mm）、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、0.45 μm 水系针头式过滤器（50 个）、注射器、抽滤器、有机系滤膜、水系滤膜、2 mL 棕色进样瓶（50 个）、色谱纯乙腈（500 mL）、超纯水。

产品内容：

提取液一：液体 80 mL ×1 瓶，2-8℃保存。

提取液二：液体 40 mL ×1 瓶，2-8℃保存。

试剂一：液体 15 mL ×1 瓶，2-8℃保存。临用前取 3.5 mL 试剂一加入到 1000 mL 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 10 mL ×1 瓶，2-8℃保存。

ATP 标准品：粉剂×1 支，-20℃保存。临用前加入 1.8 mL 蒸馏水配制成 1 μmol/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 2.34 mL 蒸馏水配制成 1 μmol/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 2.0 mL 蒸馏水配制成 1 μmol/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。

实验前准备工作：

1. 将 500 mL 色谱纯乙腈（流动相 A）和 1000 mL 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 0.45 μm 有机系滤膜抽滤，配制好的流动相 B 采用 0.22 μm 水系滤膜抽滤）。
2. 将配制好的流动相 A、B 超声 30 min，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 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的 ATP 标准溶液用蒸馏水稀释成 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.05 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.01 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.005 $\mu\text{mol/mL}$ 的 ATP 标准品溶液。
4. **ADP 标准品**的配制：将 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的 ADP 标准溶液用蒸馏水稀释成 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.05 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.01 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.005 $\mu\text{mol/mL}$ 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 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的 AMP 标准溶液用蒸馏水稀释成 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.05 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.01 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.005 $\mu\text{mol/mL}$ 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）。
6. 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 0.3 g 组织样本，加入 1.5 mL 提取液一）加入提取液一，冰浴匀浆，然后冰浴浸提 40 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 10000 rpm 离心 10 min，取上清液 750 μL ，加入 750 μL 的提取液二，充分震荡（5 min）混匀后，再次在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 10000 rpm 离心 10 min。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）。

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 1 mL 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 3 min）；于 4 $^{\circ}\text{C}$ ，10000 rpm 离心 10 min，取 0.75 mL 上清液，再加入 0.75 mL 提取液二，充分震荡（5 min）混匀后，再次在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 10000 rpm 离心 10 min。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）。

3. 血清：建议称取 0.4 mL 血清样本，加入 0.6 mL 提取液一，冰浴浸提 40 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 10000 rpm 离心 10 min，取上清液 0.75 mL，加入 0.75 mL 的提取液二，充分震荡（5 min）混匀后，再次在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 10000 rpm 离心 10 min，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 μL ，柱温：27 $^{\circ}\text{C}$ ，流速为 0.8 mL/min，波长为 254 nm，洗脱程序如下表，走样时间 70 min，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。

- 检测准备好的标准品溶液进样量为 10 μL 。在 10 min 内可分离 ATP、ADP、AMP，ATP 的保留时间为 7.8 min 左，ADP 的保留时间为 6.7 min 左右，AMP 的保留时间为 5.4 min 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）。
- 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%
15 min	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 ($\mu\text{mol/mL}$) 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 x_1 、 x_2 、 x_3 ($\mu\text{mol/mL}$)。

2. ATP 含量的计算：

(1) 按样本质量计算：

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

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

$V_{\text{提取}}$ ：加入提取液一的体积，1.5 mL； W ：样本质量，g； $M_{\text{ATP}}=551.14$ ；2：样本稀释倍数。

(2) 按样本体积计算：

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

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

$V_{\text{提取}}$ ：加入提取液一后的总体积，1 mL； $V_{\text{样}}$ ：提取液一中加入样本体积，0.4 mL； $M_{\text{ATP}}=551.14$ ；

2：样本稀释倍数。

(3) 按细胞数量计算：

$$\text{ATP 的含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = 2 x_1 \times V_{\text{提取}} \div N = 2 \times x_1 \div N$$

$$\text{ATP 的含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = 2 x_1 \times V_{\text{提取}} \times 551.14 \div N = 1102.28 \times x_1 \div N$$

$V_{\text{提取}}$ ：提取液一的体积，1 mL； $M_{\text{ATP}}=551.14$ ； 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：

$$\text{ADP 的含量 } (\mu\text{mol/g}) = 2 x_2 \times V_{\text{提取}} \div W = 3 \times x_2 \div W$$

$$\text{ADP 的含量 } (\mu\text{g/g}) = 2 x_2 \times V_{\text{提取}} \times 427.2 \div W = 1281.6 \times x_2 \div W$$

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

(2) 按样本体积计算:

ADP 的含量 ($\mu\text{mol/mL}$) = $2x_2 \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{样}} = 5 \times x_2$

ADP 的含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $2x_2 \times V_{\text{提取}} \times 427.2 \div V_{\text{样}} = 2136 \times x_2$

V 提取: 加入提取液一后的总体积, 1 mL; V 样: 提取液一中加入样本体积, 0.4 mL; $M_{ADP}=427.2$;

2: 样本稀释倍数。

(3) 按细胞数量计算:

ADP 的含量 ($\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}$) = $2x_2 \times V_{\text{提取}} \div N = 2 \times x_2 \div N$

ADP 的含量 ($\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}$) = $2x_2 \times V_{\text{提取}} \times 427.2 \div N = 854.4 \times x_2 \div N$

V 提取: 提取液一的体积, 1 mL; $M_{ADP}=427.2$; 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:

AMP 的含量 ($\mu\text{mol/g}$) = $2x_3 \times V_{\text{提取}} \div W = 3 \times x_3 \div W$

AMP 的含量 ($\mu\text{g/g}$) = $2x_3 \times V_{\text{提取}} \times 499.19 \div W = 1497.57 \times x_3 \div W$

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

(2) 按样本体积计算:

AMP 的含量 ($\mu\text{mol/mL}$) = $2x_3 \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{样}} = 5 \times x_3$

AMP 的含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $2x_3 \times V_{\text{提取}} \times 499.19 \div V_{\text{样}} = 2495.95 \times x_3$

V 提取: 加入提取液一后的总体积, 1 mL; V 样: 提取液一中加入样本体积, 0.4 mL; $M_{AMP}=499.19$;

2: 样本稀释倍数。

(3) 按细胞数量计算:

AMP 的含量 ($\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}$) = $2x_3 \times V_{\text{提取}} \div N = 2 \times x_3 \div N$

AMP 的含量 ($\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}$) = $2x_3 \times V_{\text{提取}} \times 499.19 \div N = 998.38 \times x_3 \div N$

V 提取: 提取液一的体积, 1 mL; $M_{AMP}=499.19$; 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, 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。