

## ATP 含量检测试剂盒 HPLC 法说明书

### AM0321

#### 保存条件

按照产品内容保存要求保存。

#### 产品信息

产品名称	产品货号	规格
ATP 含量检测试剂盒	AM0321S	50 管/48 样
HPLC 法	AM0321M	100 管/96 样

#### 产品简介

ATP 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是生物能量通货，能荷是描述细胞能量代谢状态的主要参数。测定 ATP 含量并且计算能荷，能够反映能量代谢状态。

ATP 在 254 nm 下有吸收峰，可以利用高效液相色谱法测定其含量。

#### 产品内容

组成	含量	保存
试剂一	60mLx1 瓶	4°C
试剂二	60mLx1 瓶	4°C
试剂三	粉剂 1x1 瓶， 粉剂 2x1 瓶，	4°C； 临用前用少量蒸馏水将粉剂 1 和粉剂 2 溶解后倒入 1000mL 容量瓶中，用蒸馏水定容至 1000mL，形成流动相缓冲液基质（注：试剂瓶中的粉剂要冲洗干净），4°C可保存 1 周；
试剂四	ATP 标准品 5mg×1 支，	-20°C

#### 使用方法

**需自备的仪器和用品：**高效液相色谱仪、低速离心机、溶剂抽滤装置、针头式过滤器（水系，50 个，0.22μm）、滤膜（水系和有机系各 1 个，0.45μm）、C18 柱（4.6×150 mm）、可调式移液器、样品瓶（50 个，2mL）、甲醇（色谱级，300 mL）和蒸馏水。

#### 实验前的准备工作：

1、将蒸馏水 1000 mL、流动相缓冲液基质 1000 mL 和甲醇 300 mL 用 0.45 μm 的滤膜抽滤，以除去溶剂中的杂质，防止堵塞色谱柱。（注：蒸馏水和缓冲液基

质用水系滤膜抽滤，甲醇用有机系滤膜抽滤)。

2、流动相的配制：将抽滤完毕的流动相缓冲液基质 1000 mL 与甲醇配比为 99.9: 0.1 (v/v)，即取 999mL 缓冲液基质与 1mL 甲醇混合。

3、将抽滤完毕的甲醇和蒸馏水配比成 100%的甲醇，10%的甲醇，蒸馏水各 250 mL。将 2 和 3 中的溶剂超声 20 分钟，以脱去溶剂中的气泡，防止堵塞色谱柱。

#### ATP 的提取：

1、组织的处理：按照组织质量 (g)：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一），进行冰浴匀浆，4000g 常温离心 15 min，取上清液，加入等体积的试剂二，混匀，4000 g 常温离心 15 min，取上清，针头式过滤器过滤后待测。

2、细胞或细菌的处理：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10<sup>4</sup> 个)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4000 g 常温离心 15 min，取上清液，加入等体积的试剂二，混匀，4000 g 常温离心 15 min，取上清，针头式过滤器过滤后待测。

#### 标准品的配制：

在试剂四中加入 1mL 蒸馏水，配成 5mg/mL 母液，将母液用蒸馏水分别稀释成 100 μg/mL、80μg/mL、60μg/mL、40 μg/mL 和 20 μg/mL 的 ATP 标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

#### ATP 含量测定操作步骤：

1. 开启电脑、检测器和泵，安装上色谱柱，打开软件，在方法组中设置进样量 20 μL，流速 1 mL/min，保留时间 10min，检测波长 254nm，设置完毕保存方法组。

2. 用 100%的甲醇、10%的甲醇、蒸馏水按甲醇浓度从大到小的顺序过色谱柱 30min。

3. 用流动相过柱子，待基线稳定后开始加样。

4. 加入标准品 20 μL，在 10min 内可分离 ATP，ATP 的保留时间在 3min 左

---

右，（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的 ATP 标准品的峰面积。

5. 加入样品 20  $\mu\text{L}$ ，在相应保留时间处检测 ATP 的峰面积。

#### **ATP 含量的计算：**

以标准品浓度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）为横坐标，峰面积为纵坐标计算 ATP 标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线，计算样品 ATP 含量。

#### **注意事项**

- 1、为了避免使用过程中柱压过大，流速由小到大调节。
- 2、使用完毕时，由于流动相含有缓冲盐，用水冲洗柱子 1 小时，以防止缓冲盐结晶堵塞色谱柱，然后用 10%的甲醇、100%的甲醇按甲醇浓度从小到大的顺序洗色谱柱 30min。
- 3、标准品的稀释倍数要根据样品中 ATP 浓度确定，样品中 ATP 的峰面积必须落在不同浓度的 ATP 标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。