

## 环磷酸腺苷（cAMP）含量试剂盒说明书

HPLC 法 50 管/48 样

请客户正式实验前做预实验确定样本稀释倍数！注意事项必读！

### 测定意义：

环磷酸腺苷（Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate, cAMP）是一种重要的具有生物活性的环核苷酸类物质，广泛存在于生物体内。cAMP 作为生命信息传递的“第二信使”，不仅参与机体多种酶的代谢过程，对细胞的分裂、分化和发育起着重要的调节作用，而且还可调节基因转录和翻译，影响蛋白质合成。

### 测定原理：

cAMP 在 254 nm 下有吸收峰，可以利用高效液相色谱法测定其含量。

### 需自备的实验用品：

高效液相色谱仪、低速离心机、溶剂抽滤装置、氮吹仪、涡旋振荡器、针头式过滤器（水系，50 个，0.22μm）、滤膜（水系和有机系各 1 个，0.45 μm）、C18 柱（耐水，4.6 ×250 mm）、可调式移液器、样品瓶（50 个，2 mL）、内衬管（50 个，放置在样品瓶内用于微量样品进样）、甲醇（色谱级，200 mL）和超纯水。

### 试剂的组成和配制：

试剂一：粉剂一支，25 °C 保存；

试剂二：液体 60 mL×1 瓶，4 °C 保存；

试剂三：cAMP 标准品 1.0 mg×1 支，-20 °C 保存。

### 实验前的准备工作：

- 1、将超纯水 1000 mL 和甲醇 200 mL 用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜抽滤，以除去溶剂中的杂质，防止堵塞色谱柱。（注：超纯水用水系滤膜抽滤，甲醇用有机系滤膜抽滤）。
- 2、流动相的配制：量取 900 mL 超纯水，加入 1.22 g 试剂一，混匀溶解。将甲醇和加入试剂一的超纯水按照 10：90 的比例配成流动相，可取 100 mL 甲醇和 900 mL 超纯水混合，混匀。
- 3、将配好的流动相超声 30 分钟，以脱去溶剂中的气泡，防止堵塞色谱柱。

### cAMP 的提取：

组织的处理：取 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一，冰浴匀浆，转移到 1.5 mL 有盖离心管中，涡旋 1 min，50  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h 并且震荡 3~4 次，8000g 离心 10 min，取上层液体至 1.5 mL 离心管中，氮气吹干，加入 0.2 mL 超纯水，涡旋震荡溶解，用针头式过滤器过滤后待测。

### 标准品的配制：

在试剂三中加入 1 mL 超纯水，配成 1 mg /mL 母液，将母液用超纯水分别稀释成 200  $\mu\text{g/mL}$ 、150 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$  和 10  $\mu\text{g/mL}$  的 cAMP 标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

### cAMP 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 10  $\mu\text{L}$ ，流速 0.8 mL/min，柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ，测试时间 45 min，检测波长 254 nm，设置完毕保存方法组。
2. 用流动相过柱子，待基线稳定后开始加样。
3. 加入标准品 10  $\mu\text{L}$ ，在 45 min 内可分离 cAMP，cAMP 的保留时间在 35 min 左右（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的 cAMP 标准品的峰面积。
4. 加入样品 10  $\mu\text{L}$ ，在相应保留时间处检测 cAMP 的峰面积。

### cAMP 含量的计算：

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

### 注意事项：

- 1、本试剂盒检测限为  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，若 cAMP 含量低于该浓度需要对样品浓缩，或选择 cAMP 含量 ELISA 试剂盒进行测定。
- 2、为了避免使用过程中柱压过大，流速由小到大调节。
- 3、使用完毕时，先以 20% 甲醇水溶液冲洗色谱柱 1 h，再用纯甲醇洗色谱柱 30 min。
- 4、标准品的稀释倍数要根据样品中 cAMP 浓度确定，样品中 cAMP 的峰面积必须落在不同浓度的 cAMP 标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。