

环鸟苷酸 (cGMP) ELISA 检测试剂盒

产品简介:

本试剂盒利用竞争酶联免疫分析方法测定细胞提取物或体外腺苷酸环化酶实验中的 cGMP 的水平。包被羊抗鼠多克隆抗体在酶标板上，细胞提取物或体外腺苷酸环化酶实验中的 cGMP 与固定数量的标记辣根过氧化物酶的 cGMP 竞争性的结合抗 cGMP 单克隆抗体，采用已知浓度的 cGMP 标准品来做标准曲线。检测 450nm 波长下的 OD 值，吸光度 OD 值与样品中 cGMP 的浓度呈反比关系。基于 cGMP 标准品所得曲线，通过测得的 OD 值可以计算出样品中 cGMP 的浓度，本试剂盒 IC50 (50% B/B0) 约 5 pmol/mL，检测限约 0.1 pmol/mL。

产品组分

组成成分	规格	保存
1. cGMP standard 10000 pmol/mL cAMP	0.1ml	-80℃
2. cGMP-HRP Conjugate 1000x stock of HRP conjugated with cAMP	0.2ml	-80℃
3. cGMP Antibody Anti-cAMP monoclonal antibody (1000X stock)	0.2ml	-80℃
4. Assay Buffer(10x) phosphate buffer with preservative	30ml	2-8℃
5. Neutralizing Reagent tris buffered saline with preservative	8ml	2-8℃
6. Sample Diluent 0.1M HCl, only required for extraction of samples and diluting standard	30ml	2-8℃
7. TMB Substrate 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine	18ml	2-8℃
8. Stop Solution 2M sulphuric acid	8ml	2-8℃
9. Goat anti-Mouse IgG Coated microtiter plate 12x8 well strips in a bag with desiccant	96T	2-8℃

所需材料

酶标仪 (检测波长 450 nm，参比波长 630nm)，加样枪，EP 管，孔板振荡器，吸水纸，去离子水

样本处理

1. 组织样本：新鲜收集的组织样本必须立即冻存在液氮中。使用前去除冰冻样本称重，加入 5-10 倍体积的 0.1M HCl。用匀浆器在冰上匀浆。然后室温离心 5min (> 600 g)。留上清，可以直接实验，或用 0.1M HCl 稀释。

2. 细胞样本：去除培养基，加入适量 0.1M HCl（在 0.1M HCl 中加入 0.1%~1% Triton X-100 可增强细胞的溶解效果），放置 10min，期间观察以确认细胞是否发生溶解。如果溶解不充分，可以再增加 10min，直至细胞完全溶解。室温离心 5min（600 g）。留上清，用于本试剂盒检测。注：上述浓度的 Triton X-100 不会影响样品与板的结合，但可能会增加背景值，建议用含相同浓度 Triton X-100 稀释标准品，以去除误差。

3. 尿液、血浆和培养液：每 ml 样品中加入 10 μ l 浓盐酸（12M），混匀后，室温离心 5min（600 g），留上清，用于本试剂盒检测。血浆、血清、全血和组织匀浆通常含有磷酸二酯酶（phosphodiesterases）和大量免疫球蛋白（Ig），它们会干扰实验。用 0.1 M HCl 处理样品，可以灭活磷酸二酯酶和降低免疫球蛋白的浓度，使之可以用于本试剂盒。磷酸二酯酶和免疫球蛋白也可以通过加入 2% TCA（三氯乙酸）使之沉淀或用截留分子量 10 KD 的超滤离心管去除。

注意事项

1. 本试剂盒所有相关试剂均预先平衡至室温（20-25 $^{\circ}$ C）。
2. 各孔分别加入标准品和样品。
3. 沿孔壁加入各试剂，避免交叉污染。
4. 本试剂盒提供的是可分拆的孔板条，使用者可以按照样品数量选择使用量。未用的孔板请放回原封口袋，保存在 4 $^{\circ}$ C。孔板请放在本试剂盒配送的孔板架上使用。
5. 加入底物前，请确保孔中没有残余液体。
6. 终止液具有腐蚀性，请小心使用。

试剂准备

1. cGMP 标准品溶液

取 8 个新 EP 管，分别标记 1-8#。在 1#管中加入 990 μ l 0.1M HCl，2-8#管中分别加 500 μ l 0.1M HCl。加入 10 μ l 标准品（10000 pmol/mL）到 1#管中，剧烈振荡。从 1#管中取去 500 μ l 加入 2#管，剧烈振荡。同样方法完成 3-8#管的稀释（1-8#管 cGMP 浓度分别是 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78pmol/ml）。稀释好的标准品建议在 15min 内使用。另外，标记一个新 EP 管为 B0（maximum binding，0pmol/ml），加入 500 μ l 0.1M HCl。

2. “Assay Buffer 工作液”的准备

将本试剂盒的 Assay Buffer（10 $\times$ ）（15 ml）加入 135 ml 去离子水中。

注：配好的 Assay Buffer 工作液可室温保存 3 个月（但不能超出试剂盒的保质期）

3. “cGMP-HRP Conjugate 工作液”的准备

用配好的 Assay Buffer 工作液按 1:1000 将 cGMP-HRP Conjugate（1000 $\times$ ）稀释至工作液。

实验步骤

注：所有标准品管包括 B0 管以及样品管均要加入相同体积的 Neutralizing Buffer，并立即振荡 2sec。

1. 每个孔中加入 50 μ l Neutralizing Buffer。TA（Total Activity）和空白孔除外。
2. 加 50 μ l 0.1M HCl 至 NSB 孔（Non-Specific Binding）和 B0 孔。
3. 分别取 50 μ l 各浓度标准品溶液至相应孔中。
4. 取 50 μ l 样品溶液至相应孔中。
5. 各取 50 μ l Assay Buffer 工作液至 NSB 孔中。
6. 取 50 μ l cGMP-HRP Conjugate 工作液至各孔中（TA 和空白孔不加）。
7. 取 50 μ l Anti-cGMP monoclonal antibody 至各孔中（TA、空白和 NSB 孔不加）。
8. 室温孵育 2 h，倒空，用 Assay Buffer 工作液洗 4 遍，每次拍干。
9. 加入 5 μ l 稀释 20 倍的 cGMP-HRP Conjugate 工作液至 TA 孔中。
10. 取 150 μ l TMB Substrate 至各孔中，室温静置 10min 左右。
11. 加 50 μ l Stop Solution 至各孔中，并立即上酶标仪读数检测波长为 450nm，参比波长为 630nm）。扣除每个读数的 Blank（空白）孔光密度值。

Well	Neutralizing Buffer	0.1M HCl	Standard /Sample	HRP-cGMP Conjugate	cGMP mAb	Assay Buffer
Blank	-	-	-	-	-	-
TA	-	-	-	5μl	-	-
NSB	50μl	50μl	-	50μl	-	50μl
B0	50μl	50μl	-	50μl	50μl	-
Standard /Sample	50μl	-	50μl	50μl	50μl	-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	S1	S1	SP1	SP16	SP17	SP32	SP33	SP48	SP49	SP64	SP65
B	Blank	S2	S2	SP2	SP15	SP18	SP31	SP34	SP47	SP50	SP63	SP66
C	NSB	S3	S3	SP3	SP14	SP19	SP30	SP35	SP46	SP51	SP62	SP67
D	NSB	S4	S4	SP4	SP13	SP20	SP29	SP36	SP45	SP52	SP61	SP68
E	B0	S5	S5	SP5	SP12	SP21	SP28	SP37	SP44	SP53	SP60	SP69
F	B0	S6	S6	SP6	SP11	SP22	SP27	SP38	SP43	SP54	SP59	SP70
G	B0	S7	S7	SP7	SP10	SP23	SP26	SP39	SP42	SP55	SP58	SP71
H	TA	S8	S8	SP8	SP9	SP24	SP25	SP40	SP41	SP56	SP57	SP72

Blank: only contains substrate.

TA: Total activity, contains cGMP-HRP conjugate (5μl) and substrate.

NSB: Non-specific binding, contains neutralizing buffer, cGMP-HRP conjugate and substrate.

B0: 0 pg/mL standard, contains neutralizing buffer, cGMP-HRP conjugate, Anti-cGMP monoclonal antibody and substrate.

S1-S8: Standards 1-8

SP1-SP72: samples

结果计算

1. 样品和标准品的净 OD 平均值的计算：净 OD 平均值=OD 平均值-NSB 孔 OD 平均值

2. 结合率（各浓度标准品的结合率占最大结合率（B0 孔）的百分比）计算：

结合率（B/B0）=（净 OD 平均值/B0 孔 OD 平均值）×100

3. 用软件（如 [Curve Expert 1.4](#) 或 [ELISA Calc 软件](#)，）进行结合率（或净 OD 平均值）对 Log（cGMP 标准品浓度）的三次多项式回归曲线拟合（three order polynomial linear regression curve）或指数 Logistic 曲线拟合。

4. 通过样品的结合率即可计算样品中 cGMP 浓度。