



武汉纽斯特生物技术有限公司

WuHan NewEast Biosciences Co.,LTD

## 环磷酸鸟苷 (cGMP) 酶联免疫吸附测定试剂盒

英文名称: cGMP(Cyclic adenosine monophosphate) ELISA KIT

规格: 96T

货号: 80103

尊敬的客户:

感谢您选用本公司cAMP和cGMP酶联免疫吸附检测试剂盒。环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)是在通过对特定蛋白激酶作用来调节细胞内能量代谢的过程中非常重要的第二信使分子。两者都富含于中枢神经系统当中, AMP 参与较高的皮质功能, 而 cGMP 参与光转导。cAMP 是三磷酸腺苷(ATP)的衍生物, 在多种不同生物体的细胞内介导 cAMP 依赖的信号转导通路。cAMP 参与细胞代谢、分化、增殖的跨膜调控机制在恶性生长中具有良好的细胞抑制和调节体内平衡的作用。使用前请仔细阅读说明书,如有疑问请咨询武汉纽斯特生物技术有限公司。

Email:neweastbio@126.com 电话: 027-87561033

本试剂盒仅供体外研究使用, 不用于临床诊断。



## 产品介绍

环磷腺苷酸(cAMP)和环磷鸟苷酸(cGMP)是在通过对特定蛋白激酶作用来调节细胞内能量代谢的过程中非常重要的第二信使分子。两者都富含于中枢神经系统当中,AMP参与较高的皮质功能,而cGMP参与光转导。cAMP是三磷酸腺苷(ATP)的衍生物,在多种不同生物体的细胞内介导cAMP依赖的信号转导通路。cAMP参与细胞代谢,分化,增殖的跨膜调控机制在恶性生长中具有良好的细胞抑制和调节体内平衡的作用。

目前商业化提供的一些cGMP检测试剂盒主要使用的是非亲和纯化的cGMP多克隆抗体。尽管据称有特异性,但这些多克隆抗cGMP抗体与cAMP和GTP呈现一定程度的交叉反应。且在大多数细胞类型中,cGMP含量低于cAMP 100倍。

纽斯特生物的cGMP ELISA检测试剂盒使用的是独一无二的鼠单克隆抗cGMP抗体,该单克隆cGMP抗体的特异性比cAMP,GTP等类似的小分子高出108倍以上。相较于其他的多克隆抗体cGMP试剂盒,纽斯特生物cGMP ELISA试剂盒能显著的提高其灵敏性和特异性,且能有效避免来自动物多克隆抗体的批次间差异,因此可以提供长久有效地可重复性定量检测。

此外,其他ELISA试剂盒的多克隆抗cGMP抗体与乙酰化cGMP的亲合力明显高于非乙酰化cGMP,而本试剂盒的单克隆cGMP抗体与乙酰化或非乙酰化cGMP具有同样的亲合力。因此,纽斯特生物cGMP ELISA试剂盒中的样品和标准品不需要乙酰化处理,从而明显缩短了分析时间,有效避免了乙酰化过程中的有机试剂的使用,为大家提供了一个更安全,更健康的工作环境。

## 实验原理

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cAMP的水平。简而言之,将羊抗鼠多克隆抗体包被在酶标板上,细胞提取物或体外腺苷酸环化酶实验中的cGMP与固定数量的偶联辣根过氧化物酶的cGMP或碱性磷酸酶竞争性的结合抗cGMP单克隆抗体,已知的cGMP作为标准品来做标准曲线。经过一段时间孵育,洗掉所有试剂,加入底物进行显色。将多孔板置于酶标仪上,于450nm或405nm波长下,进行读数。黄色的光强度与样品中cGMP的浓度呈反比关系。基于cGMP标准品所得曲线,通过测得的光密度可以计算出样品中cGMP的浓度。



## 研究背景

cGMP作为独特的第二信使，可调节细胞对各种外源和内源信号分子的反应。cGMP主要通过激活蛋白激酶，控制特定的离子通道、磷酸二酯酶调节细胞环核苷酸浓度来调节不同的生理过程(8)，如血管平滑肌松弛，上皮细胞电解质运输，骨生长，白细胞迁移、轴突引导、精子运动，血小板蔓延以及血管通透性等。

通过鸟苷酸环化酶可以实现GTP转化为cGMP。在哺乳动物中存在2种类型的鸟苷酸环化酶：可溶性及膜结合的鸟苷酸环化酶(8,10,11)。可溶性环化酶在一氧化氮与血红素辅基结合后即被激活。七层膜结合鸟苷酸环化酶（即跨膜鸟苷酸环化酶或鸟苷酸环化酶微粒）已被证实存在于人类基因组中，鸟苷酸环化酶A和B是利尿钠肽受体，鸟苷酸环化酶C能被热稳定细菌肠毒素、鸟苷素和豚激活。跨膜鸟苷酸环化酶的活性亦受胞内信号通路的其他受体信号所调控。

## 试剂盒组分及保存

组份	货号	储存温度
<b>1. Goat anti-Mouse IgG Coated plate of 96 wells</b> 12x8 well strips in a bag with desiccant	30101	2-8°C
<b>2. cGMP-HRP</b> 1000x stock of HRP conjugated with cAMP, 1x6ul	30302	-80°C
<b>3. cGMP Antibody</b> Anti-cAMP monoclonal antibody (1000X stock), 1x6ul	26001-2	-80°C
<b>4. Neutralizing Reagent</b> tris buffered saline with preservative, 1x6 mL	30103	2-8°C
<b>5. 10x Assay Buffer</b> phosphate buffer with preservative, 1x15 mL	30106	2-8°C
<b>6. cGMP Standard</b> 5000 pmol/mL cGMP, 1x0.1 mL	30303	-80°C
<b>7. Substrate A</b> 12ml	30107	2-8°C
<b>8. Substrate B</b> 12ml	30108	2-8°C
<b>9. Sample Diluent</b> 0.1M HCl, only required for extraction of samples and diluting standard, 1x15mL	30109	2-8°C
<b>10. Stop Solution</b> 2M sulphuric acid, 1x6mL	30110	2-8°C

**注：**收到试剂盒后，若不立即使用，请按照标签说明存储在相应的温度。



## 试剂盒所需自备物品:

1. 去离子水或蒸馏水。
2. 浓盐酸。
3. 量程在5 $\mu$  L至1000 $\mu$  L之间的精密移液管。
4. 量程为50 $\mu$  L和200 $\mu$  L的中继移液器。
5. 用于稀释储液的一次性烧杯。
6. 刻度量筒。
7. 微孔板振荡器。
8. 吸水纸。
9. 酶标仪，可读波长450nm，在570nm至590nm之间应有修正。

## 样品处理:

纽斯特生物的ELISA试剂盒适用于检测经过盐酸处理而终止内源性磷酸二酯酶活性的cAMP样品。这种样品可直接应用于检测，而不需要蒸发和进一步的处理。

组织样本：需预先冰冻于液氮中。在不锈钢研钵中用液氮将组子样本研磨成精细粉末，待液氮挥发完后，称量冰冻组织样本并加入10倍体积的0.1M HCl混匀。室温以大于600g离心力离心，取上层清液用0.1M HCl稀释至适当浓度。

细胞样本：首先移除培养基，然后加入0.1M HCl处理细胞。孵育10分钟并观察细胞是否被裂解；如果裂解充分，接着孵育10分钟并观察。以大于600g离心力于室温离心，收集上清直接用于实验。临用前在0.1M HCl中加入0.1%至1%浓度的Triton-x 100可增强细胞和组织裂解。

尿液，血浆和培养液：每ml样品中加入10 $\mu$ 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。

## 试剂盒注意事项:

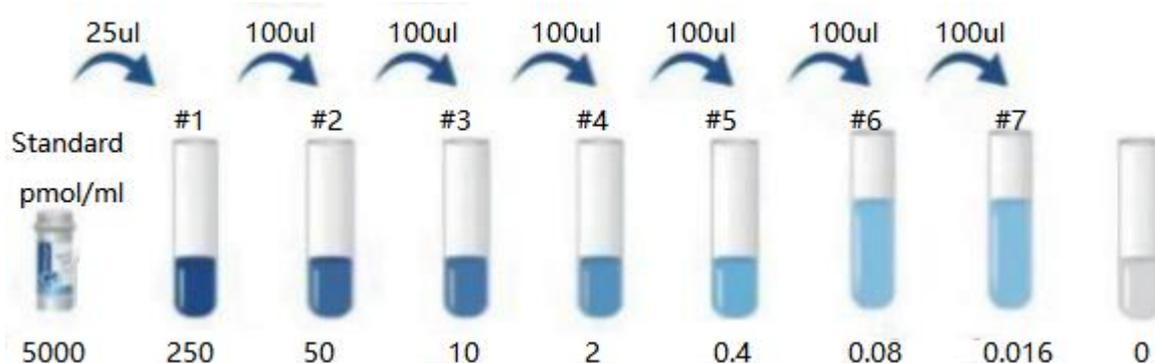
1. 收到试剂盒后若不立即使用，请将试剂按照标签说明存储在相应的温度，-80 $^{\circ}$ C低温保存的抗体和酶储液为避免反复冻融请按每次需要量进行分装冻存；若立即使用，请将整个试剂盒置于4 $^{\circ}$ C保存。
2. 使用前请将试剂盒各个试剂平衡到室温（至少30min）。
3. 用试剂预先润洗枪头在使用；取各种样品、标准品和试剂必需更换枪头。
4. 移取标准品和样品到微孔底部。
5. 从微孔的边缘加入试剂，以避免污染。
6. 本试剂盒使用可拆分的微孔酶标条，使用者可根据样品量多少进行拆分。未使用的酶标条保持干燥，密封于试剂盒提供的铝封袋中，于4 $^{\circ}$ C保存。微孔酶标条需安装在相应的框架上使用。
7. 在加入显色底物前，确保微孔内没有残留的洗涤液。微量残留的洗涤液可能导致分析结果的变化。



## 试剂制备

### 1. 非乙酰化cGMP标准品溶液

将5000 pmol/mL cGMP标准品溶液平衡至室温。从#2至#7标记七只洁净管。移取475 $\mu$ L 0.1M HCl 到 #1号试管，400 $\mu$ L 到 #2至 #7号试管。加入25 $\mu$ L 5000 pmol/mL cGMP标准品到 #1管中,剧烈涡旋震荡。从 #1管中取出100  $\mu$ L溶液至 #2 管中，涡旋震荡，以此类推, 重复上步操作，梯度稀释至 #7管。经以上操作，#1至 #7 管中cGMP标准品浓度分别为 250, 50, 10, 2, 0.4, 0.08 和 0.016 pmol/mL (详见cGMP实验稀释操作流程)。稀释过的标准品需在30分钟内使用。标记一只试管作为无标准品空白对照 (BO)。移 600 $\mu$ L 0.1M HCl 到 BO 管中。



### 2. 1x Assay Buffer (洗涤液)

将15 mL 10 $\times$  Assay Buffer 加到135 mL去离子水中，稀释成工作液。稀释液可在室温保存至试剂盒有效期限，或者3个月。

### 3. cGMP-HRP Conjugate工作液

实验前计算当次实验所需用量 (以50 $\mu$ L/孔计算)，实际配置时应多配置100-200 $\mu$ L.使用前15分钟，用配好的1x Assay Buffer,将cGMP-HRP Conjugate (1000 $\times$ ) 稀释成1x工作浓度。当日使用。

### 4. Anti-cGMP McAb工作液

实验前计算当次实验所需用量 (以50 $\mu$ L/孔计算)，实际配置时应多配置100-200 $\mu$ L.使用前15分钟，用配好的1x Assay Buffer,将Anti-cGMP Antibody 稀释成1x工作浓度。当日使用。



## 实验步骤

使用前将各种试剂取出放置30分钟，平衡至室温。所有标准品和样品必需设置平行对照实验。快速加入试剂至样品中，立即漩涡震荡2秒混匀。

1. 依据实验键盘纸决定酶标条的使用量 将剩余的酶标条连同干燥剂一起放回密封塑料袋，密封，4℃保存
2. 移取50μ L中和液至各个微孔中，除了 TA ( TotalActivity) 孔 和 Blank (空白)孔。
3. 移取100μ L 0.1M HCl 至NSB ( Non-Specific Binding) 孔 和 B0孔 (0pmol/mL cGMP标准品)。
4. 移取100μ L cGMP标准品至相应的孔。
5. 移取100μ L样品至相应的孔。
6. 移取50μ L 1x Assay Buffer 至NSB ( Non-Specific Binding) 孔。
7. 移取50μ L偶联酶至各孔中，除了TA (TotalActivity) 孔和 Blank (空白) 孔。
8. 移取50μ L 抗体工作液至各孔中，除了TA (TotalActivity) 孔，Blank(空白)孔。
9. 将酶标孔置于孔板振动器上，250~500rpm，室温孵育2小时。
10. 在吸水纸上拍干微孔内溶液，加洗涤液 250 μ L每孔洗3次，每次需拍干。
11. 最后一次洗涤，清空各微孔，在干净的无尘吸水纸上轻巧酶标板数次，以确保没有洗涤液残留。
12. 加5μ L 偶联酶至TA (Total Activity) 孔。
13. 每孔 200μ L显色底物溶液，于室温静置5~30分钟。(显色底物A和B需在临用前15分钟内等体积混合，并避光放置)
14. 每孔加入50μ L终止液。终止后立即读数。
15. 清除酶标仪Blank(空白)孔值，读取450nm处的光密度值，在570nm至590nm之间最好有修正。如果酶标仪不能自动清除Blank(空白)孔值，那么手动扣除每个读数的Blank(空白)孔光密度值。

## 操作流程

Well I.D.	Blank	TA	NSB	Bo	Stds	Samples
Neutralizing Reagent	---	---	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
0.1 M HCl	---	---	100 μ L	100 μ L	---	---
Std. and/or Sample	---	---	---	---	100 μ L	100 μ L
1x Assay Buffer			50 μ L			
Conjugate	---	---	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
Antibody	---	---	---	50 μ L	50 μ L	50 μ L
Incub.2 hours@ RT,shaking						
Asp. & Wash 3@ 250 μ L						
Conjugate	---	5 μ L	---	---	---	---
Substrate	200 μ L					
Incub.1 hour @ RT						
Stop Solution	50 μ L					



A1 Bo	A2 Bo	A3 Blank	A4 Blank	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1 Std 1	B2 Std 1	B3 TA	B4 TA	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
c1 Std 2	c2 Std 2	c3 NSB	c4 NSB	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11	c12
D1 Std 3	D2 Std 3	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1 Std 4	E2 Std 4	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1 Std 5	F2 Std 5	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1 Std 6	G2 Std 6	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1 Std 7	H2 Std 7	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

## 结果判断

样品中cGMP浓度有多种计算方法。X轴表示cGMP标准品浓度，Y轴表示净光密度的平均值或者百分比值。

### 样品和标准品的净光密度(OD)平均值的计算：

净OD平均值 = OD平均值 - NSB孔OD平均值

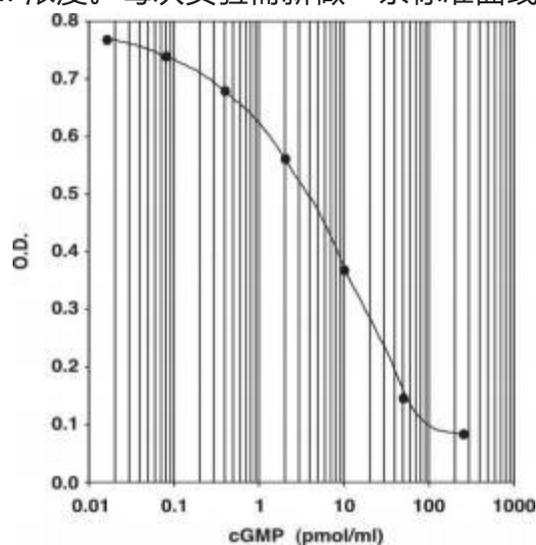
### 计算不同梯度浓度标准品的结合率占最大结合率(B0孔)的百分比，计算公式如下：

百分比值 = (净OD平均值 / B0孔OD平均值) × 100

绘制净OD平均值或百分比值对cGMP标准品浓度的Logit-Log曲线。通过插值即可得到样品中cGMP浓度。

## 标准曲线

下面的曲线不能用于计算cGMP浓度。每次实验需新做一条标准曲线。





## 灵敏度

通过比较10个B0孔平均光密度值(OD)和10个#6管标准品的平均光密度值，计算出灵敏度。cGMP浓度的检测极限通过标准曲线上0位置的两个标准偏差来测定。

Non- Acetylated Version	
Mean OD for Bo =	0.847 ± 0.0103
Mean OD for Standard #6 =	0.729 ± 0.0013
Delta Optical Density =	0.118
2 SD's of the Zero Standard =	0.0206
Sensitivity	$\frac{0.0206}{0.118} \times 0.08 \text{ pmol/mL} = 14 \text{ fmol/mL}$

## 线性关系

cGMP浓度为16.0pmol/mL的样品，用0.1M HCl进行连续七次1:2梯度稀释。将实际的cGMP浓度和测定的cGMP浓度绘制图表。该直线的斜率为1.000，相关系数为0.999。

## 交叉反应

部分相关化合物的交叉反应由竞争ELISA测定。将可能的交叉反应物溶解到试剂盒分析缓冲液中，浓度从500 pmol/mL至500,000 pmol/mL。将这些样品用该试剂盒测定，实测cGMP浓度以50%B/-Bo进行计算。交叉反应的%通过比较检测到的交叉反应物浓度和实际的反应物浓度得到，并以百分比的形式表示。

Compound	Cross Reactivity
■AMP	100%
AMP	<0.0001%
ATP	<0.0001%
cGMP	<0.0001%
GMP	<0.0001%
GTP	<0.0001%
cUMP	<0.0001%
CTP	<0.0001%



## 部分高分文献引用:

1. Genetic ablation of solute carrier family 7a3a leads to hepatic steatosis in zebrafish during fasting  
期刊: Hepatology 影响因子: 17.425 货号: 80103 种属: Mouse
2. Role of sulfhydryl-dependent dimerization of soluble guanylyl cyclase in relaxation of porcine coronary artery to nitric oxid  
期刊: Cardiovascular Research 影响因子: 10.787 货号: 80103 种属: pig
3. Improvement of vascular function by magnetic nanoparticle-assisted circumferential gene transfer into the native endothelium  
期刊: Journal Of Controlled Release 影响因子: 9.776 货号: 80103 种属: Mouse
4. Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4  
期刊: British Journal Of Pharmacology 影响因子: 8.739 货号: 80103 种属: Rat
5. Identification of a novel microRNA important for melanogenesis in alpaca (*Vicugna pacos*)  
期刊: Journal Of Animal Science 影响因子: 3.159 货号: 80103 种属: Alpaca
6. Molt-inhibiting hormone from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*): Cloning, tissue expression and effects of recombinant peptide on ecdysteroid secretion of YOs  
期刊: General And Comparative Endocrinology 影响因子: 2.822 货号: 80103 种属: Crab
7. N-octanoylated ghrelin peptide inhibits bovine oocyte meiotic resumption  
期刊: General And Comparative Endocrinology 影响因子: 2.822 货号: 80103 种属: bovine
8. Characterization and expression of soluble guanylate cyclase in skins and melanocytes of sheep  
期刊: Acta Histochemica 影响因子: 2.107 货号: 80103 种属: sheep