

## 环磷酸腺苷 (cAMP) ELISA KIT

英文名称: cAMP ELISA Detection Kit

规 格: 96T

货 号: NL27203

### 尊敬的客户:

感谢您选用本公司 ELISA 系列产品。本产品选用世界著名生产厂家的原料,采用专业体外诊断试剂生产技术制造, 仅供科研使用。该试剂盒用于体外定量检测血清,血浆,组织匀浆,细胞裂解液,细胞培养上清或其他相关生物液体中天然cAMP浓度。具体适用样本请咨询。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分如有疑问, 请咨询:武汉纽莱生物科技有限公司 Email:sale@newlif.com.cn 电话: 18674031376

本试剂盒仅供体外研究使用, 不用于临床诊断。

## 产品说明

cAMP 是小分子的环状核苷酸，以微量存在于动植物细胞和微生物中，被称其为细胞内的第二信使（激素为第一信使）cAMP 由腺苷酸环化酶产生，被磷酸二酯酶降解，因此激活腺苷酸环化酶或者抑制磷酸二酯酶，可以提高细胞内 cAMP 的含量。研究发现，cAMP 特异性磷酸二酯酶的抑制剂可用于人类疾病的治疗。如：增强  $\beta$  肾上腺素能受体已被用于心率失调、高血压、心肌梗死等心脏疾病；cAMP 特异性磷酸二酯酶2/4的抑制剂正在进行认知增强方面的临床测试。细胞内cAMP的定量测定也可用于评价药物对腺苷酸环化酶激活或抑制作用的效价。cAMP 分子量只有329.21。所以cAMP的定量分析多采用竞争结合法，且cAMP在机体内的含量极低，为 pmol/L 级别，所以一种灵敏度高，特异性强。重复性高的 cAMP ELISA 检测试剂盒是广大科研工作者，最理想的选择。

我们公司开发了一种基于鼠单克隆抗体的 cAMP ELISA 检测试剂盒。该单克隆抗体对cAMP的 特异性比cAMP、ATP等类似的小分子高出108 倍以上。相较于其他的多克隆抗体cAMP试剂盒，我公司的 cAMP 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。

## 研究背景

cAMP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。它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以及激Epac(通过cAMP直接激活 蛋白交换)(3-6)来调节生理过程。通过腺苷酸环化酶可以实现ATP转化为cAMP。哺乳动物体内的主要腺苷酸环化酶家族均是横跨膜的，具有9个亚型，且可通过G蛋白Gs或钙离子/钙调素(1)激活。另外，还有一种可溶性的腺苷酸环化酶，可以通过碳酸盐或Ca<sup>2+</sup>调节(7)。

## 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。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cAMP 与固定数量的标记辣根过氧化物酶的 cAMP 竞争性的结合抗 cAMP 单克隆抗体，采用已知浓度的 cAMP 标准品来做标准曲线。用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值，cAMP 浓度与 OD450值之间呈反比，通过绘制标准曲线计算出样品中 cAMP 的浓度。

**基本性能:**

性能	
灵敏度	21.2fmol/ml
检测范围	0.08pmol/ml-250pmol/ml
特异性	可检测样本中cAMP (环磷酸腺苷) 的含量。且与其他类似物无明显交叉反应。
重复性	板内，板间变异系数均《 10%

**试剂盒组成及保存:**

中文名称	规格	开封后保存条件
ELISA 酶标板 Goat anti-Mouse IgG Coated plate of 96 wells	96T: 8 孔×12 条 48T: 8 孔×6 条	2-8°C 90天
Assay Buffer A	96T: 6mlx1 48T: 3mlx1	2-8°C 90天
0.1M HCl	96T: 30mlx1 48T: 15mlx1	2-8°C 90天
cAMP 标准品 cAMP Standard	96T: 1x0.1ml 48T: 1X0.05ml (5000pmol/ml)	-80°C 180天
浓缩cAMP 鼠单抗 (1000x) Anti- cAMP monoclonal antibody (1000 X)	96T: 1x6ul 48T: 1x3ul	-80°C 180天
浓缩 cAMP-HRP (1000x) HRP conjugated with cGMP (1000x)	96T: 1x6ul 48T: 1x3ul	-80°C 180天
显示液A substrate A	96T:1x12ml 48T:1x6ml	2-8°C(避光) 90天
显示液B substrate B	96T:1x12ml 48T:1x6ml	2-8°C 180天 90天
终止液 stop solution	96T: 1x6ml 48T: 1x3ml	2-8°C 180天 90天
说明书	1份	
封板覆膜 Plate Sealer	2张	

## 试剂盒所需自备物品

1. 酶标仪(450nm波长滤光片)
2. 高精度移液器，EP管及一次性吸头：0.5-10 $\mu$ L, 2-20 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 200-1000 $\mu$ L
3. 双蒸水或去离子水
4. 吸水纸
5. 加样槽

## 样品收集方法 (具体处理方法请咨询)

1. **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织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。
2. **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。
3. **尿液，血液和培养液：** 每1ml样品中加入1.2ml (0.1Mol) 盐酸混匀后，室温离心5min (600 g) 留上清，用于试剂盒检测。因为，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，能更加精准的检测样本中cGMP的浓度。

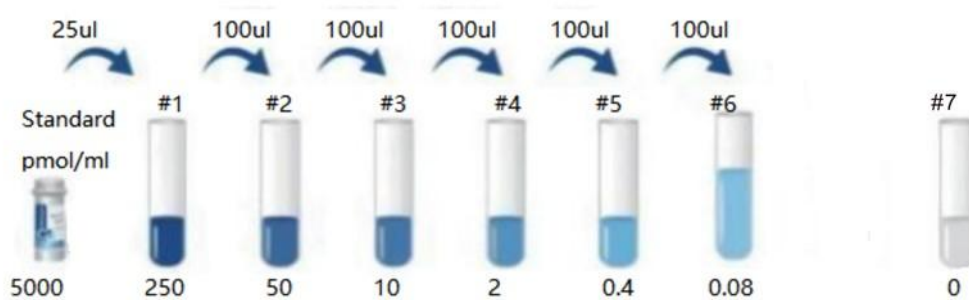
**备注：** 我公司的试剂盒，适用于检测经过盐酸处理的样品，因内源性磷酸二酯酶具有水解细胞内第二信使 cAMP 浓度而用0.1M盐酸处理样本可以终止内源性磷酸二酯酶的活性能更加精准的检测样本中cAMP的水平。

## 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。

## 检测前准备工作

1. 提前30分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温(18-25°C)。如果试剂盒需分多次使用，请仅取出本次实验所需的酶标板条和试剂，剩余板条和试剂需按照指定条件保存。
2. **1× Assay Buffer:** 将15 mL 10× 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. **cAMP 标准品工作液:** 将5000 pmol/mL cAMP标准品溶液平衡至室温。然后根据需要进行倍比稀释。倍比稀释方法：从#1至#7标记七只洁净试管。移取475μ L 0.1M HCl到#1号试管，400μ L到#2至#7号试管。加入25μ L 5000 pmol/mL cAMP标准品到#1管中混匀配置成250pmol/ml的标准品工作液。从#1管中取出100μ L溶液至#2管中，混匀。以此类推，重复上步操作，梯度稀释至#6管。经以上操作，#1至#6管中cAMP标准品浓度分别为250, 50, 10, 2, 0.4和0.08 pmol/mL (详见下图)。提示：最后一管#7直接作为BO孔(0 pmol/mL cAMP标准品)。，不需要再从#6管中吸取液体。稀释过的标准品需在30分钟内使用。



4. **cAMP-HRP Conjugate工作液:** 实验前计算当次实验所需用量 (以50ul/孔计算)，实际配置时应多配置100-200ul. 使用15分钟，用配好的1× Assay Buffer,将cAMP-HRP Conjugate (1000×) 稀释成1×工作浓度。当日使用。
5. **Anti-cAMP Monoclonal Antibody工作液:** 实验前计算当次实验所需用量 (以50ul/孔计算)，实际配置时应多配置100-200ul.使用前15分钟，用配好的1× Assay Buffer,将 Anti-cAMP Monoclonal Antibody (1000×) 稀释成1×工作浓度当日使用。

## 实验步骤

1. 分别设定 标准孔, BO孔 (0 pmol/mL cAMP标准品), Blank孔 (空白孔) 样品孔, 建议全部设立复孔 (参照下图2) 待测样品孔, 可视实际需要, 酌情考虑。
2. 移取50 $\mu$  L Assay Buffer A至各个微孔中, 除Blank(空白)孔外。
3. 移取100 $\mu$  L 0.1M HCl至BO孔(0 pmol/mL cAMP标准品)。
4. 移取100 $\mu$  L 倍比稀释的cAMP标准品至相应的各标准孔。
5. 移取100 $\mu$  L样品至相应的各样品孔。
6. 移取50 $\mu$  L 偶联酶至各孔中, 除了Blank(空白)孔。
7. 移取50 $\mu$  L 抗体工作液至各孔中, 除了Blank(空白)孔。
8. 给酶标板覆膜, 室温孵育1小时。提示: 加样时将样品加于酶标板底部, 尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀, 避免产生气泡。加样时间宜控制10分钟。
9. 在吸水纸上拍干微孔内溶液, 加1x Assay Buffer 250 $\mu$  L每孔洗3次, 每次需拍干。
10. 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。
11. 每孔 200 $\mu$  L显色底物溶液, 于室温避光孵育10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)  
提示: 根据实际显色情况酌情缩短或延长, 但不可超过30分钟。当标准孔出现明显梯度时(前4个显色孔出现明显蓝色梯度), 即可终止。提前15分钟打开酶标仪预热。
12. 每孔加入50 $\mu$  L终止液。终止反应。
13. 立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度(OD值)。

## 操作流程

操作步骤	Blank 孔	BO 孔	Stds	Samples
Assay Buffer A	----	50ul	50ul	50ul
0.1Mol Hcl	----	100ul	----	----
Stds/Samples(标准品/样品)	----	----	100ul	100ul
cAMP-HRP Conjugate 工作液	----	50ul	50ul	50ul
Anti-cAMP Monoclonal Antibody 工作液	----	50ul	50ul	50ul
室温孵育 1 小时				
1x Assay Buffer 250ul 每孔洗 3 次				
显色液	200ul	200ul	200ul	200ul
室温显色 10 分钟				
终止液(stop solution)	50ul	50ul	50ul	50ul

图一



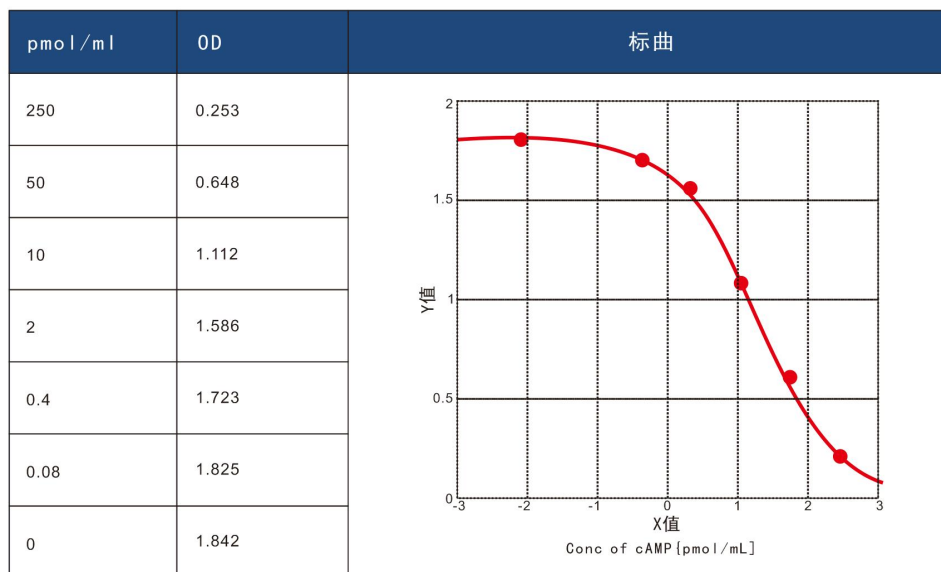
A1 Blank	A2 Blank	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
B1 Std 1	B2 Std 1	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11
c1 Std 2	c2 Std 2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11
D1 Std 3	D2 Std 3	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11
E1 Std 4	E2 Std 4	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11
F1 Std 5	F2 Std 5	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
G1 Std 6	G2 Std 6	G3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

图2

### 结果判断

1. ELISA的样本通常要设置1~2个复孔进行检测，分别求出标准品、实验组样本的吸光度的平均值。单个样本的检测值不应超出平均值的20%
2. 用软件ELISA Calc 的logistic 曲线拟合2（四参数）建立标准曲线（X轴上为标准品浓度，Y轴为对应的OD值）
3. 若样品OD值低于标准曲线下限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

### 典型数据



## 试剂盒性能分析

### 1. 稀释线性/稀释回收率

已测好浓度的样本，用盐酸按照1：2进行六个梯度稀释，稀释后的样本与未稀释的样本均在试剂盒的检测范围内。用未稀释样本测定的浓度，与稀释样本的测定的浓度，用软件ELISA Calc的logistic 曲线拟合2（四参数）建立标准曲线（X轴上为标准品浓度，Y轴为对应的OD值） $R^2 \geq 0.99$  稀释回收率均在80%-120% 之间。

$$\text{稀释回收率(\%)} = \frac{\text{各稀释样品实际浓度}}{\text{最小稀释倍数样品实际浓度}} \times 100$$

### 2. 板内精密度

同一实验人员在同一实验室，用低浓度样本，中浓度样本和高浓度样本，分别在1块板子上检测20次，样本浓度变异系数(CV) < 10%。

### 3. 板间精密度

几名实验人员在同一实验室，用低浓度样本，中浓度样本和高浓度样本，分别在不同板子上检测20次，样本浓度变异系数(CV) < 10%。

4. 特异性：多种具有相似结构的化合物在实验中被测定，用来评估其交叉反应，多种具有相似结构的化合物的浓度在实验中被测定，可以计算出以下交叉反应。

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

5. 灵敏度：测定10个 BO孔（OPmol/ml cAMP标准品），计算出均值X 和标准差（sd），均值加或者减2倍标准差的值所对应的浓度，即为该试剂盒的灵敏度。