



环腺苷酸（cAMP）ELISA 检测试剂盒

货号: BK0202

批号: 11A601

保质期: 6 个月

背景介绍

cAMP 和 cGMP 都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（或 cGMP）由腺苷酸（或鸟苷酸）环化酶产生，被磷酸二酯酶降解，因此激活腺苷酸（或鸟苷酸）环化酶或者抑制磷酸二酯酶，可以提高细胞内 cAMP（或 cGMP）的含量。研究发现，cAMP（或 cGMP）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β肾上腺素能受体（cAMP 的封闭剂）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；而 cGMP 特异性磷酸二酯酶类型5可用于治疗 ED 等疾病。

在五十年研究历程中，从开始研究 cAMP，cGMP 在各种生理过程中的调节作用，到近几年与之相关的药物研发，药物筛选领域，人们一直在努力寻找一种快速、灵敏、特异性和可重复地定量检测 cAMP 和 cGMP 含量的方法。

cAMP，cGMP 分子量分别只有329.21和345.21，在机体内的含量极低，为 pmol/L 级别，用一般的分析方法无法测定。70年代一系列测定 cAMP 和 cGMP 的方法被发明出来，最基本的原理有三种：分别是竞争性蛋白质结合分析法、放射性免疫分析法和薄层色谱法。

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。检测450nm 波长下的 OD 值，吸光度 OD 值与样品中 cAMP 的浓度呈反比关系。基于 cAMP 标准品所得曲线，通过测得的 OD 值可以计算出样品中 cAMP 的浓度，本试剂盒 IC₅₀(50% B/B₀)约12pmol/mL，检测限约0.15 pmol/mL。

组成成分	产品编号	保存
1. cAMP Standard 10000 pmol/mL cAMP, 1x0.1mL	Bk011	-80°C
2. cAMP-HRP 1000x stock of HRP conjugated with cAMP, 1x0.02mL	Bk012	-80°C
3. cAMP Antibody Anti-cAMP monoclonal antibody (1000X stock), 1x0.02mL	Bk013	-80°C
4. 10x Assay Buffer phosphate buffer with preservative, 1x30mL	Bk004	2-8°C
5. Neutralizing Reagent tris buffered saline with preservative, 1x8mL	Bk005	2-8°C
6. Sample Diluent 0.1M HCl, only required for extraction of samples and diluting standard, 1x30mL	Bk006	2-8°C
7. TMB Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, 1x18mL	Bk007	2-8°C
8. Stop Solution 2M sulphuric acid, 1x8mL	Bk008	2-8°C
9. Goat anti-Mouse IgG Coated plate of 96 wells 12x8 well strips in a bag with desiccant	Bk009	2-8°C

所需材料

酶标仪（检测波长450 nm，参比波长630nm）
各种型号加样枪和枪头
EP 管
微孔板振荡器
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 5% 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。

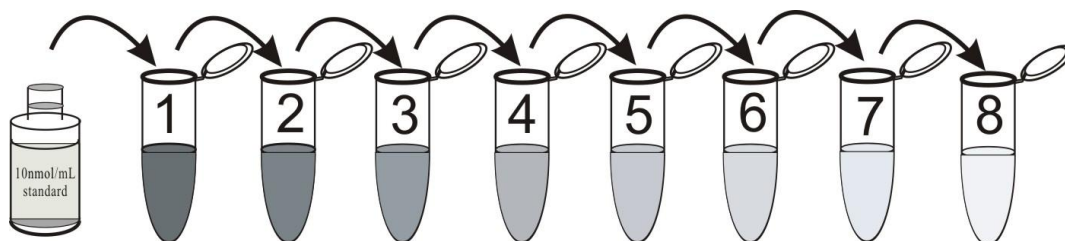
注意事项

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. cAMP 标准品溶液配制

取 8 个新 EP 管，分别标记 1-8#。在 1#管中加入 980 μ L 0.1M HCl，2-8#管中分别加入 500 μ L 0.1M HCl。加入 20 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 cAMP 浓度分别是 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56pmol/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 ）（30 mL）加入 270 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. “cAMP-HRP Conjugate 工作液”的准备

用配好的 Assay Buffer 按 1:1000 将 cAMP-HRP Conjugate (1000×) 稀释至工作液, 此工作液再稀释 20 倍作为 TA 孔的 HRP 结合物工作液。

4. “Anti-cAMP McAb 工作液”的准备

用配好的 Assay Buffer 按 1:1000 将 Anti-cAMP McAb (1000×) 稀释至工作液。

实验步骤

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 cAMP-HRP Conjugate 工作液至各孔中 (TA 和空白孔不加)。
7. 取 50 μ L Anti-cAMP monoclonal antibody 至各孔中 (TA、空白和 NSB 孔不加)。
8. 室温孵育 2 h。
9. 倒空, 用 Assay Buffer 工作液洗 4 遍, 每次倒干净残余液体。
10. 加入 5 μ L cAMP-HRP Conjugate 工作液至 TA 孔中。
11. 取 150 μ L TMB Substrate 至各孔中, 室温静置 10min 左右。
12. 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	cAMP-HRP Conjugate	Anti-cAMP McAb	Assay Buffer
Blank	-	-	-	-	-	-
TA	-	-	-	5 μ L	-	-
NSB	50 μ L	50 μ L	-	50 μ L	-	50 μ L
B0	50 μ L	50 μ L	-	50 μ L	50 μ L	-
Standard /Sample	50 μ L	-	50 μ L	50 μ L	50 μ L	-

	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

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：

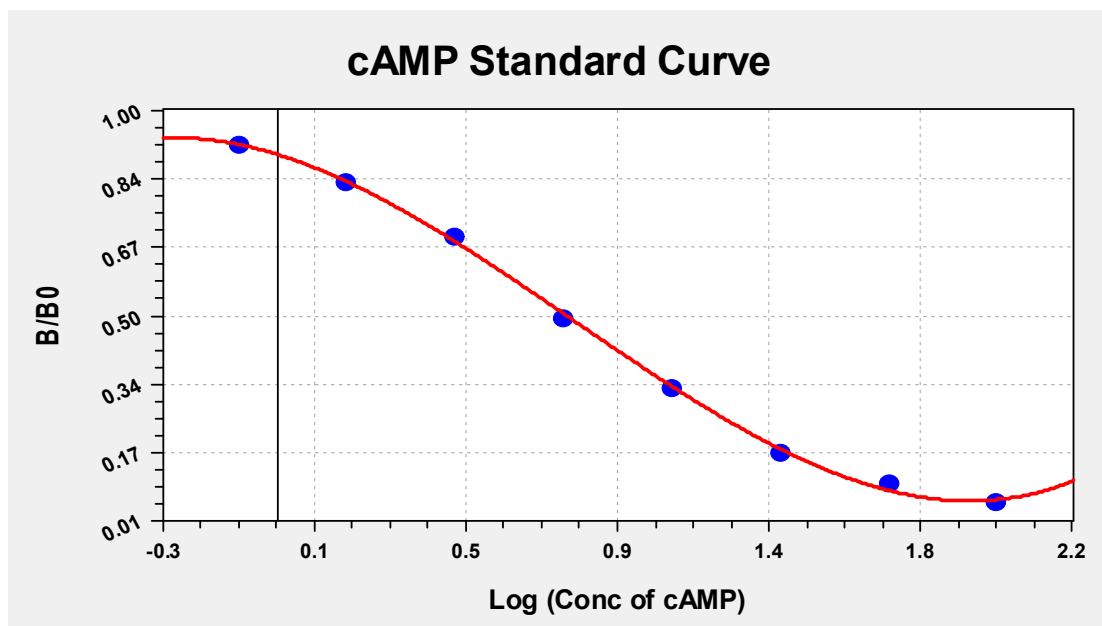
净 OD 平均值=OD 平均值-NSB 孔 OD 平均值

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：

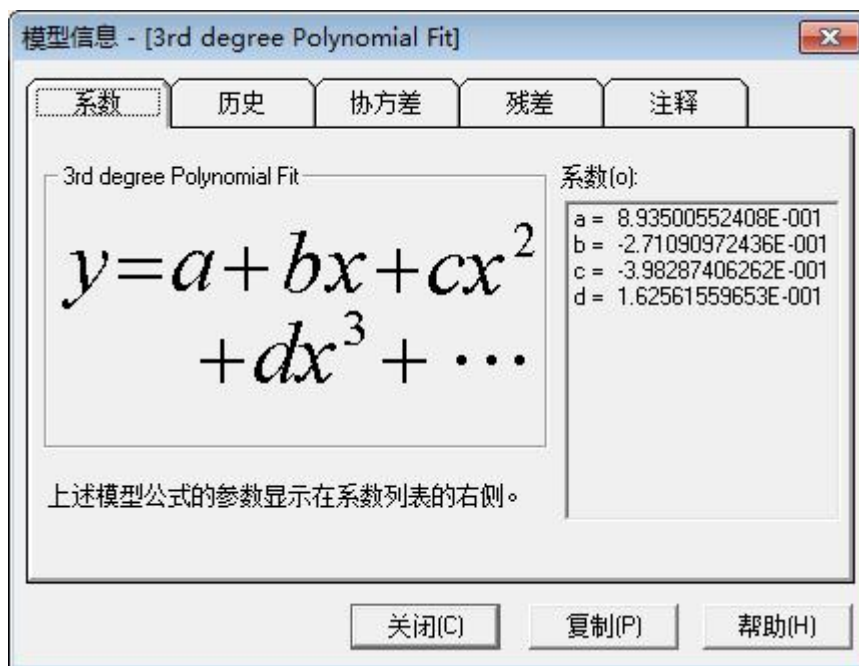
结合率（B/B0）=（净 OD 平均值/B0 孔 OD 平均值）×100

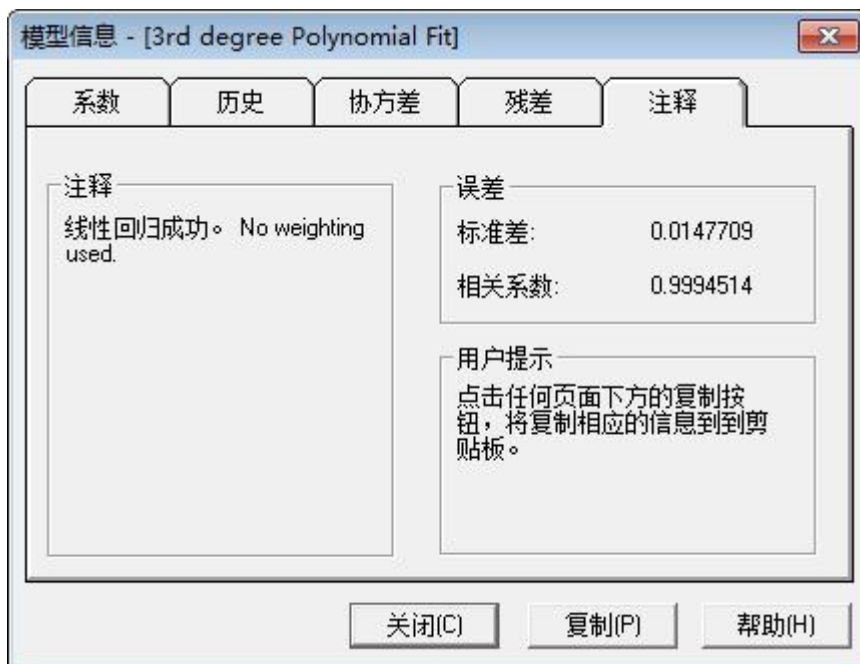
3. 用软件（如 Curve Expert 或 ELISA Calc）进行结合率（或净 OD 平均值）对 Log（cGMP 标准品浓度）的三次多项式回归曲线拟合（three order polynomial linear regression curve）或指数 Logistic 曲线拟合。

4. 通过样品的结合率即可计算出样品中 cAMP 浓度。



注：每次实验需重新制作标准曲线





注：通常相关系数 R 值大于 0.99

交叉反应

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