

## 小鼠环磷酸鸟苷（cGMP）ELISA 试剂盒使用说明书

本试剂仅供科研使用，不得用于医学诊断

### 实验目的：

本试剂盒用于测定小鼠血清、血浆、组织匀浆及相关液体样本中环磷酸鸟苷（cGMP）的含量。

### 实验原理：

本试剂盒应用于双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被环磷酸鸟苷（cGMP）抗体的包被微孔中，依次加入标本、标准品、HRP 标记的检测抗体，经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色，TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的环磷酸鸟苷（cGMP）呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

### 试剂盒组成：

试剂盒组成	48 孔配置	96 孔配置	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片	2 片	
密封袋	1 个	1 个	
酶标包被板	12 孔×4 条	12 孔×8 条	2-8℃ 保存
标准品	0.3ml×6 管	0.3ml×6 管	2-8℃ 保存
酶标试剂	5 ml×1 瓶	10 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
样品稀释液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 A 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 B 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
终止液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
20×浓缩洗涤液	15ml×1 瓶	25ml×1 瓶	2-8℃ 保存

注：标准品浓度依次为：0、3、6、12、24、48 nmol/L

### 需自备的试剂和器材：

1. 酶标仪（450nm）
2. 高精度加样器及枪头：0.5-10uL、2-20uL、20-200uL、200-1000uL
3. 37℃ 恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

### 样本处理及要求：

1. 血清：室温血液自然凝固 10-20 分钟，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如出现沉淀，应再次离心。

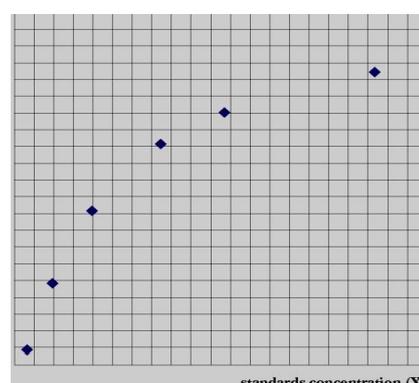
2. 血浆：应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂，混合 10-20 分钟后，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应该再次离心。
  3. 尿液：用无菌管收集，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。
  4. 细胞培养上清：检测分泌性的成份时，用无菌管收集。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用 PBS (PH7.2-7.4) 稀释细胞悬液，细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过反复冻融，以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。
  5. 组织标本：切割标本后，称取重量。加入一定量的 PBS，PH7.4。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8℃ 的温度。加入一定量的 PBS (PH7.4)，用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。分装后一份待检测，其余冷冻备用。
  6. 标本采集后尽早进行提取，提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验，可将标本放于 -20℃ 保存，但应避免反复冻融。不能检测含 NaN<sub>3</sub> 的样品，因 NaN<sub>3</sub> 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。
- 注：标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

### 操作步骤：

1. 从室温平衡 20min 后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回 4℃。
2. 标准品的加样：设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL。
3. 加样：在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL，然后再加待测样品 10 μL（样品最终稀释度为 5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。
4. 加酶：除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100 μL。用封板膜封住反应孔，37℃ 水浴锅或恒温箱温育 60min。
5. 温育：用封板膜封住反应孔，37℃ 水浴锅或恒温箱温育 60 分钟。
6. 配液：将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用，即 1 份的 20× 洗涤缓冲液加 19 份的蒸馏水。
7. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 1 分钟，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复 5 次（也可用洗板机洗板）。
7. 显色：每孔先加入显色剂 A 50 μL，再加入显色剂 B 50 μL，轻轻震荡混匀，37℃ 避光显色 15 分钟。
8. 终止：每孔加终止液 50 μL，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
9. 测定：以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

### 计算：

以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准品的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。



（此图仅供参考）

### 注意事项:

1. 浓缩洗涤液可能会有结晶析出, 稀释时可在水浴中加温助溶, 洗涤时不影响结果。
2. 各步加样均应使用加样器, 并经常校对其准确性, 以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内, 如标本数量多, 推荐使用排枪加样, 所有液体组分, 使用前充分摇匀。
3. 请每次测定的同时做标准曲线, 最好做复孔。如标本中待测物质含量过高 (样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值), 请先用样品稀释液稀释一定倍数 (n 倍) 后再测定, 计算时请最后乘以总稀释倍数 ( $\times n \times 5$ )。
4. 封板膜只限一次性使用, 以避免交叉污染, 底物请避光保存。
5. 严格按照说明书的操作进行, 试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
6. 所有样品, 洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
7. 本公司只对试剂盒本身负责, 不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责, 请使用者使用前充分考虑到样本的可能使用量, 预留充足的样本。
8. 若样本为细胞培养上清, 因该类样本干扰因素较多, 如: 细胞状态、细胞数量、采样时间等, 所以可能存在检测不出的情况。

### 试剂盒性能:

1. 样品线性回归与预期浓度相关系数 R 值为 0.990 以上。
2. 批内变异系数与批间变异系数应分别小于 10% 和 15%。
3. 检测范围: 1.5 nmol/L - 48 nmol/L
4. 最低检测浓度小于 0.1 nmol/L
5. 特异性: 不与其它可溶性结构类似物交叉反应。
6. 重复性: 板内、板间变异系数均小于 15%。
7. 贮藏: 2-8°C, 避光防潮保存。
8. 有效期: 6 个月

### 风险说明:

1. 试剂盒仅供研究使用, 不得用于临床实验或人体实验, 否则所产生的一切后果, 由实验者承担, 本公司概不负责。
2. 严格按照说明书操作, 实验者违反说明书操作, 后果由实验者承担。

武汉吉立德生物科技有限公司

官网: [www.giled.cn](http://www.giled.cn)

电话: 400-027-1626

13163358390

QQ : 34636662