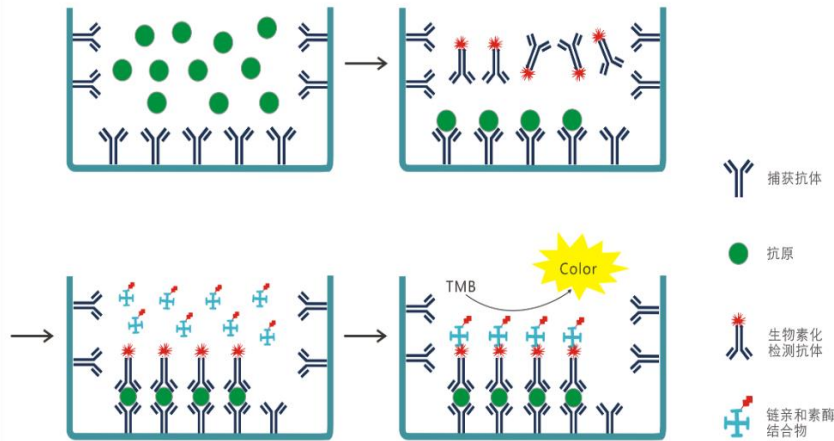


小鼠环磷酸腺苷 (cAMP) ELISA 试剂盒 (91-08-0697)

【检测原理】

试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验 (ELISA)。往预先包被环磷酸腺苷 (cAMP) 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腺苷 (cAMP) 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。



检测原理示意图

【试剂盒组分】

序号	试剂盒组分	48 孔	备注
1	微孔酶标板	12孔×4条	无
2	标准品	0.3mL*6管	无
3	样本稀释液	3mL	无
4	检测抗体-HRP	5mL	无
5	20×洗涤缓冲液	15mL	按说明书进行稀释
6	底物A	3mL	无
7	底物B	3mL	无
8	终止液	3mL	无
9	封板膜	2张	无
10	说明书	1份	无
11	自封袋	1个	无

注: 标准品 (S0-S5) 浓度依次为: 0、0.75、1.5、3、6、12 nmol/ml

【储存条件】

2-8℃，避光防潮保存6个月。

【其他实验材料】（不提供，但可协助购买）：

- 1.酶标仪(450nm)
- 2.高精度可调移液器及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μ l; 一次检测样品较多时，最好用多通道移液器
- 3.自动洗板机或洗瓶
- 4.37℃温箱
- 5.双蒸水或去离子水、吸水纸、量筒

【样本收集处理及保存方法】

- 1.血清：使用不含热原和内毒素的试管，收集血液后，室温凝血30min，1000 \times g离心10min，小心分离血清。
- 2.血浆：用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆，收集后30min内以1000 \times g离心15min去除颗粒。
- 3.细胞上清液：1000 \times g离心10min去除颗粒和聚合物。
- 4.保存：若样品不立即检测，请将其按一次用量分装，-20℃-70℃保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高脂样本。如果血清中含有大量颗粒，检测前先离心或过滤去除；室温下解冻，请勿于37℃或更高的温度加热解冻。
- 5.稀释：可根据实际情况，将标本做适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数)。

【试剂准备】

- 1.提前30min从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
- 2.洗涤缓冲液：从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，这属于正常现象，加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4℃。

【洗板方法】

1. 手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加满洗涤液，静置1min后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干，如此洗板5次。
2. 自动洗板机：每孔注入洗液350 μ L，浸泡1min，洗板5次。

【操作步骤】

1. 从室温平衡30min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. 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 μ L；
3. 样本孔先加待测样本10 μ L，再加样本稀释液40 μ L；空白孔不加。
4. 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 μ L，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育60min。
5. 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板5次

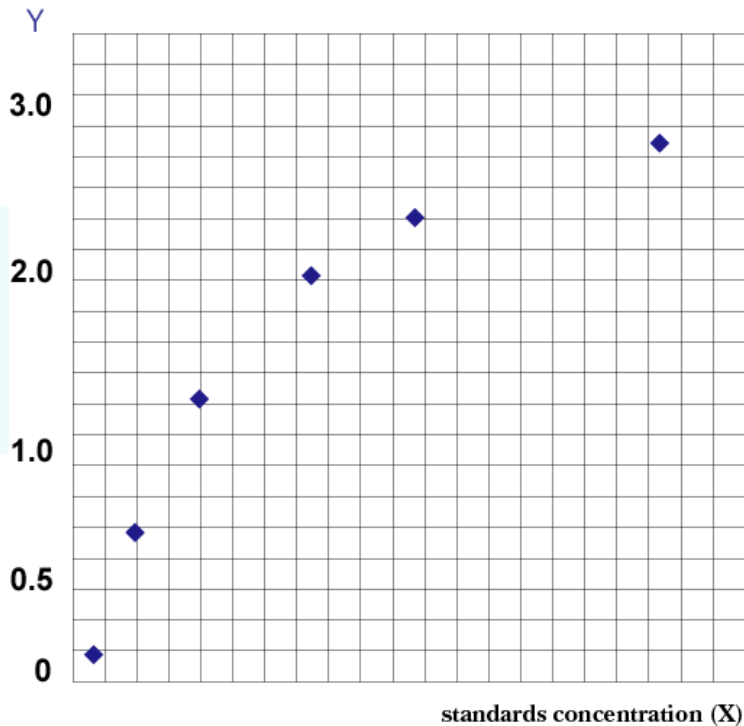
(也可用洗板机洗板)。

6. 每孔加入底物A、B各50 μ L, 37 $^{\circ}$ C避光孵育15min。
7. 每孔加入终止液50 μ L, 15min内, 在450nm波长处测定各孔的OD值。

注: 如用450nm/630nm双波长读数, OD值 = OD450-OD630。

【结果判断】

绘制标准曲线: 在Excel工作表中, 以标准品浓度作横坐标, 对应OD值作纵坐标, 绘制出标准品线性回归曲线, 按曲线方程计算各样本浓度值。



本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

【结果重复性】

板间, 板内变异系数均 $<$ 15%。

【灵敏度】

最低检测浓度小于0.1nmol/ml。最低检出量测定方法: 20个零标准的平均OD值增加两个标准差, 再计算相应的浓度。

【特异性】

不与其它可溶性结构类似物交叉反应。

【准确性】

标准品线性回归与预期浓度相关系数R值, 大于等于0.9900。

【注意事项】

1. 试剂盒保存在2-8℃，使用前室温平衡30分钟。从冰箱取出的浓缩洗涤液会有结晶，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解后再使用。
2. 实验中不用的板条应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。
3. 浓度为0的S0号标准品即可视为阴性对照或者空白；按照说明书操作时样本已经稀释5倍，最终结果乘以5才是样本实际浓度。
4. 严格按照说明书中标明的时间、加液量及顺序进行温育操作。
5. 所有液体组分使用前充分摇匀。
6. 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔，加入试剂的顺序应一致，以保证所有反应孔孵育的时间一样。
7. 避免操作过程中酶标板干燥，干燥会使酶标板上生物成分迅速失活，影响实验结果。

【操作要点提示】

1. 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
2. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

