



## 环二鸟苷酸(c-di-GMP)ELISA 试剂盒 使用手册

产品编号: HB865-QT

使用前请仔细阅读本手册。如果有任何问题,请联系我们,我们会给你提供专业的技术服务。

### 【产品名称】

中文名称: 环二鸟苷酸(c-di-GMP)酶联免疫试剂盒

### 【包装规格】

96T/盒

### 【预期用途】

仅供科研使用, 本试剂盒用于测定微生物样本中环二鸟苷酸(c-di-GMP)含量。

### 【检测原理】

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中环二鸟苷酸(c-di-GMP)水平。用纯化的环二鸟苷酸(c-di-GMP)抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 往包被单抗的微孔中依次加入环二鸟苷酸(c-di-GMP), 再与 HRP 标记的环二鸟苷酸(c-di-GMP)抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 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二鸟苷酸(c-di-GMP)呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD 值), 通过标准曲线计算样品中环二鸟苷酸(c-di-GMP)浓度。



## 【产品性能】

### 1、物理性能

试剂盒的各液体组分应澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气(如有漏气，不影响使用)。

### 2、剂量反应曲线线性

标准品剂量反应曲线相关系数  $r$  值，大于等于 0.9900。

### 3、检测范围

1.2pg/ml– 50pg/ml。

### 4、灵敏度

最低检出剂量小于 0.3 pg/ml。

### 5、精密度

精密度用样品测定值的变异系数 CV 表示。 $CV(\%) = SD/mean \times 100$

批内差：取同批次试剂盒对低、中、高值定值样本进行定量检测，每份样本连续测定 20 次，分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值。

批间差：选取 3 个不同批次的试剂盒分别对低、中、高值定值样本进行定量测定，每个样本使用同一试剂盒重复测定 10 次，分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值。

批内差：  $CV < 5.8\%$

批间差：  $CV < 8.7\%$

### 6、回收率

分别往 5 个不同样本中添加已知浓度的目标蛋白，做回收实验，得出回收率范围和平均回收率。

Sample Type	Range (%)	Average Recovery (%)
Tissue Lysates (n=5)	93-100	97
Serum (n=5)	91-104	99
EDTA plasma (n=5)	95-107	102
Cell culture media (n=5)	87-110	101



## 7、线性

分别往 5 个样本中添加已知浓度的目标蛋白，做回收实验，得出回收率范围及平均回收率。将 5 个样本分别稀释 2 倍，4 倍，8 倍，16 倍做回收实验，得出回收率范围及平均回收率。

Sample	1:2	1: 4	1:8	1:16
Tissue Lysates (n=5)	92-105%	84-95%	90-102%	80-93%
Serum (n=5)	82-104%	89-99%	86-97%	83-101%
EDTA plasma (n=5)	85-97%	82-101%	83-97%	82-91%
Cell culture media (n=5)	83-105%	89-105%	81-106%	82-110%

## 8、特异性

本试剂盒识别天然和重组环二鸟苷酸(c-di-GMP)，经检测与其它相似物质无明显交叉反应。由于受到技术及样本来源的限制，不可能完成所有相关或相似物质交叉反应检测，因此本试剂盒有可能与未经检测的其它物质有交叉反应。

## 9、稳定性

经测定，试剂盒在有效期内务必按推荐温度保存，活性降低率小于 5%。为减小外部因素对试剂盒破坏前后检测值的影响，实验室的环境条件需尽量保持一致，尤其是实验室内温度、湿度及温育条件。其次由同一实验员来进行操作可减少人为误差。

### 【试剂盒组成】

序号	中文名称	英文名称	规格
1	30 倍浓缩洗涤液	Wash solution(30X)	20ml×1 瓶
2	酶标试剂	HRP-Conjugate reagent	6ml×1 瓶
3	酶标包被板	Microelisa stripplate	12 孔×8 条
4	样品稀释液	Sample diluent	6ml×1 瓶
5	显色剂 A 液	Chromogen Solution A	6ml×1 瓶
6	显色剂 B 液	Chromogen Solution B	6ml×1/瓶

7	终止液	Stop solution	6ml×1 瓶
8	标准品 (80pg/ml)	Standard	0.5ml×1 瓶
9	标准品稀释液	Standard diluent	1.5ml×1 瓶
10	说明书	Product Description	1 份
11	封板膜	Sealing plate membrane	2 张
12	密封袋	Sealing bag	1 个

**注意：**使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致。

#### **需要但未提供的材料及耗材**

- 1、酶标仪（建议仪器使用前提前预热）
- 2、精密移液器、吸头、加样槽
- 3、蒸馏水或去离子水
- 4、洗瓶或者自动洗板机
- 5、37℃水浴锅或恒温箱
- 6、EP 管
- 7、无粉一次性乳胶手套

#### **【储存条件及有效期】**

- 1、2-8℃保存，切勿冷冻，有效期 6 个月。
- 2、开封使用后，包被微孔板放入带有干燥剂的自封袋中，密闭自封袋，并将全部试剂放回 2-8℃冰箱。

**注意：**试剂盒内酶标条可拆卸，按实验需求可分多次使用；使用后的剩余试剂盒建议在首次实验后 1 个月内使用完毕。产品过期时间以盒子上的标签为准，保质期内所有组分都确保是稳定的。

#### **【适用仪器】**

半自动的酶标仪，如 Thermo MK3，或者国产酶标仪。

#### **【样本要求】**

##### 1. 样本类型和采集



**血清：**将收集于血清分离管的全血标本在室温放置0.5-2小时或4℃过夜，然后1000×g离心20 分钟，取上清即可，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

**血浆：**用EDTA或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的30分钟内于2-8℃ 1000×g离心15分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

**组织匀浆：**用预冷的PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果），称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS（一般按1:9的重量体积比，比如1g的组织样品对应9mL的PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于5000×g离心5~10分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

**细胞裂解液：**吸弃培养液，用 PBS（0.01 M, pH 7.4）将细胞洗一遍。用细胞刮刮下细胞（不能用胰酶和 EDTA 处理），加入 2-5 mL PBS（0.01 M, pH 7.4）。悬浮细胞可省略。收集细胞悬液，4℃ 1000×g 离心 10min，弃去培养基，用预冷的 PBS 润洗 3 次。加入适量的预冷 PBS 或非变性细胞裂解液（临用前加入蛋白酶抑制剂）重悬细胞，通常 6 孔板一个孔的细胞量需要 150-250 μ L PBS 重悬。将样品放入-20℃或-80℃，使样品冷冻，再放室温解冻样品，反复冻融 3 次，使细胞充分裂解，也可将样品进行超声破碎，以达到裂解的目的。4℃ 10000×g 离心 10min，除去细胞碎片，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

**细胞培养物上清或其它生物标本：**请1000×g离心20分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

## 2. 样本保存和稳定性

样本在 2-8℃条件下，可以储存 72h，在- 20℃或-80℃可以储存 6 个月及以上。样本收集后，不是一次检测完，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融。



### 【操作步骤】

1. 标准品的稀释：本试剂盒提供原倍标准品一支，用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。

40pg/ml	5 号标准品	150μl 的原倍标准品加入 150μl 标准品稀释液
20pg/ml	4 号标准品	150μl 的 5 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
10pg/ml	3 号标准品	150μl 的 4 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
5pg/ml	2 号标准品	150μl 的 3 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
2.5pg/ml	1 号标准品	150μl 的 2 号标准品加入 150μl 标准品稀释液



2. 加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 μl，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。
3. 温育：用封板膜封板后置 37℃温育 30 分钟。
4. 配液：将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用。



5. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
6. 加酶：每孔加入酶标试剂 50  $\mu$ l，空白孔除外。
7. 温育：用封板膜封板后置 37℃ 温育 30 分钟。
8. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
9. 显色：每孔先加入显色剂 A50 $\mu$ l，再加入显色剂 B50 $\mu$ l，轻轻震荡混匀，37℃ 避光显色 10-20 分钟。
10. 终止：每孔加终止液 50 $\mu$ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
11. 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。

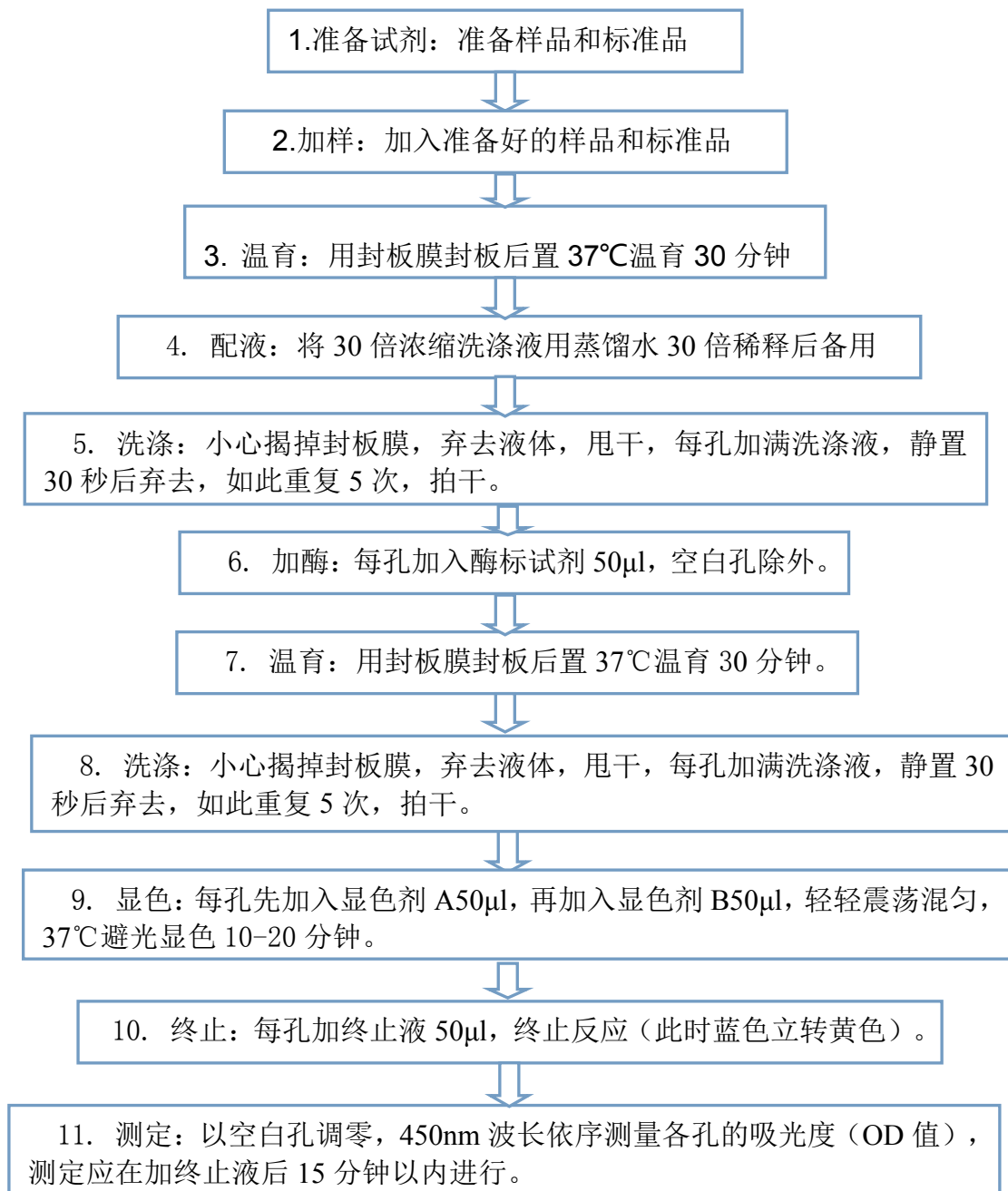
**注意：**

1. 试剂准备：试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用。准备一次实验所需要的酶标条，其它的可从微孔板上拆下，密封，按照说明书要求保存，以备下次使用。
2. 加样：实验操作中请使用一次性的灭菌吸头，避免污染。加样时注意不要有气泡产生，将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。与反应试剂加入一样，加样过程中第一个孔与最后一个孔加样时间间隔尽量小（一般控制在 10 分钟以内），如果太大，将会导致不同的“预温育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。为了测值的准确性，推荐设置复孔进行实验。
3. 温育：为防止样品蒸发，实验时请将加上盖或覆膜的酶标板置于湿盒内，以避免液体蒸发，洗板后应尽快进行下步操作，任何时候都应避免酶标板处于干燥状态，同时应严格遵守给定的温育时间和温度。
4. 洗涤：浓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。充分洗涤非常重要，在每次洗涤过程中，都要将洗涤液完全甩干。洗涤过程中反应孔内残留的洗涤液应在吸水纸上拍干，勿将吸水纸直接放入反应孔中吸水，同时要轻轻擦除板底残留的液体和手指印，避免影响最后的酶标仪读数。如果



- 使用自动洗板机，请在熟练使用后再用于正式实验过程中。
5. 反应时间的控制：加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化，如观察到颜色较深，请提前加入终止液终止反应，避免反应过强而影响酶标仪光密度读数。
  6. 底物：底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。

### 【操作程序总结】







### 【注意事项】

1. 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（ $\times n \times 5$ ）。
2. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
3. 为免交叉污染，要避免重复使用手中的吸头和试管。
4. 要严格避免操作过程中酶标板干燥。干燥会使酶标板上生物成份迅速失活。
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. 显色时间供参考，因用户实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同。
7. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
8. 本试剂不同批号组分不得混用。
9. 揭封板膜和覆盖封板膜时应避免用力过大导致液体溅出。

### 【结果计算】

以标准物的浓度为横坐标，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；或用标准物的浓度与 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。



本图仅供参考，应以当次试验标准品绘制的标准曲线计算样本含量



### 【常见问题及解决方法】

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保存实验数据，保留所用板条及未使用试剂，然后 联系我公司技术支持为您解决问题。同时您也可以参考以下资料：

常见问题	可能原因	解决方法
标准曲线梯度差	吸液或加液不准	检查移液器及吸头
	标准品稀释不正确	稀释标准品时稍微旋转瓶身
	洗涤不完全	保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量
显色很弱或无色	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	实验温度不正确	使用推荐的实验温度
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加
	稀释不正确	
	酶标记物失活或底物失效	混合酶结合物和底物，通过迅速显色来检查判断
读数数值低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长及滤光片设置
		提前打开酶标仪预热
变异系数大	加液不正确	检查加液情况
背景值高	酶标板洗涤不完全	保证每步清洗完全；如果用自动洗板机，请检查所有的出口是否有堵塞；是否使用试剂盒配备的洗涤液
	洗液有污染	配制新鲜的洗液
灵敏度低	试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试剂
边缘效应	孵育温度不均衡	孵育时每步均使用新的封板胶纸，避免在环境温度变化大的地方孵育，勿叠放反应板



### 【文献精选】

1. Chronic exposure to low environmental concentrations and legal aquaculture doses of antibiotics cause systemic adverse effects in Nile tilapia and provoke differential human health risk
2. Enhancing methane production of anaerobic sludge digestion by microaeration: Enzyme activity stimulation, semi-continuous reactor validation and microbial community analysis
3. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma
4. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma
5. Smartphone-based rapid quantitative detection of luteinizing hormone using gold immunochromatographic strip
6. Fluoxastrobin-induced effects on acute toxicity, development toxicity, oxidative stress, and DNA damage in *Danio rerio* embryos
7. Chronic restraint stress decreases the repair potential from mesenchymal stem cells on liver injury by inhibiting TGF- $\beta$  1 generation