

cAMP HF 检测试剂盒说明书

(HFcAMP-1K, -20K, -100K)

一. 产品描述

cAMP HF 检测试剂盒利用 TR-FRET 技术（时间分辨荧光共振能量转移）检测 cAMP 的浓度，具有简单易用，灵敏度高，数据可靠的优点。试剂盒主要组分包括标记了荧光供体 Eu 的 cAMP 抗体 (Anti-cAMP-Eu) 和 cAMP 标记的荧光受体 DI (cAMP-DI)。Anti-cAMP-Eu 能够特异性地与 cAMP-DI 结合，这一结合将荧光供体 Eu 和荧光受体 DI 置于可以发生荧光共振能量转移的距离。荧光供体 Eu 在波长 320nm 激发光激发下会发射波长 620nm 的发射光，此 620nm 波长的发射光可以激发临近的荧光受体 DI 发射波长 665nm 的发射光。通过同时检测波长 620nm 和 665nm 的荧光值，可以得到样品的背景荧光（Em 620nm）和实验荧光（Em 665nm）；而延时（时间分辨）的检测方法则去除了短暂发光的不相关荧光的干扰。数据处理采用 Em 665/Em 620 二者的比值 F 则进一步去除了其他干扰因素，例如加样误差，使得数据更加可靠。cAMP HF 检测试剂盒通过竞争法检测 cAMP 的浓度，即在以上实验体系加入外源 cAMP，例如细胞裂解后释放的 cAMP，会和 cAMP-DI 竞争结合 Anti-cAMP-Eu，致使 Anti-cAMP-Eu 和 cAMP-DI 结合减少，实验荧光（Em 665nm）降低，F 值降低，因此样品中 cAMP 的浓度与 F 值成反比，并且通过和 cAMP 标准曲线的比较可以得到样品中 cAMP 的浓度。

二. 产品组成

cAMP HF 检测试剂盒组分和规格如下：

组分	HFcAMP-1K (1 千个检测)	HFcAMP-20K (2 万个检测)	HFcAMP-100K (10 万个检测)
裂解和检测缓冲液	13mL	3x100mL	5x HF-cAmp-20K
刺激缓冲液 (5x)	10mL	100mL	
Anti-cAMP-Eu (100x)	55μL	2x0.55mL	
cAMP-DI (100x)	55μL	2x0.55mL	
cAMP 标准品	0.5mL	2x2mL	

三. 实验步骤

cAMP 作为 GPCR 通路的主要第二信使之一，其测定是 GPCR 机理研究和药物筛选的重要指标。GPCR 药物筛选实验中 cAMP 的检测需根据所筛选化合物的类型(激动剂或拮抗剂)和 GPCR 类型 (Gs 或 Gi) 进行实验参数优化，例如细胞密度，IBMX 浓度，Forskolin 浓度，拮抗剂实验中激动剂的浓度，刺激时间和温度等。以下 cAMP 细胞实验以检测 Gs 调控的 GPCR 通路的 cAMP 浓度为例。

cAMP 标准曲线测定

cAMP 标准曲线测定可以确定 cAMP 在特定实验条件下的线性范围即 IC10-IC90 的浓度区间，据此可以优化实验细胞密度，确保测得的 cAMP 在线性范围内。进行细胞 cAMP 检测时建议在同一细胞检测板内设立 cAMP 标准曲线检测孔。

1. 实验试剂准备：刺激缓冲液为 5x，用超纯水配制为 1x 刺激缓冲液，Anti-cAMP-Eu (100x) 和 cAMP-DI (100x) 为 100x，用裂解和检测缓冲液配制为相应 1x 工作试剂。建议 384 浅孔板的反应体积为 20 μ L，每 20 μ L 体系中各加入 5 μ L Anti-cAMP-Eu 1x 工作试剂和 5 μ L cAMP-DI 1x 工作试剂。
2. 试剂盒 cAMP 标准品浓度为 2,848nM，**用与细胞实验中相同的细胞刺激液**，例如后述细胞实验使用的 1x 刺激缓冲液 (含 0.5mM IBMX) 4 倍稀释，共 7 个浓度，最高浓度为 2,848nM (STD7)，最低浓度为 0.696nM (STD 1)
3. 384 浅孔板每孔加入 5 μ L cAMP 标准品 STD7-STD1，建议复孔
4. 阳性对照和阴性对照孔：每孔加入 5 μ L 1x 刺激缓冲液(含 0.5mM IBMX)，建议复孔
5. 每孔加入 5 μ L 1x 刺激缓冲液 (含 0.5mM IBMX)，振板 10 sec 混匀
6. 除阴性对照孔外每孔加入 5 μ L cAMP-DI， 阴性对照孔加入 5 μ L 裂解和检测缓冲液，振板 10 sec 混匀
7. 每孔加入 5 μ L Anti-cAMP-Eu，振板 10 sec 混匀
8. 室温 (22-25 $^{\circ}$ C) 孵育 1 hr，用 配备 TR-FRET/HTRF 检测模块的酶标仪进行检测， 激发光 Ex 为 320 nm，检测 665 nm 和 620 nm 两个波长的发射光 Em
9. 以 Em 665/Em 620 比值 F 对 cAMP 浓度进行曲线拟合获取 cAMP EC50, EC10, EC90 等参数

细胞 cAMP 检测: 以 Gs 调控的 GPCR 通路的 cAMP 检测为例

1. 实验试剂准备: 见上述 **cAMP 标准曲线测定**
2. 实验细胞制备: 实验细胞离心后弃掉培养基, 用 1x 刺激缓冲液(含 0.5mM IBMX **【注 2】**) 重悬至合适细胞数, 384 浅孔板每孔加 5 μ L 细胞
3. 实验化合物用 1x 刺激缓冲液 (含 0.5mM IBMX) 稀释至合适浓度, 每孔加 5 μ L 于步骤 2 的细胞板实验孔中, 建议复孔
4. 阳性细胞对照孔: 每孔加入 5 μ L 细胞和 5 μ L 适当阳性化合物(例如 Forskolin), 建议复孔,
5. 阴性细胞对照和无刺激细胞对照孔: 每孔加入 5 μ L 细胞和 5 μ L 1x 刺激缓冲液(含 0.5mM IBMX), 建议复孔
6. 根据实验要求对细胞进行适当温度和时间刺激。具体刺激温度和时间需要优化, 一般以 37°C 刺激 30 min 作为初始实验条件
7. 除**阴性细胞对照孔**外加入 5 μ L cAMP-DI, **阴性细胞对照孔**加入 5 μ L 裂解和检测缓冲液, 振板 10 sec 混匀
8. 加入 5 μ L Anti-cAMP-Eu, 振板 10 sec 混匀
9. 室温 (22-25°C) 孵育 1 hr, 用 配备 HTRF 检测模块的酶标仪进行检测, 激发光 (Ex) 为 320 nm, 检测 665 nm 和 620 nm 两个波长的发射光 (Em)
10. 数据处理: 以 Em 665/Em 620 比值 F 对样品浓度进行曲线拟合获取化合物 EC₅₀, EC₁₀, EC₉₀ 等参数。

四. 储存条件

-20°C 及以下避光储存, 有效期 12 个月。

五. 注意事项

- 1 初次使用后 cAMP 标准品, Anti-cAMP-Eu 和 cAMP-DI 应分装 -20°C 保存, 避免反复冻融。裂解和检测缓冲液和刺激缓冲液(5x)可以 -20°C 或 4°C 保存。工作溶液应于 24hr 内使用。
- 2 IBMX 是一种非选择性磷酸二酯酶抑制剂, 可以抑制 cAMP 降解, 使 cAMP 积累到较高水平以满足实验检测的需要。一般使用浓度为 0.5mM。刺激时间超过 2hr 的实验应以细胞培养基 (含 0.5mM IBMX) 替代 1x 刺激缓冲液重悬细胞和稀释化合物。
- 3 本产品仅作科研用途。