

环磷酸鸟苷（cGMP）含量试剂盒说明书

HPLC 法 50 管/48 样

请客户正式实验前做预实验确定样本稀释倍数！注意事项必读！

测定意义：

环磷酸鸟苷（Guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate, cGMP）是一种重要的具有生物活性的环核苷酸类物质，广泛存在于生物体内。cGMP 作为生命信息传递的“第二信使”，不仅参与机体多种酶的代谢过程，对细胞的分裂、分化和发育起着重要的调节作用，而且还可调节基因转录和翻译，影响蛋白质合成。

测定原理：

cGMP 在 254 nm 下有吸收峰，可以利用高效液相色谱法测定其含量。

需自备的实验用品：

高效液相色谱仪、低速离心机、溶剂抽滤装置、氮吹仪、涡旋振荡器、针头式过滤器（水系，50 个，0.22μm）、滤膜（水系和有机系各 1 个，0.45 μm）、C18 柱（耐水，4.6 ×250 mm）、可调式移液器、样品瓶（50 个，2 mL）、内衬管（50 个，放置在样品瓶内用于微量样品进样）、甲醇（色谱级，200 mL）和超纯水。

试剂的组成和配制：

试剂一：粉剂一支，25 °C 保存；

试剂二：液体 60 mL×1 瓶，4 °C 保存；

试剂三：cGMP 标准品 1.0 mg×1 支，-20 °C 保存。

实验前的准备工作：

订购电话：4008-898-798 技术支持：13818158258

1、将超纯水 1000 mL 和甲醇 200 mL 用 0.45 μm 的滤膜抽滤，以除去溶剂中的杂质，防止堵塞色谱柱。（注：超纯水用水系滤膜抽滤，甲醇用有机系滤膜抽滤）。

2、流动相的配制：量取 900 mL 超纯水，加入 1.22 g 试剂一，混匀溶解。将甲醇和加入试剂一的超纯水按照 10: 90 的比例配成流动相，可取 100 mL 甲醇和 900 mL 超纯水混合，混匀。

3、将配好的流动相超声 30 分钟，以脱去溶剂中的气泡，防止堵塞色谱柱。

cGMP 的提取：

组织的处理：取 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一，冰浴匀浆，转移到 1.5 mL 有盖离心管中，涡旋 1 min，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h 并且震荡 3~4 次，8000g 离心 10 min，取上层液体至 1.5 mL 离心管中，氮气吹干，加入 0.2 mL 超纯水，涡旋震荡溶解，用针头式过滤器过滤后待测。

标准品的配制：

在试剂三中加入 1 mL 超纯水，配成 1 mg /mL 母液，将母液用超纯水分别稀释成 200 $\mu\text{g/mL}$ 、150 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 cGMP 标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

cGMP 含量测定操作步骤：

1. 开启电脑、检测器和泵，安装上色谱柱，打开软件，在方法组中设置进样量 10 μL ，流速 0.8 mL/min，柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ，测试时间 45 min，检测波长 254 nm，设置完毕保存方法组。
2. 用流动相过柱子，待基线稳定后开始加样。
3. 加入标准品 10 μL ，在 45 min 内可分离 cGMP，cGMP 的保留时间在 10 min 左右（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的 cGMP 标准品的峰面积。
4. 加入样品 10 μL ，在相应保留时间处检测 cGMP 的峰面积。

cGMP 含量的计算：

以标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标计算 cGMP 标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线, 计算样品 cGMP 含量。

注意事项:

- 1、本试剂盒检测限为 $1 \mu\text{g/mL}$, 若 cGMP 含量低于该浓度需要对样品浓缩, 或选择 cGMP 含量 ELISA 试剂盒进行测定。
- 2、为了避免使用过程中柱压过大, 流速由小到大调节。
- 3、使用完毕时, 先以 20% 甲醇水溶液冲洗色谱柱 1 h, 再用纯甲醇洗色谱柱 30 min。
- 4、标准品的稀释倍数要根据样品中 cGMP 浓度确定, 样品中 cGMP 的峰面积必须落在不同浓度的 cGMP 标准品的峰面积之内, 该标准品稀释倍数只是一个参考。