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 ℃保存；

试剂二：液体60 mL×1瓶，4 ℃保存；

试剂三：cGMP标准品1.0 mg×1支，-20 ℃保存。

实验前的准备工作：

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 ℃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 μg/mL、150μg/mL、100μg /mL、50 μg /mL和10 μg /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 ℃，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（μg/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 ug/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。