

1、检测目的：

本试剂盒用于测定大鼠血清、血浆及相关液体样本中多聚ADP核糖聚合酶-1（PARP-1）活性。

2、实验原理：

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中大鼠多聚ADP核糖聚合酶-1（PARP-1）水平。用纯化的大鼠多聚ADP核糖聚合酶-1（PARP-1）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多聚ADP核糖聚合酶-1（PARP-1），再与HRP标记的多聚ADP核糖聚合酶-1（PARP-1）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多聚ADP核糖聚合酶-1（PARP-1）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大鼠多聚ADP核糖聚合酶-1（PARP-1）活性。

3、试剂盒组成：

| 试剂盒组成 | 48孔配置 | 96孔配置 | 保存 |
|-----------------|------------|------------|--------|
| 说明书 | 1份 | 1份 | |
| 封板膜 | 2片 | 2片 | |
| 密封袋 | 1个 | 1个 | |
| 酶标包被板 | 1×48 | 1×96 | 2-8℃保存 |
| 标准品 (64IU/L) | 0.5ml×1管 | 0.5ml×1管 | 2-8℃保存 |
| 酶标试剂 | 3 ml×1瓶 | 6 ml×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 样品稀释液 | 3 ml×1瓶 | 6 ml×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 标准品稀释液 | 1.5 ml×1瓶 | 1.5 ml×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 显色剂A液 | 3 ml×1瓶 | 6 ml×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 显色剂B液 | 3 ml×1瓶 | 6 ml×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 终止液 | 3 ml×1瓶 | 6 ml×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 浓缩洗涤液 | 20倍20ml×1瓶 | 30倍20ml×1瓶 | 2-8℃保存 |

4、样本处理及要求：

1. 血清：室温血液自然凝固10-20分钟，离心20分钟左右（2000-3000转/分）。仔细收集上清，保存过程中如出现沉淀，应再次离心。
2. 血浆：应根据标本的要求选择EDTA或柠檬酸钠作为抗凝剂，混合10-20分钟后，离心20分钟左右（2000-3000转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应该再次离心。

3. 尿液：用无菌管收集，离心20分钟左右（2000-3000转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。
4. 细胞培养上清：检测分泌性的成份时，用无菌管收集。离心20分钟左右（2000-3000转/分）。仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用PBS（PH7.2-7.4）稀释细胞悬液，细胞浓度达到100万/ml左右。通过反复冻融，以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心20分钟左右（2000-3000转/分）。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。
5. 组织标本：切割标本后，称取重量。加入一定量的PBS，PH7.4。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持2-8℃的温度。加入一定量的PBS（PH7.4），用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心20分钟左右（2000-3000转/分）。仔细收集上清。分装后一份待检测，其余冷冻备用。
6. 标本采集后尽早进行提取，提取按相关文献进行，提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验，可将标本放于-20℃保存，但应避免反复冻融。
7. 不能检测含NaN₃的样品，因NaN₃抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

※注意：血清血浆样本避免使用溶血、高血脂样本，以免影响检测结果；如果样本中的靶标物检测浓度高于标准品的最高值，请将样品做适当倍数稀释后检测，建议正式实验前做预实验以确定稀释倍数。

5、自备实验器材（不提供，可代购）：

1. 酶标仪（主波长 450nm，参考波长 630nm）
2. 高精度移液器及一次性吸头：0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μl
3. 洗板机或洗瓶
4. 37℃孵育箱
5. 双蒸水，去离子水，量筒等
6. 稀释用聚丙烯试管

6、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。

| | | |
|--------|-------|--------------------------|
| 32IU/L | 5号标准品 | 150μl的原倍标准品加入150μl标准品稀释液 |
| 16IU/L | 4号标准品 | 150μl的5号标准品加入150μl标准品稀释液 |
| 8IU/L | 3号标准品 | 150μl的4号标准品加入150μl标准品稀释液 |
| 4IU/L | 2号标准品 | 150μl的3号标准品加入150μl标准品稀释液 |

| | | |
|-------|-------|--------------------------|
| 2IU/L | 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50μl，待测样品孔中先加样品稀释液40μl，然后再加待测样品10μl（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50μl，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A50μl，再加入显色剂B50μl，轻轻震荡混匀，37℃避光显色10分钟。

10. 终止：每孔加终止液50μl，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。

7、注意事项：

1.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，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中保存。

2.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。

3.各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在5分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。

4.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（ $\times n \times 5$ ）。

5.封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。

6.底物请避光保存。

7.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。

8.所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。

9.本试剂不同批号组分不得混用。

8、计算数据：

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。

9、保存条件及有效期：

试剂盒保存：2-8℃。

有效期：6个月。

10、常见问题及解决方法：

| 问题 | 可能原因 | 解决方法 |
|-------------|---------------|------------------------------------|
| 高背景或阴性对照值偏高 | 洗板不充分 | 将洗涤液注入反应孔充分洗涤，彻底拍干孔中液体 |
| | 酶结合物过量 | 检查酶稀释度，按说明书标识的稀释度稀释 |
| | 底物污染 | 加底物前检查底物是否为透明无色，请勿用变蓝的底物，重新用新的底物试验 |
| | 阴性对照孔被阳性对照污染 | 注意洗涤时不要把洗液溢出孔外，不使阴阳对照孔液体连接一起 |
| | 不同批次试剂混用 | 检查试剂批号，请勿用不同批次试剂 |
| 显色信号弱 | 试剂过期 | 检查试剂盒有效期，请勿用过期试剂 |
| | 孵育时间过短 | 按说明书中规定的时间孵育 |
| | 试剂污染 | 检查试剂是否污染，请勿用污染的试剂 |
| | 酶标仪滤光片不匹配 | 检查酶标仪设置及滤光片是否匹配 |
| | 试剂盒平衡不充分 | 确保试剂盒试验前平衡至室温 |
| | 显色时间不够 | 增加底物显色时间 |
| 无显色信号 | 检测抗体、酶、或显色剂漏加 | 检查试验操作流程，重复试验 |

| | | |
|------------|-------------------|---------------------------------------|
| | 酶被污染 | 请使用重新配制的试剂 |
| | 试剂添加顺序有误 | 检查复核试验添加顺序、流程，重复试验 |
| 标曲佳但样品孔无信号 | 样品中靶标物含量低或样品中无靶标物 | 设置阳性对照，重复实验 |
| | 样品基质效应影响检测 | 重新稀释样品后复测 |
| 标曲佳但样品信号偏高 | 样品中待检物含量超过标准曲线范围 | 重新稀释样品后复测 |
| 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 |