

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-2（PARP-2）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-2（PARP-2）水平。用纯化的大鼠多聚ADP核糖聚合酶-2（PARP-2）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-2（PARP-2），再与HRP标记的多聚ADP核糖聚合酶-2（PARP-2）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-2（PARP-2）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-2（PARP-2）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. 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10 μ l（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 $^{\circ}$ C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 μ l，空白孔除外。

7. 温育：用封板膜封板后置37 $^{\circ}$ C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 μ l，再加入显色剂B50 μ l，轻轻震荡混匀，37 $^{\circ}$ C避光显色10分钟。

10. 终止：每孔加终止液50 μ 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。

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