说明书版本号: 3-27

Cat No.EIA06254r

大鼠过氧化物酶体增殖物激活受体 α(Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha ,PPAR-α) ELISA 试剂盒

尊敬的客户，感谢你选用本公司的产品。本产品适用于体外定量检测大鼠血清、血浆或细胞培养上清液、组织等中天然和重组的 PPAR-α 浓度。检测其他特殊样本请咨询本公司技术支持。试剂盒仅供科研使用。 使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分。 如有疑问，请联系武汉新启迪生物科技有限公司。 您将得到我们的全方位服务。

本试剂盒采用双抗体夹心法，双抗体夹心原理，是基于要测试的抗原具有二价以上的特性，能识别包被抗体，同时能识别检测抗体，具体过程如下：

（1）将特异性抗体与固相载体连接，形成固相抗体，洗涤除去未结合的抗体及杂质，并用无关蛋白封闭空余结合位点。

（2）加受检标本使之与固相抗体接触反应一段时间，让标本中的抗原与固相载体上的抗体结合，形成固相抗原复合物。洗涤除去其他未结合的物质。

（3）加生物素标记抗体，使固相免疫复合物上的抗原与生物素标记抗体结合。彻底洗涤未结合的生物素标记抗体。此时固相载体上带有的酶量与标本中受检物质的量正相关。

（4）加辣根过氧化物酶标记亲和素，使生物素标记抗体与辣根过氧化物酶标记的亲和素结合。彻底洗涤未结合的酶标记物。此时固相载体上带有的酶量与标本中受检物质的量正相关。

（5）加入底物显色，即可计算标本浓度。

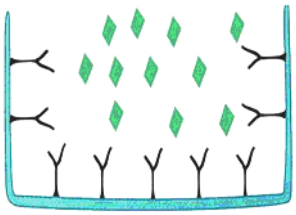
（6）注：一个抗体分子上可以标记上若干个生物素分子，一个生物素分子可以结合一个辣根过氧化物酶标记的亲和素，从而带来了大量的辣根过氧化物酶结合到抗体上，比传统的直接辣根过氧化物酶标记抗体具有更高的敏感性和放大效应。

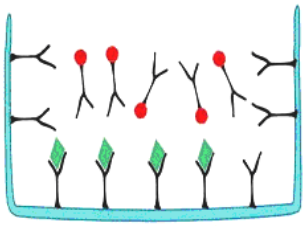
【大鼠 PPAR-α 酶联免疫试剂盒检测原理】

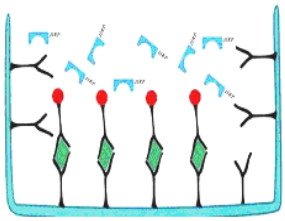
本实验采用双抗体夹心 ELISA 法。所提供的 ELISA Kit 是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒（ELISA）。预先包被的抗体为抗大鼠 PPAR-α 单克隆抗体。检测相抗体为多克隆抗体，经生物素（biotin）标记。样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后，PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲和素反应；经过 PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的待测因子呈正相关。

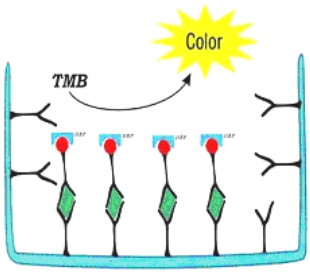
【大鼠 PPAR-α 酶联免疫试剂盒检测原理示意图】

www.qidibio.com, www.enlibio.com
info@enlibio.com

第一步 

第二步 

第三步 

第四步 

【试剂盒组成】

名称	96 Tests	48 Tests	保存条件
1．大鼠 PPAR-α 抗体包被板条	8×12	8×6	4/-20°C
2．大鼠 PPAR-α 标准品	2 支（冻干）	1 支（冻干）	4/-20°C
3．浓缩生物素化大鼠 PPAR-α 抗体	1 支	1 支	4/-20°C
4．浓缩酶结合物(ABC)	1 支	1 支	4/-20°C
5. 酶结合物(ABC)稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20°C
6．抗体稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20°C
7．标准品稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20°C
8．样品稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20°C
9．浓缩洗涤液	1 瓶（25×）	1 瓶（25×）	4/-20°C
10．显色剂 A	1 瓶	1 瓶 (避光)	4/-20°C
11．显色剂 B	1 瓶	1 瓶	4/-20°C
12．终止液	1 瓶	1 瓶	4/-20°C
13．说明书	1 份	1 份	室温

【试验所需自备试验设备和器材】

1. 酶标仪(450nm 检测波长滤光片，570nm 或 630nm 校正波长滤光片) 。
2. 洗板机（可调注液量，保证每孔 350μl 洗液而不溢出）。
3. 超净工作台，生物安全柜，通风柜。
4. 高精度单道加液器（量程为 0.5-10μl, 2-20μl,20-200μl,200-1000μl).
5. 高精度多道加液器（8 道或 12 道，量程为 50-300μl).
6. 37°C恒温箱。
7. 低温离心机。
8. 电冰箱（4°C,-20°C,-86°C）.
9. 分析天平。
10. 剪刀，镊子，钳子等。
11. 漩涡混合仪，低频振荡器等。

【试验所需自备试验耗材及试剂】

1. 离心管（容量为 1.5ml，5ml 等）。
2. 一次性吸头（量程为 0.5-10μl, 2-20μl,20-200μl,200-1000μl）.
3. 纯净水或蒸馏水。
4. 坐标纸。
5. 吸水纸。
6. EDTA，枸橼酸钠，肝素

【标本收集注意事项】

1. 收集血液的试管应为一次性的无热原，无内毒素试管。
2. 血清和血浆避免使用溶血，高血脂标本。
3. 标本应清澈透明，悬浮物应离心去除。
4. 标本收集后若不及时检测，需按一次使用量分装，冻存于-20℃，-80℃电冰箱内，避免反复冻融。
5. 可根据标本的实际情况，做适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数) 。
6. 收集标本，尽量做到双份的用量，避免一次实验失败，重复实验时标本缺失，从而耽误实验进程。
7. 收集标本时，应该做好防护措施（比如戴手套，口罩，护目镜等），认为所有标本都具有一定的潜在危险性。
8. 样本处理应该在生物安全柜里面，并且正确使用生物安全柜。

【标本处理办法】

1. 血清：将采集的全血静置冰箱 4℃过夜，然后 1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存。
2. 血浆：用 EDTA，枸橼酸钠，肝素等作为抗凝剂，加入血液混匀后，1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存。
3. 组织匀浆：切取组织块，0.01MPBS 中过洗一次；按照 1G 组织加入 5-10ml 组织蛋白萃取试剂的比例，在冰水中匀浆。匀浆完成后，5000-10000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存。
4. 细胞培养上清：1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存。
5. 尿液，腹水，脑脊液等：1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃3-6 个月）保存。

注：样品稀释的一般原则

用户须查阅相关文献了解标本内待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。样品的稀释应有详细记录。

【注意事项】

1．试剂盒使用前请保存在 2-8℃。除复溶后的标准品，其他成分不可冻结。

2．浓缩生物素化大鼠 PPAR-α 抗体，浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或 1000rpm 离心 1 分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。

3．浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，使结晶完全溶解后再配制洗涤液。

4．测试过程中，大鼠 PPAR-α 冻干标准品为一次性使用，不得分装。因其浓度较低，溶解两小时候后，会迅速失活。

5．操作严格按照说明书进行，本试剂不同批号组分不得混用。

6．配制试剂时，要用旋涡混合仪混匀。加入孔内的试剂，充分混匀对测试结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率)，如无微量振荡器，可在反应前手工轻轻晃动酶标板 1 分钟，例如做圆周动作，使加入孔中的反应液混匀。

7．实验用酶标仪应严格按使用说明书规范操作，并在使用前充分预热。

8．酶免试验中大鼠 PPAR-α 标准品和样本检测时建议作复孔。

9．将不用的微孔板放进原铝箔袋中，置 2-8℃保存。

10．显色液对光敏感，因此要避免直接暴露在光线下。

11．超过使用有效日期的试剂盒不能应用于实验中。

12．试验结果判定必须以酶标仪读数为准，使用双波长检测时，波长应该设置为 450nm 和 630nm.

13．所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按生物废弃物处理。终止液为 2M 硫酸，使用时必须注意安全。

14．各步骤加样均应使用加样器，并经常校准其准确性，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。

15．每次试验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 值大于标准品孔最高浓度的 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（×n）。

16．不能检测含 NaN3 的样品，因 NaN3 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

17．以洗板机洗板时,每孔注液量不应少于 350μl, 注意检查加样头是否堵塞。手工洗板时, 用带纸屑的吸水材料应慎重, 防止外源性过氧化物酶类似物或氧化还原物与显色剂发生反应。

18．用终止液终止反应后，请于 10 分钟内读取 OD 值。

19．进行复孔实验时，结果计算一定要求平均值。

20．标本溶血可能会有假阳性结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

21．试验时，应该将加过样品的板条放于密闭盒内，并保持湿度约 60%左右。

22．为保证恒温箱内的温度为 37℃，恒温箱的温度要经常校准。以确保实验温度保持恒定。

23．48T 的试剂盒，所有组分均为 96T 的 50%的量。

24．如与英文说明书有异，以英文说明书为准。

【检测前准备工作】

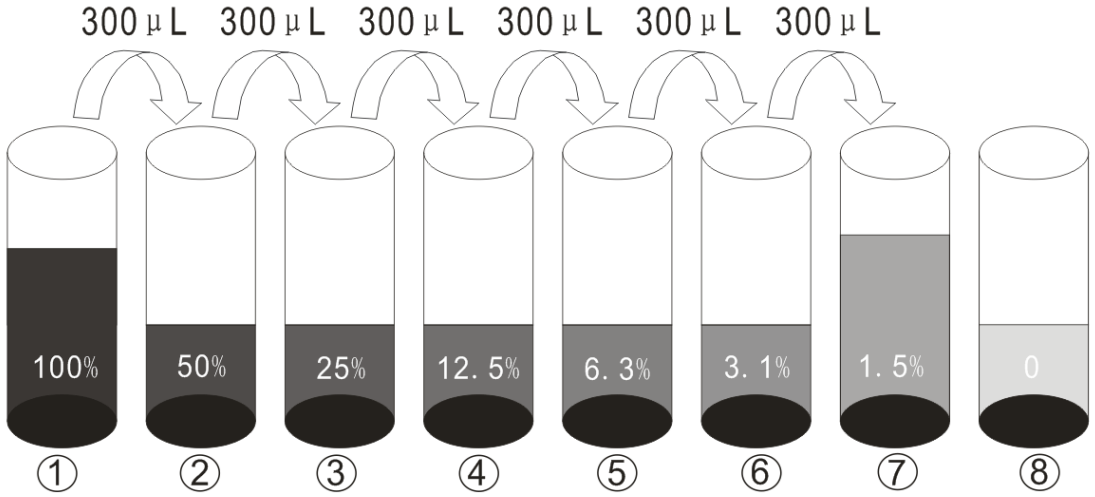
1. 请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温后方可进行试验。

2. 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:25)。未用完的放回 。

3. 大鼠 PPAR-α 标准品: 加入标准品稀释液 1.0ml 至冻干大鼠 PPAR-α 标准品中，静置 10 分钟，待其充分溶解后，轻轻混匀(浓度为 10 ng/ml)，之后在管身标注①，然后根据需要进行稀释。(建议标准曲线使用以下浓度：10、5、2.5、1.25、0.625、0.312、0.156 ng/ml)。 注意：务必要保证冻干标准品彻底溶解和混匀。

4. 标准品稀释方法图例： 取 7 支洁净的试剂管，分别标注②,③,④,⑤,⑥,⑦,⑧. 每管加入 300μl 标准品稀释液。从第①管内取出 300μl 加入到第②管，混匀后，再从第②管取出 300μl 加入到第③管，以此类推至第⑦管。第⑧管为标准品稀释液，作为阴性对照使用。

www.qidibio.com, www.enlibio.com
info@enlibio.com



注：复溶标准品原液（10 ng/ml）请废弃，不可重复使用。
5.生物素化大鼠 PPAR-α 抗体工作液：按当次试验所需用量，用抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体(1:100)，配置成生物素化抗体工作液。使用前 30 分钟准备。仅供当日使用。
6.酶结合物工作液：按当次试验所需要用量，用酶结合物稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)，配置成酶结合物工作液。使用前 30 分钟准备。仅供当日使用。
7.TMB 显色工作液：在使用之前 30 分钟，按 TMB 显色液 A 9 份加 TMB 显色液 B 1 份（9：1）的比例配制 TMB 显色工作液。

【洗涤方法】
1．自动洗板机：要求注入的洗涤液为 350μl，注入与吸出间隔 20－30 秒。确保机器运用熟练后，再投入实验中使用。
2．手工洗板：每孔加洗涤液 350μl，静置 30 秒后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干。手工洗板时，注意加入洗液的过程中，不要造成孔间污染，从而出现跳孔的现象。

【操作步骤】
1. 从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条，未用的板条和干燥剂请放回铝箔袋内封存于 2-8℃。
2. 预留空白孔（若使用双波长读板，空白孔可以不设）。
3. 分别将标本或不同浓度大鼠 PPAR-α 标准品（0ng/ml 孔加标准品稀释液）加入相应孔中(100μl/孔)， 37℃孵箱孵育 90 分钟。
4. 提前 30 分钟制备生物素化大鼠 PPAR-α 抗体工作液。
5. 洗板 2 次。
6. 加入生物素化大鼠 PPAR-α 抗体工作液(100μl/孔)。37℃孵箱孵育 60 分钟。
7. 提前 30 分钟制备酶结合物工作液。室温避光放置。
8. 洗板 3 次。
9. 除空白孔外，加入酶结合物工作液(100μl/孔)。37℃孵箱，避光孵育 30 分钟。
10. 洗板 5 次。
11. 加入 TMB 显色工作液（包括空白孔）100μl/孔，37℃孵箱，避光孵育，当标准曲线高浓度的颜色较深，有明显的颜色梯度的时候，即可终止。试验显色反应请勿超过 30 分钟。

www.qidibio.com, www.enlibio.com
info@enlibio.com

12. 加入终止液（包括空白孔）100μl/孔，混匀后即刻测量 OD（450nm）值(10 分钟内)。

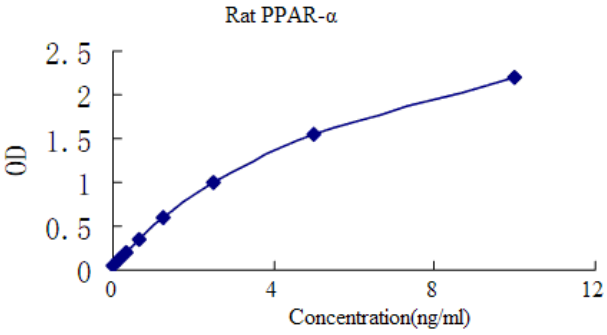
【结果判断】

1．每个标准品和标本的 OD 值应减去零孔的 OD 值。（若不减零孔值，标准曲线的零孔应相交于 Y 轴）

2．手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.3 进行结果计算。

3．若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

【参考曲线】



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线来计算标本含量。

【操作程序总结】

准备试剂，样品和标准品

加入准备好的样品和标准品，37℃反应 90 分钟

洗板 2 次，加入生物素化抗体工作液，37℃反应 60 分钟

洗板 3 次，加入 ABC 工作液，37℃反应 30 分钟

洗板 5 次，加入 TMB 显色液，37℃反应

加入 TMB 终止液

10 分钟之内酶标仪测 OD 值

计算标本待测因子含量

www.qidibio.com, www.enlibio.com
info@enlibio.com

试剂盒参数

【检测范围】10ng/ml-0.156ng/ml
【灵敏度】最小可测大鼠 PPAR-α 达 0.05ng/ml.
【特异性】系统和其它因子无交叉反应。
【批间差】≤12%.
【批内差】≤8%.
【回收率】70-110%.
【保存】-20℃ [短期内（如两周）可 4℃]
【用途】用于体外定量分析液体标本（通用型）。
【规格】96T.
【生产日期】见酶标板铝箔袋封口钢印。
【有效期】12 个月（-20℃）.

【参考文献】

1. Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R (2009).
2. Berger J, Moller DE (2002).
3. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2006).
4. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S (October 2011).
5. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W (1992).

www.qidibio.com, www.enlibio.com
info@enlibio.com