

## Rat VEGF ELISA Kit

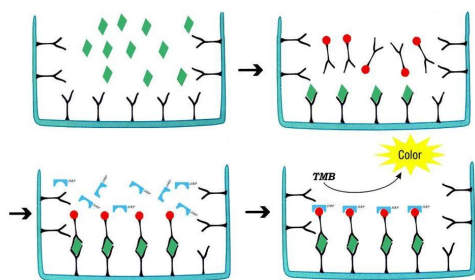
货号: BN51010

规格: 48T; 96T

本试剂盒用于定量检测大鼠血清、血浆或细胞培养上清液等样本中天然和重组 VEGF 浓度。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分。**

### 检测原理:

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗大鼠 VEGF 单克隆抗体预包被酶标板,加入适度稀释的样本和标准品,其中的 VEGF 会与其单抗结合,洗去游离成分;加入生物素化的抗大鼠 VEGF 抗体,抗大鼠 VEGF 抗体与结合在单抗上的大鼠 VEGF 结合而形成免疫复合物,洗去游离的成分;加入辣根过氧化物酶标记的亲合素,生物素与亲合素特异性结合,洗去未结合的酶结合物;加入显色剂,若反应孔中有 VEGF,辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色;加终止液变黄。在 450nm 下测 OD 值,VEGF 浓度与 OD450 值之间呈正比,可通过绘制标准曲线计算出标本中 VEGF 浓度。



检测原理示意图

### 试剂盒组成:

| 试剂盒组成          | 96t  | 48t | 配制        |
|----------------|------|-----|-----------|
| 1a 标准品         | 2 支  | 1 支 | 按说明书进行稀释  |
| 1b 标准品和标本稀释液   | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 2a 浓缩生物素化抗体    | 2 支  | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 2b 生物素化抗体稀释液   | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 3a 浓缩酶结合物 (避光) | 2 支  | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 3b 酶结合物稀释液     | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 4 浓缩洗涤液 20×    | 1 瓶  | 1 瓶 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 显色剂 (避光)       | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 终止液            | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 抗体包被板条         | 8×12 | 8×6 | 即用型       |

|      |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|
| 封板胶纸 | 4 张 | 2 张 | 即用型 |
| 说明书  | 1 份 | 1 份 |     |

### 储存条件:

|                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------|---------------------|------------|-------------|-----------------------------|----------|-----|----------|-----|--------------------------------------------------|--------|--------------------------------|
| 未开封的试剂盒                                             | 4℃ 保存, 请于保质期内使用。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |
| 已<br>启<br>封<br>或<br>重<br>新<br>溶<br>解<br>的<br>试<br>剂 | <table border="1"> <tr> <td>1b 标准品和标本稀释液</td><td rowspan="5">可以整盒放入 4℃ 储存 1 个月。</td></tr> <tr> <td>2a 浓缩生物素化抗体 (100×)</td></tr> <tr> <td>2b 生物素化抗体稀释液</td></tr> <tr> <td>3a 浓缩酶结合物 (避光 100×)</td></tr> <tr> <td>3b 酶结合物稀释液</td></tr> <tr> <td>4 浓缩洗涤液 20×</td><td rowspan="2">2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需用现配。</td></tr> <tr> <td>显色剂 (避光)</td></tr> <tr> <td>终止液</td><td>4℃ 或常温保存</td></tr> <tr> <td>标准品</td><td>重溶后分装, -20℃ 存放一个月, 避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃, 不得重复使用。</td></tr> <tr> <td>抗体包被板条</td><td>实验中不用的板条应立即放回包装袋中, 密封干燥 4℃ 保存。</td></tr> </table> | 1b 标准品和标本稀释液 | 可以整盒放入 4℃ 储存 1 个月。 | 2a 浓缩生物素化抗体 (100×) | 2b 生物素化抗体稀释液 | 3a 浓缩酶结合物 (避光 100×) | 3b 酶结合物稀释液 | 4 浓缩洗涤液 20× | 2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需用现配。 | 显色剂 (避光) | 终止液 | 4℃ 或常温保存 | 标准品 | 重溶后分装, -20℃ 存放一个月, 避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃, 不得重复使用。 | 抗体包被板条 | 实验中不用的板条应立即放回包装袋中, 密封干燥 4℃ 保存。 |
| 1b 标准品和标本稀释液                                        | 可以整盒放入 4℃ 储存 1 个月。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |
| 2a 浓缩生物素化抗体 (100×)                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |
| 2b 生物素化抗体稀释液                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |
| 3a 浓缩酶结合物 (避光 100×)                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |
| 3b 酶结合物稀释液                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |
| 4 浓缩洗涤液 20×                                         | 2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需用现配。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |
| 显色剂 (避光)                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |
| 终止液                                                 | 4℃ 或常温保存                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |
| 标准品                                                 | 重溶后分装, -20℃ 存放一个月, 避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃, 不得重复使用。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |
| 抗体包被板条                                              | 实验中不用的板条应立即放回包装袋中, 密封干燥 4℃ 保存。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |              |                    |                    |              |                     |            |             |                             |          |     |          |     |                                                  |        |                                |

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

### 其它实验材料(不提供, 但可协助购买):

- 酶标仪(450nm)
- 高精度可调移液器及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000μl。  
一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器
- 自动洗板机或洗瓶
- 37℃ 温箱
- 双蒸水或去离子水
- 坐标纸
- 量筒

### 注意事项:

- 试剂盒保存在 2-8℃, 除复溶后的标准品, 其它成分不可冷冻。
- 浓缩生物素化抗体(2a)、浓缩酶结合物(3a)装量极少, 运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
- 不同批号试剂不可混用。
- 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
- 终止液和显色剂具腐蚀性, 避免皮肤及粘膜直接接触, 一旦接触到这些液体, 请尽快用大量水冲洗。
- 使用干净的塑料容器配制洗涤液, 使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。

本产品仅用于科研

7. 洗涤酶标板时应充分拍干, 不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
8. 不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分, 不同批号的试剂盒组份不能混用, 请在有效日期内使用本产品。
9. 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔, 加入试剂的顺序应一致, 以保证所有反应孔孵育的时间一样。
10. 充分混匀对反应结果尤为重要, 最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
11. 避免操作过程中酶标板干燥, 干燥会使酶标板上生物成分迅速失活, 影响实验结果。
12. 适当的稀释样品, 使样品值落在标准曲线范围内, 根据待测因子含量高、中、低的不同, 建议采用1:100、1:10、1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准, 适当增加稀释度并重复检测。
13. 标准品稀释液, 操作人, 移液方式, 洗涤方法, 孵育时间及温度, 试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
14. 此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

#### 样品收集、处理及保存方法:

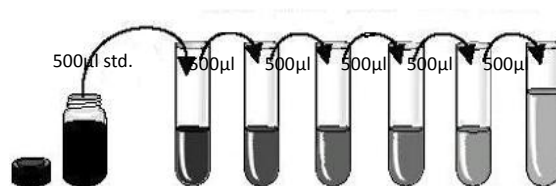
1. **血清:** 使用不含热原和内毒素的试管, 收集血液后, 室温凝血30min, 1000×g离心10min, 小心分离血清。
2. **血浆:** 用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆, 收集后30min内以1000×g离心15min去除颗粒。
3. **细胞上清液:** 1000×g离心10min去除颗粒和聚合物。
4. **保存:** 若样品不立即检测, 请将其按一次用量分装, -20℃—70℃保存, 避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒, 检测前先离心或过滤去除; 室温下解冻, 请勿于37℃或更高的温度加热解冻。
5. **稀释:** 可根据实际情况, 将标本做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。

**注: 正常人血清或血浆样本建议做1:2稀释。**

#### 试剂准备:

1. 提前30min从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
2. **洗涤缓冲液:** 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 这属于正常现象, 加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4℃。
3. **标准品:** 加入标准品/标本稀释液(1b)1.0ml至冻干标准品(1a)中, 待彻底溶解后, 静置15分钟混匀(浓度为1000pg/ml), 然后根据需要稀释, 见下图(建议标准曲线使用以下浓度: 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0 pg/ml)。稀释的标准品不得重复使用, 未用完的标准品应按照一次用量分装后, 将其放在-20~-70℃贮存, 一次性使用, 避免反复冻融。

#### 标准品稀释方法:



4. **生物素化抗体工作液:** 根据每孔需要100µl来计算总的用量, 多配制100-200µl。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a)(1:100)。最好现用现配。(稀释方法参照“下表”)

5. **酶结合物工作液:** 以酶结合物稀释液(3b)稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。(稀释方法参照“下表”)

#### 浓缩生物素化抗体&浓缩酶结合物稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗体 | + | 生物素化抗体稀释液 |
|-------|----------|---|-----------|
| 12    | 110µL    | + | 10890µL   |
| 10    | 90µL     | + | 8910µL    |
| 8     | 70µL     | + | 6930µL    |
| 6     | 50µL     | + | 4950µL    |
| 4     | 33µL     | + | 3267µL    |
| 2     | 17µL     | + | 1683µL    |
| 1     | 9µL      | + | 891µL     |

#### 操作步骤:

1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。
2. 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数, 并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100µl/孔)加入相应孔中(零孔只加标准品/样本稀释液), 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵箱孵育90分钟。
3. 洗板4次: (1)自动洗板机: 要求注入的洗涤液为350µl, 注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板: 甩尽孔内液体, 每孔加洗涤液350µl, 静置30秒后甩尽液体, 在厚迭吸水纸上拍干。
4. 加入生物素化抗体工作液(100µl/孔)。用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵箱孵育60分钟。
5. 洗板4次。
6. 加入酶结合物工作液(100µl/孔)。用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵箱孵育30分钟。
7. 洗板4次。
8. 加入显色剂100µl/孔, 避光, 37℃孵箱孵育10-20分钟。
9. 加入终止液100µl/孔, 混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

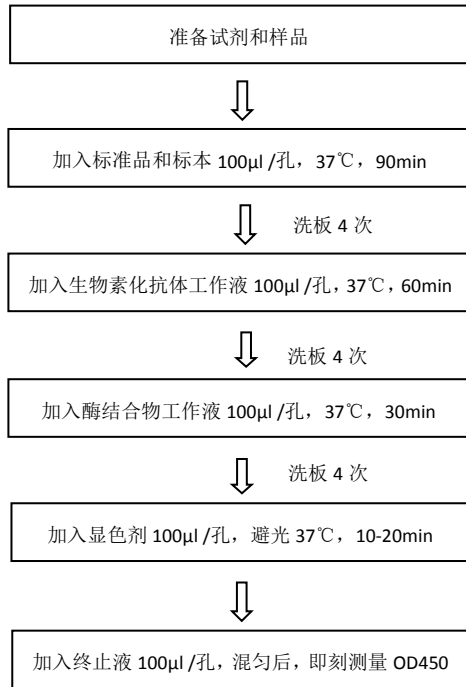
本产品仅用于科研

注：空白对照孔只加显色剂和终止液，如用450nm/630nm双波长读数，  
无需做空白对照，OD值=OD<sub>450</sub>-OD<sub>630</sub>。

品的VEGF含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。

- 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算标本含量。

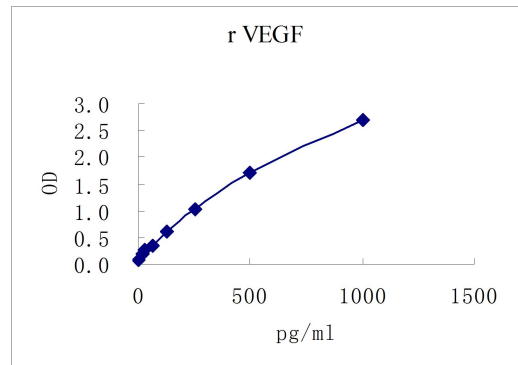
#### 操作流程图：



- 参考数据：

| 标准品浓度<br>(pg/ml) | OD值1  | OD值2  | 平均值   | 矫正值   |
|------------------|-------|-------|-------|-------|
| 0                | 0.089 | 0.084 | 0.087 | —     |
| 15.625           | 0.178 | 0.185 | 0.182 | 0.095 |
| 31.25            | 0.270 | 0.250 | 0.260 | 0.174 |
| 62.5             | 0.337 | 0.372 | 0.355 | 0.268 |
| 125              | 0.621 | 0.591 | 0.606 | 0.520 |
| 250              | 1.017 | 1.003 | 1.010 | 0.924 |
| 500              | 1.686 | 1.714 | 1.700 | 1.614 |
| 1000             | 2.687 | 2.702 | 2.695 | 2.608 |

注：以上标准品浓度对应OD值为实际测得值减空白孔值



#### 操作要点提示：

- 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
- 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
- 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
- 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
- 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

#### 结果重复性：

板间，板内变异系数均<10%。

#### 灵敏度：

最低检测大鼠 VEGF 剂量小于 7pg/ml。最低检出量测定方法：20 个零标准的平均 OD 值增加两个标准差，再计算相应的浓度。

#### 结果判断：

- 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值，如果做复孔，求其平均值。
- 使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y)，相应的VEGF标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线(建议用4参数曲线拟合)，样

本产品仅用于科研

ELISA检测常见问题分析及解决办法:

| 问题  | 可能原因               | 解决办法                                             | 问题                          | 可能原因                                      | 解决办法                                                                               |
|-----|--------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 无颜色 | 不同试剂盒或不同批号的试剂混合    | 重新检查试剂的标签, 确准所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。 | 全部板子变成规则的蓝色                 | 不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的 HRP 仍有残留              | 最好使用洗板机充分洗涤                                                                        |
|     | 漏加酶                | 检查操作流程, 注意不要漏加                                   |                             | 太多的酶结合物                                   | 检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确                                                               |
|     | HRP 酶污染了叠氮钠        | 使用新配制的试剂, 禁含叠氮钠                                  |                             | 封板膜或试剂容器被重复使用, 导致 HRP 残留, 使 TMB 底物产生非特异蓝色 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定                                                                   |
|     | 试剂配制/使用有误          | 重做试验, 严格按说明书操作, 每次配制和使用前看清标签                     |                             |                                           | 使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器                                                                |
| 显色弱 | 超过有效期的产品可能会产生很弱的信号 | 检查产品有效期                                          | 高 CV 值花板                    | 操作不慎或洗涤不充分                                | 按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要                                                               |
|     | 缩短孵育时间能使实验信号变弱     | 检查孵育时间                                           |                             | 出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用                     | 确定每两步骤间酶标板应保持湿润                                                                    |
|     | 使用了被污染的试剂          | 检查试剂是否被污染                                        |                             | 移液器不准确, 吸头重复使用                            | 使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜                                                              |
|     | 仪器设定不正确, 滤光片不匹配    | 仪器是否设定正确, 滤光片的使用等                                | 标准曲线可得到, 但两点之间区别很差 (低或平的曲线) | 酶结合物不足                                    | 检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头                                                               |
|     | 洗涤操作不规范            | 洗涤不充分, 使用手工洗板常出现                                 |                             | 检测抗体不足                                    | 检查稀释度, 必要时进行效价测定                                                                   |
|     |                    | 洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速                       |                             | 板子显色不足                                    | 检查稀释度, 必要时进行效价测定                                                                   |
|     |                    | 若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备                |                             |                                           | 延长底物孵育时间                                                                           |
|     |                    | 检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确                        | 标准曲线很好, 但本底的判读值很高           | 标本中无相应的待检测物质                              | 使用推荐品牌的底物溶液                                                                        |
|     |                    | 可在两次洗板之间加 30 秒的浸泡                                |                             | 标本基质遮盖检测                                  | 使用内参对照                                                                             |
| 高背景 | 实验中孵育温度和时间不适当      | 确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当                             | 标准曲线很好, 但本底的判读值很高           | 标本中含有的待检测物质水平超过实验范围                       | 重复实验, 重新考虑实验的相应参数                                                                  |
|     | 酶加量过多              | 加酶前验看移液器调节量是否准确                                  | 边缘效应                        | 工作环境温度不均衡                                 | 将标本至少做 1:2 相应的稀释, 或进行系列稀释                                                          |
|     |                    | 检查稀释度, 若必要时进行效价测定                                | 漂移                          | 实验过程中出现间断                                 | 稀释标本                                                                               |
|     |                    |                                                  |                             | 试剂没有按说明书平衡至室温                             | 避免将板子在变化温度环境中孵育                                                                    |
|     |                    |                                                  |                             |                                           | 整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。                                                 |
|     |                    |                                                  |                             |                                           | 在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。                                               |
|     |                    |                                                  |                             | 是否可更改试剂盒所提供的操作步骤?                         | 一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。                                  |
|     |                    |                                                  |                             | 是否可混用不同批次试剂盒中的试剂?                         | 不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。                                            |
|     |                    |                                                  |                             | 是否可增加或减少标本的体积?                            | 商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。                                        |
|     |                    |                                                  |                             | 是否可重新确定自己的标准曲线的点?                         | 可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。 |

