

大鼠血管内皮生长因子(VEGF)ELISA Kit

Catalog Number: bsk13007

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血管内皮生长因子(VEGF)含量。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分**，如有任何疑问请与北京博奥森生物技术有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

仅供研究，不用于临床诊断。

目录

检测原理.....	3
试剂盒组成.....	3
其它实验材料.....	3
注意事项.....	4
样本收集、处理及保存方法.....	4
试剂准备.....	5
操作步骤.....	5
结果判断.....	6
试剂盒性能.....	7
检测范围.....	7
灵敏度.....	7
常见问题分析及解决办法.....	8

检测原理：

本试剂盒采用 ELISA 双抗体夹心法原理。用纯化的血管内皮生长因子(VEGF)抗体包被微孔板，向已包被的板微孔中依次加入标准品及待测样本，待其与包被抗体充分结合后，再与生物素化的 VEGF 抗体结合，其后加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的链霉亲和素，生物素与链霉亲和素形成高强度的非共价结合，经过彻底洗涤后加入底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化作用下转化成蓝色，并在酸的作用下最终转化成黄色。颜色的深浅和样本中的 VEGF 含量呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光值（OD 值），通过绘制标准曲线计算样本中 VEGF 浓度。

试剂盒组成：

试剂盒组成	规格（96T）	保存条件
抗体包被板条	8×12	2-8℃ 保存
标准品	2 支	2-8℃ 保存
S1 标准品/样本稀释液	16 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
浓缩生物素化抗体（100×）	60 μl×2 瓶	2-8℃ 保存
S2 生物素化抗体稀释液	16ml×1 瓶	2-8℃ 保存
浓缩酶结合物（100×）	60 μl×2 瓶	2-8℃ 保存
S3 酶结合物稀释液	16ml×1 瓶	2-8℃ 保存
浓缩洗涤液（20×）	30ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色底物（避光）	12ml×1 瓶	2-8℃ 保存
终止液	12ml×1 瓶	2-8℃ 保存
封板胶纸	4 张	
说明书	1 份	

其它实验材料（不提供，但可协助购买）：

- 1.酶标仪(主波长 450nm，参考波长 630nm)
- 2.高精度可调移液器（已校准）及吸头：0.5-10,2-20,20-200,200-1000μl。
一次检测样本较多时，建议使用多通道移液器。
- 3.自动洗板机或洗瓶
- 4.37℃ 温箱
- 5.双蒸水或去离子水

6.坐标纸

7.量筒

注意事项:

1.试剂盒保存在 2-8℃，已复溶但未用完的标准品，建议丢弃。不可混合使用不同来源或不同批号的试剂盒组分，请在有效期内使用本产品。

2.浓缩洗涤液低温取出可能会伴有结晶析出，稀释时可在水浴中加热助溶，不影响使用。

3.各步加样均应使用移液器，并经过校准，以免产生误差。建议一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如样本数量较多，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。如样本中待测物质含量高于试剂盒检测上限（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样本稀释液稀释一定的倍数（n 倍）后再测定，计算时需乘以总稀释倍数。

5. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样本、不同试剂时谨记及时更换吸头，封板胶纸只限一次性使用。

6.浓缩酶结合物及显色底物请避光保存，显色底物在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色底物。

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。

样本收集、处理及保存方法:

1.血清：室温血液自然凝固 30 分钟，离心 20 分钟（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，若保存过程中出现沉淀，应再次离心，避免反复冻融。

2.血浆：根据样本的要求选择 EDTA 或柠檬酸作为抗凝剂，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，若保存过程中出现沉淀，应再次离心。

3.细胞上清液：检测分泌性的成分时，用无菌管收集。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。

4.若样本无法立即检测，请将其按最小使用量分装，-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。

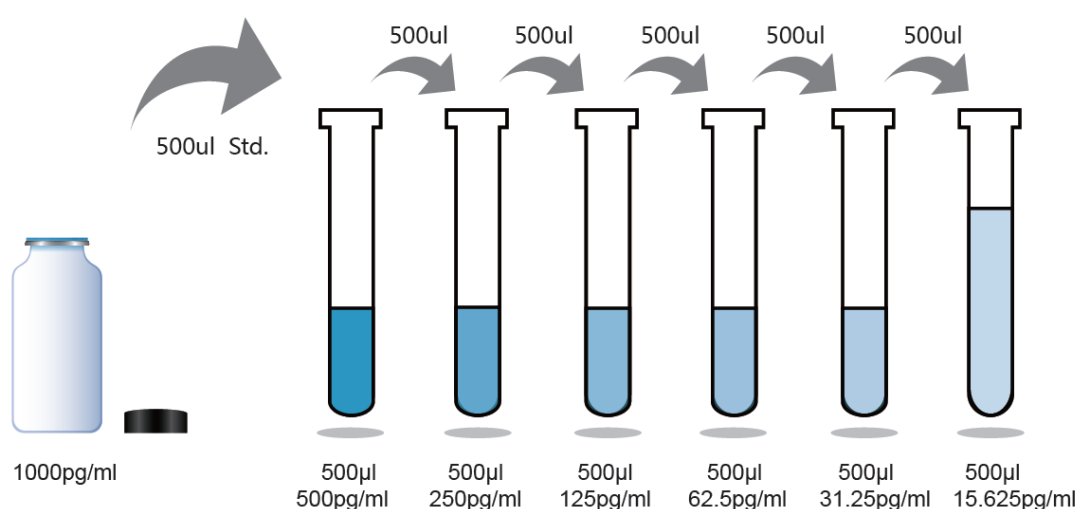
5.不能检测含 NaN₃ 的样本，因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的活性。

6.请根据实际情况，将样本做适当倍数稀释（建议根据预试验结果确定稀释倍数）。

注：血清或血浆样本建议至少做 1:2 稀释。

试剂准备:

- 1.试剂回温：请在实验前 30min 内，将试剂盒和待测样本置于室温下回温。
- 2.洗涤液配制：根据浓缩洗液的浓缩倍数，用双蒸水或去离子水进行相应倍数稀释后备用。
- 3.标准品梯度稀释：取 1ml 标准品/样本稀释液（S1）至冻干标准品中，静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀(浓度为 1000pg/ml)，然后取 6 只聚丙烯试管，各加入 500 μ l 标准品/样本稀释液（S1），按照以下浓度进行 2 倍稀释： 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 pg/ml 进行稀释。1000pg/ml 为标准曲线最高点浓度，标准品/样本稀释液（S1）作为标准曲线的零点（0pg/ml）。复溶过的标准品原液（1000pg/ml）未用完的应废弃或根据需要进行一次用量分装，并将其贮存在-20~-80℃冰箱。



- 4.生物素化抗体工作液：根据试验所需用量，用生物素化抗体稀释液（S2）将浓缩生物素化抗体（100 $\times$ ）稀释成1倍应用工作液，请于30min内使用。
5. 酶结合物工作液：根据试验所需用量，用酶结合物稀释液（S3）将浓缩酶结合物（100 $\times$ ）稀释成1倍应用工作液，请于30min内使用。

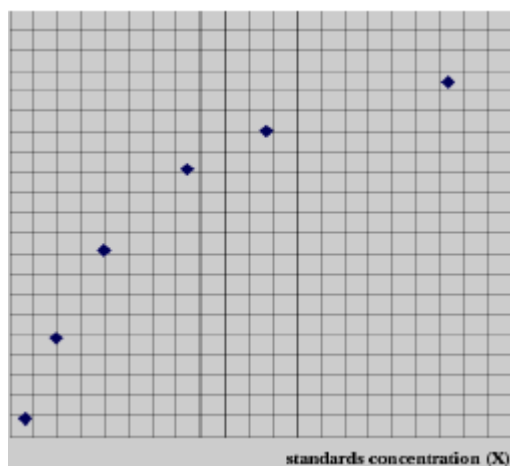
操作步骤:

- 1.加样：根据试验所需用量，取出相应抗体包被板条，并增加 1 孔作为空白对照孔，分别将已配制好的标准品、标准品零点（S1）及待测样本以 100 μ l/孔加入实验孔底部。
- 2.温育：用封板胶纸封板后置 37℃温育 90min（空白对照孔除外）。
- 3.洗涤：小心揭掉封板胶纸，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液（350 μ l），静置 30 秒后弃去，如此重复 4 次，最后于吸水纸上拍干。
- 4.加生物素化抗体：每孔加入生物素化抗体应用工作液 100 μ l(空白对照孔除外)。
- 5.温育：用封板胶纸封板后置 37℃温育 60 min (空白对照孔除外)。

- 6.洗涤：同上述洗涤过程（步骤3），洗板4次。
- 7.加酶结合物：每孔加入酶结合物应用工作液 100 μ l(空白对照孔除外)。
- 8.温育：用封板胶纸封板后置 37℃温育 30min(空白对照孔除外)。
- 9.洗涤：同上述洗涤过程（步骤3），洗板4次。
- 10.显色：每孔加入 100 μ l 显色底物，用封板胶纸封板后置 37℃显色 10-20min。
- 11.终止：每孔加终止液 100 μ l（此时蓝色立转黄色）。
12. 测定：用酶标仪 450nm 波长测定各孔的吸光度（OD 值），测定应在加终止液后 5min 以内进行。

结果判定：

- 1.每个标准品和样本的 OD 值减去空白孔的 OD 值，为最终数值，如果做复孔,求其平均值。
2. 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,样本的 VEGF 含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。若样本 OD 值高于标准品曲线上限，请做适当倍数稀释，计算样本浓度时需乘以相应稀释倍数。



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

试剂盒性能:

批内与批间差应小于 10%

检测范围:

15.625 pg/ml -1000 pg/ml

灵敏度:

7pg/ml

常见问题分析及解决办法

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。
	漏加抗体、酶、显色剂	检查操作流程，注意不要漏加
	HRP 酶污染了叠氮钠	使用新配制的试剂，禁含叠氮钠
	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
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
	缩短孵育时间能使实验信号变弱	检查孵育时间
	使用了被污染的试剂	检查试剂是否被污染
	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
	洗涤操作不规范	洗涤不充分，使用手工洗板常出现
		洗瓶洗涤，每孔应完全充满洗涤缓冲液，倾出时应迅速
		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
		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
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
	酶加量过多	加酶前验看移液器调节量是否准确
		检查稀释度，若必要进行效价测定
标曲佳但样本孔无信号	样本中靶标物含量低或样本中无靶标物	设置阳性对照，重复实验
	样本基质效应影响检测	重新稀释样本后复测
标曲佳但样本信号偏高	样本中待检物含量超过标准曲线范围	重新稀释样本后复测