

## Mouse VEGF ELISA Kit

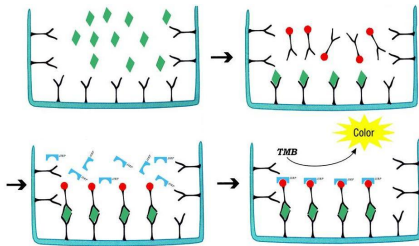
货号: BN50582

规格: 48T; 96T

本试剂盒用于定量检测小鼠血清、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。用抗小鼠 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; 加入生物素化的抗小鼠 VEGF 抗体, 抗小鼠 VEGF 抗体与结合在单抗上的小鼠 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         | 8×1 | 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:

| 未启封的试剂盒             | 4℃ 保存, 请于保质期内使用。                                  |
|---------------------|---------------------------------------------------|
| 已启封或重新溶解的试剂         | 4℃ 或常温保存                                          |
| 1b 标准品和标本稀释液        | 可以整盒放入 4℃ 储存 1 个月。<br>2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需用现配。 |
| 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×         | 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。  |
| 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):

1. 酶标仪(450nm)
2. 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。
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℃, 除复溶后的标准品, 其它成分不可冷冻。
2. 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。
3. 不同批号试剂不可混用。
4. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
5. 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。
6. 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。
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。

本产品仅用于科研

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)。

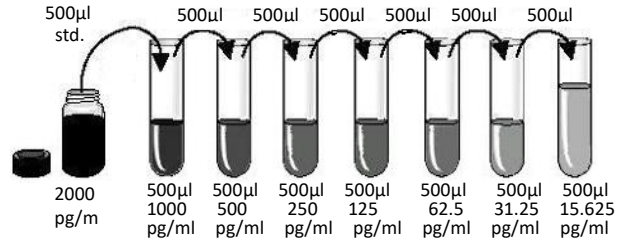
**注: 正常小鼠血清或血浆样本建议做1:2稀释。**

#### 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2000pg/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”)

#### 浓缩生物素化抗体及浓缩酶结合物稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩酶结合物 | + | 酶结合物稀释液 |
|-------|--------|---|---------|
| 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:

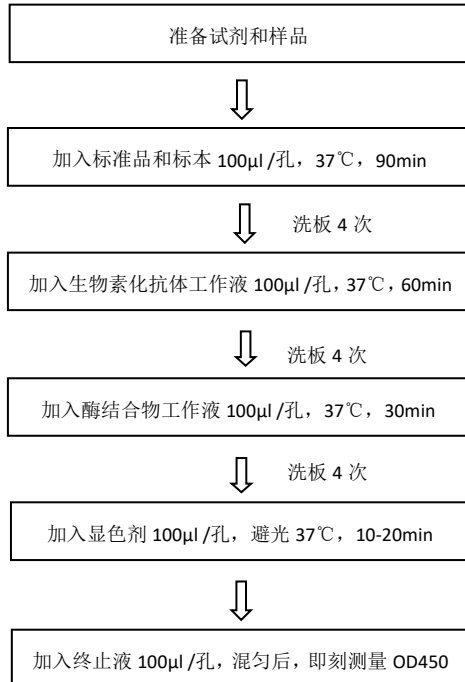
1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。
2. 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数,并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100µl/孔)加入相应孔中(零孔只加标准品/样本稀释液),用封板胶纸封住反应孔,37℃孵箱孵育90分钟(空白对照孔除外)。
3. 洗板4次:(1)自动洗板机:要求注入的洗涤液为350µl,注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板:甩尽孔内液体,每孔加洗涤液350µl,静置30秒后甩尽液体,在厚迭吸水纸上拍干。
4. 加入生物素化抗体工作液(100µl/孔)。用封板胶纸封住反应孔,37℃孵箱孵育60分钟(空白对照孔除外)。
5. 洗板4次。
6.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

本产品仅用于科研

- 加入显色剂100 $\mu$ l/孔，避光，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育10-20分钟。
- 加入终止液100 $\mu$ l/孔，混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

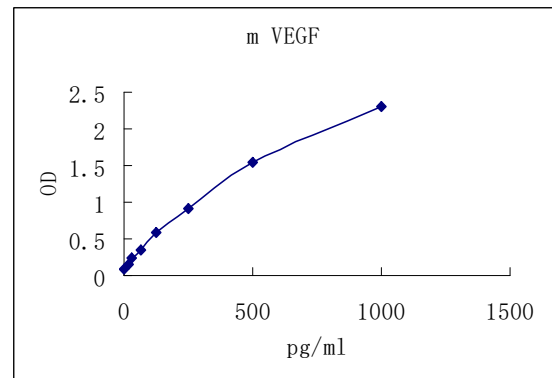
- 若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数算标本含量。
- 参考数据：

**操作流程图：**



| 标准品浓度 (pg/ml) | OD值1  | OD值2  | 平均值   | 矫正值   |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| 0             | 0.080 | 0.089 | 0.085 | ---   |
| 15.625        | 0.148 | 0.141 | 0.145 | 0.060 |
| 31.25         | 0.231 | 0.232 | 0.232 | 0.147 |
| 62.5          | 0.348 | 0.343 | 0.346 | 0.261 |
| 125           | 0.588 | 0.579 | 0.584 | 0.499 |
| 250           | 0.926 | 0.920 | 0.923 | 0.838 |
| 500           | 1.542 | 1.550 | 1.546 | 1.461 |
| 1000          | 2.315 | 2.320 | 2.318 | 2.233 |

数据仅供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

**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。

**结果重复性：**

板间，板内变异系数均<10%。

**灵敏度：**

最低检测小鼠 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，样品的VEGF含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。

**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, 确保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<br>检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确                              |
|                    | 漏加酶             | 检查操作流程, 注意不要漏加                                   |                                   | 太多的酶结合物                                                                            | 检查稀释度, 必要时进行效价测定                                                 |
|                    | 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                                          | 使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器                                              |
|                    | 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                     | 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<br>确定每两步骤间酶标板应保持湿润<br>使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜 |
| 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         | 出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用                            |                                   | 检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头                                                               |                                                                  |
| 缩短孵育时间能使实验信号变弱     | 检查孵育时间          | 移液器不准确, 吸头重复使用                                   |                                   | 检查稀释度, 必要时进行效价测定<br>检查稀释度, 必要时进行效价测定<br>延长底物孵育时间                                   |                                                                  |
| 显色弱                | 使用了被污染的试剂       | 检查试剂是否被污染                                        | 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<br>检测抗体不足                                                                   | 检查稀释度, 必要时进行效价测定<br>检查稀释度, 必要时进行效价测定                             |
|                    | 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                                | 板子显色不足                            | 使用推荐品牌的底物溶液                                                                        |                                                                  |
|                    | 洗涤操作不规范         | 洗涤不充分, 使用手工洗板常出现                                 |                                   | 标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号                                                               | 标本中无相应的待检测物质                                                     |
|                    |                 | 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 | 标本基质遮盖检测                                                                           | 将标本至少做 1:2 相应的稀释, 或进行系列稀释                                        |
|                    |                 | 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                        | 可在两次洗板之间加 30 秒的浸泡                 | 标准曲线很好, 但标本的判读值很高                                                                  | 标本中含的待检物质水平超过实验范围                                                |
| 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                             | 边缘效应                              | 工作环境温度不均衡                                                                          | 避免将板子在变化温度环境中孵育                                                  |
|                    | 酶加量过多           | 加酶前查看移液器调节量是否准确<br>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                                                                          | 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。                               |
|                    |                 | 试剂没有按说明书平衡至室温                                    |                                   | 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。 |                                                                  |