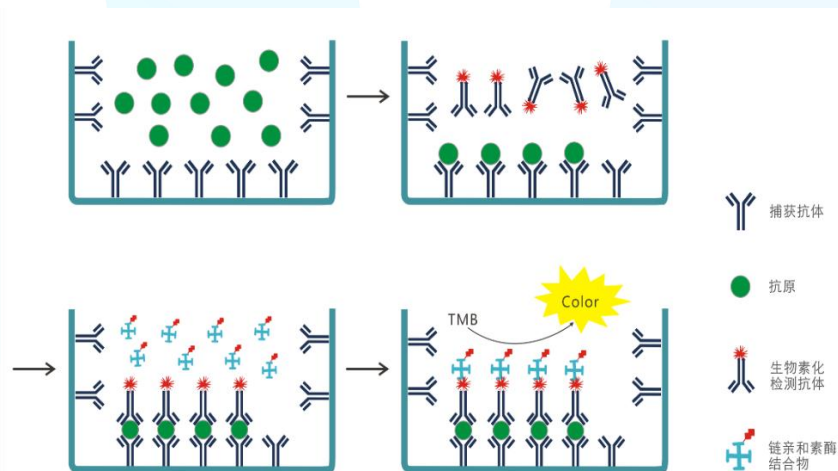


## Mouse VEGF ELISA 试剂盒 (91-08-0580)

### 【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

### 【试剂盒组分】

| 序号 | 试剂盒组分          | 48孔 | 配制        |
|----|----------------|-----|-----------|
| 1  | 1a 标准品         | 1支  | 按说明书进行稀释  |
| 2  | 1b 标准品和标本稀释液   | 1瓶  | 即用型       |
| 3  | 2a 浓缩生物素化抗体    | 1支  | 按瓶签标识进行稀释 |
| 4  | 2b 生物素化抗体稀释液   | 1瓶  | 即用型       |
| 5  | 3a 浓缩酶结合物 (避光) | 1支  | 按瓶签标识进行稀释 |
| 6  | 3b 酶结合物稀释液     | 1瓶  | 即用型       |
| 7  | 浓缩洗涤液 20×      | 1瓶  | 按瓶签标识进行稀释 |
| 8  | 显色剂 (避光)       | 1瓶  | 即用型       |
| 9  | 终止液            | 1瓶  | 即用型       |
| 10 | 抗体包被板条         | 8×6 | 即用型       |
| 11 | 封板胶纸           | 2张  | 即用型       |
| 12 | 说明书            | 1份  |           |

## 【试剂盒简介】

欣协生物生产的小鼠VEGF ELISA检测试剂盒是用于定量检测小鼠血清、血浆或细胞培养上清液等样本中VEGF的专用试剂盒，本试剂盒操作方便简单，可直接用于样本分析，重现性好，稳定性高。

规格：48T

## 【储存条件】

|             |                              |   |
|-------------|------------------------------|---|
| 未启封的试剂盒     | 4°C保存，请于保质期内使用。              |   |
| 已启封或重新溶解的试剂 | 1b 标准品和标本稀释液                 | 可以整盒放入 4°C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                   |   |
|             | 浓缩洗涤液 20×                    |   |
|             | 显色剂 (避光)                     | 4°C或常温保存  |
|             | 终止液                          |   |
|             | 标准品                          |   |
| 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°C保存。 |   |

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

## 【其他实验材料】(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, 200-1000 $\mu$ l; 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°C温箱
- 5.双蒸水或去离子水、吸水纸、量筒

## 【样本收集处理及保存方法】

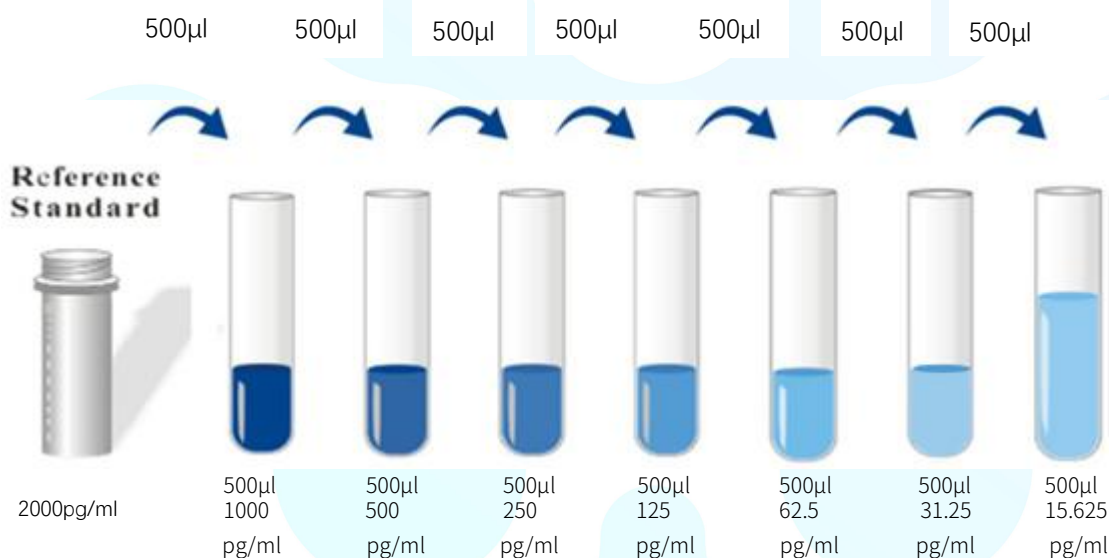
- 1.血清：使用不含热原和内毒素的试管，收集血液后，室温凝血30min，1000×g离心10min，小心分离血清。
- 2.血浆：用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆，收集后30min内以1000×g离心15min去除颗粒。
- 3.细胞上清液：1000×g离心10min去除颗粒和聚合物。
- 4.保存：若样品不立即检测，请将其按一次用量分装，-20°C~-70°C保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒，检测前先离心或过滤去除；室温下解冻，请勿于37°C或更高的温度加热解冻。
- 5.稀释：可根据实际情况，将标本做适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀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

**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°C。
- 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)，然后根据需要进行稀释，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°C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。
- 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。

## 【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°C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°C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°C孵箱孵育30分钟。

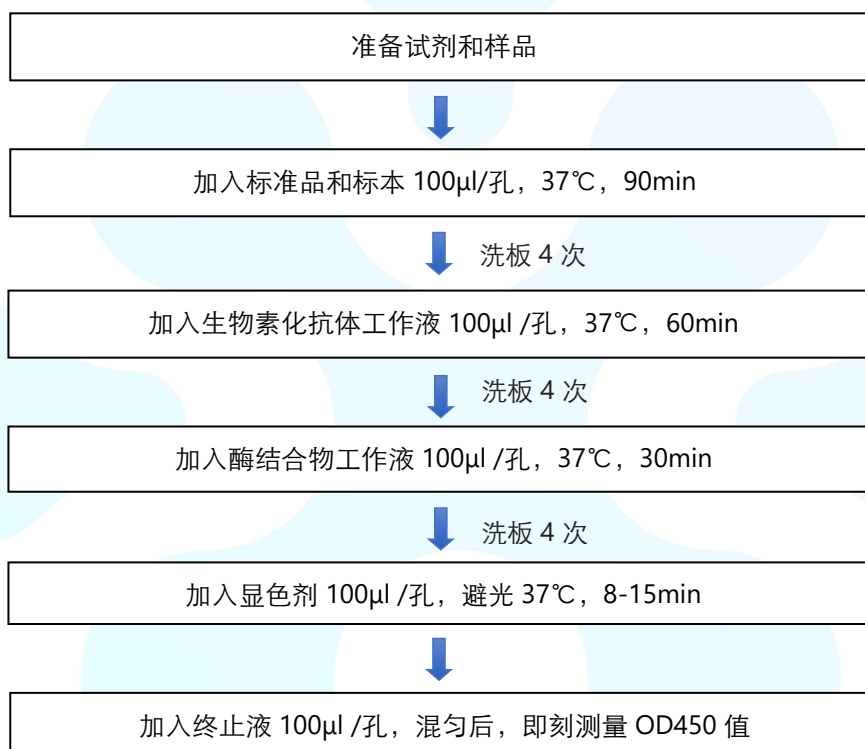
7.洗板4次。

8.加入显色剂100 $\mu$ l /孔，避光，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育8-15分钟。

9.加入终止液100 $\mu$ l /孔，混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

注：如用450nm/630nm双波长读数，无需做空白对照。OD值 =OD450-OD630。

### 【操作流程图】

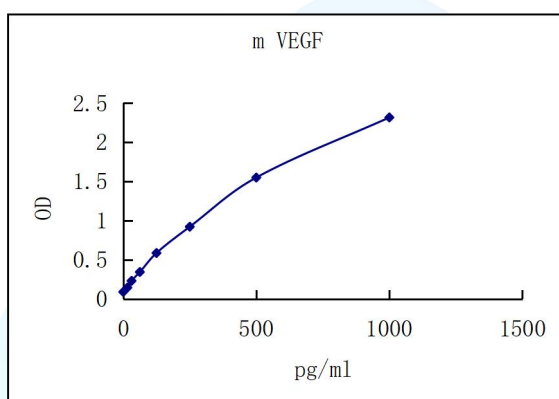


### 【结果判断】

- 1.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。
- 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（建议用4参数曲线拟合），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。
- 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算标本含量。
- 4.参考数据：（数据仅供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同）

| 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 |

注：以上标准品浓度对应OD值为实际测得值减空白孔值



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。

### 【特异性】

此试剂盒可检测天然和重组的小鼠VEGF，以50ng/ml平行做特异性试验，均不与下列细胞因子及蛋白反应。

| 重组小鼠细胞因子 | 重组人细胞因子      | 其他蛋白       |
|----------|--------------|------------|
| G-CSF    | Flt-3 Ligand | human PDGF |
| GM-CSF   | P1GF         |            |
| IL-1α    | PDGF-AA      |            |
| IL-1γ    | PDGF-AB      |            |
| IL-2     |              |            |
| IL-3     |              |            |
| IL-4     |              |            |
| IL-5     |              |            |
| IL-6     |              |            |
| IL-7     |              |            |
| IL-9     |              |            |
| IL-10    |              |            |

|               |  |  |
|---------------|--|--|
| IL-12         |  |  |
| LIF           |  |  |
| TNF- $\alpha$ |  |  |
| IFN- $\gamma$ |  |  |
| MIP-2         |  |  |

### 【注意事项】

1. 试剂盒保存在2-8°C，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. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
4. 不同批号试剂不可混用。
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。
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。

### 【操作要点提示】

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。