

大鼠血管内皮生长因子酶联免疫试剂盒

Rat VEGF ELISA Kit

用于血清，血浆，细胞上清及其他生物体液中

大鼠血管内皮生长因子的检测

货号：A1010A0307

96 tests

仅供科研使用，勿用于药物、临床检测

检测原理：

本试剂盒采用双抗夹心法。用抗 Rat VEGF 抗体包被于酶标板上，标准品和样本中的 Rat VEGF 与单抗结合，加入生物素化的抗 Rat VEGF，形成免疫复合物连接在板上，辣根过氧化物酶标记的 streptavidin 与生物素结合，加入底物工作液显蓝色，最后加终止液，在 450nm 处测 OD 值，Rat VEGF 浓度与 OD 值成正比，可通过绘制标准曲线求出标本中 Rat VEGF 的浓度。

试剂盒组份（2-8℃保存）

1. Rat VEGF 酶标板（coated wells），12*8wells（单孔可折），1 plate；
2. Rat VEGF 标准品 20 ng（standards），2 vial；
3. Rat VEGF 120×生物素化二抗（Biotinylated Antibody），100μL，1 vial；
4. Rat VEGF 600×亲和链霉素辣根过氧化物酶结合物（Streptavidin HRP Conjugate），20μL，1 vial；
5. 稀释液 I（Assay Diluent I），12 mL，1 vial；
6. 稀释液 II（Assay Diluent II），12 mL，1 vial；
7. 稀释液 III（Assay Diluent III），12 mL，1 vial；
8. 20×浓缩洗涤液（Wash Buffer），50 mL，1 vial；
9. 显色液 A（Color Reagent A），6 mL，1 vial；
10. 显色液 B（Color Reagent B），6 mL，1 vial；
11. 终止液（Stop Solution），12 mL，1 vial；

未提供的试剂、仪器和耗材：

1. 单道或多道（8道或12道）移液器及移液器枪头：10-200μL 和 50-1000μL；
2. 多道（8道或12道）移液器试剂存放槽；
3. EP 管及试剂配置容器；

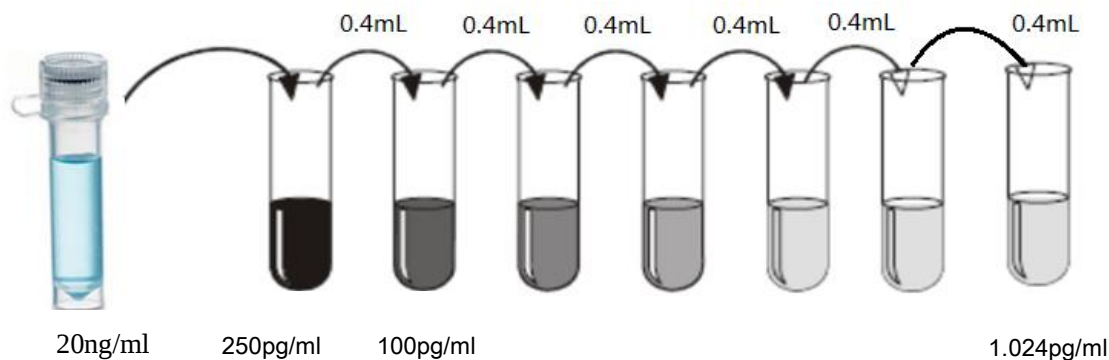
4. 圆柱形量筒：100mL，200mL，500mL 和 1L；
5. 可在 450nm 处进行读数的酶标仪；洗瓶或自动洗板机；
6. 蒸馏水或去离子水；封板膜或板盖；乳胶手套；吸水纸；

注意事项：

1. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25℃。使用后立即冷藏保存试剂。
2. 洗板不正确会导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。
3. 消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。
4. 底物显色液应呈无色或很浅的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。
5. 避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。
6. 在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发出来的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反映试剂的生物活性。
8. 标准孔及待测样本均建议做复孔，每次测定应同时做标准曲线，请合理安排预实验。
9. 不能使用过期产品。

样本与试剂准备：

1. **样本：**本试剂盒可检测血清，血浆（EDTA，肝素抗凝），细胞培养上清液，组织匀浆等生物学样本。样本储存要求 2-8℃保存 48 小时以内，更长时间需冷冻（-20℃或-80℃）保存，避免反复冻融。如样本 Rat VEGF 含量过高，可用稀释液 I 进行稀释。
2. **标准品配制：**将 20ng 标准品离心后，加入 1000μL 的稀释液 I 配制成浓度为 20ng/mL 的标准品溶液，轻轻振荡混匀。取 987.5μL 稀释液 I 到空 EP 管中，加入 12.5μL 浓度为 20ng/mL 的标准品，混匀，配成浓度为 250pg/mL 的标准品溶液（标准曲线最高点）；再准备六支 EP 管，分别加入 600μL 稀释液 I，吸取 250pg/mL 的标准品溶液 400μL 加入第一管中，充分混匀，从第一管中取 400μL 加到第二管中，充分混匀，如此反复对半稀释至浓度 1.024pg/mL 的标准品溶液；另取一空白 EP 管加入足量的稀释液 I，设为空白对照。



3. **1×Biotinylated Antibody** : 用稀释液 II 按 1:120 倍稀释 120×生物素化二抗。
4. **1×Streptavidin-HRP Conjugate** : 用稀释液 III 按 1:600 倍稀释 600×亲和链霉素辣根过氧化物酶结合物。
5. **显色液配制** : A 液和 B 液做 1 : 1 配制，即配即用，可根据使用量临时配制（使用前 15 分钟内配制），不要配制过多的显色液。
6. **1×洗涤液配制** : 用蒸馏水 1 : 20 倍稀释（示例：1mL 20×浓缩洗涤液加入 19mL 蒸馏水）；

操作步骤：

样本，细胞上清，细胞裂解液，脑脊液，以及其他生物学样本均需要在正式实验前预实验确认稀释倍数；血清样本一般情况下建议按照 50μL 上样。

酶标板是 12*8wells 的 lockwell 形式，属于单孔可折形式，可以按照自己的需要每次拆下相应的板条来进行实验；如果第一次使用 biotnt 的这款试剂盒，建议您在进行大批量实验之前先进行预实验；

预实验方式：选用 1 条酶标板，加入标准品 250pg/ml，1.024pg/ml，0 孔；另外，再选择您待测的两个样本，第一个样本选择三个稀释梯度；第二个样本选择两个稀释梯度来进行预实验；

实验步骤：

1. 加样：加入相对应标准品 100μL，加入待测样品 50μL、稀释液 I 50ul（样本已经稀释 2 倍回归计算时需乘以稀释倍数 2），封板，充分混匀，室温温育 120 分钟；
2. 洗板：用 1×洗涤液将反应板充分洗涤 3 次，在吸水纸上拍干；
3. 每孔加入已稀释 1× Biotinylated Antibody 100μL，封板，室温温育 60 分钟；
4. 洗板：同第二步；
5. 每孔加 1×Streptavidin- HRP 100μL，封板，室温温育 30 分钟；
6. 洗板：同第二步；
7. 每孔加入已配制的显色工作液 100μL，将反应板置暗处室温 5-15 分钟，目测标准品和样本的板孔变为蓝色，酶标仪 620-630nm 进行读数并保存（第一次数据），标准品

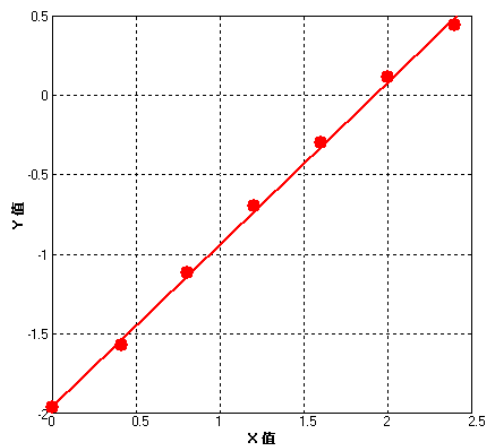
孔的最高点读数 OD 值在 0.7-1.0 之间，可以进行下一步终止反应；

8. 每孔加入 100 μ L 终止液，混匀；如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。
9. 在 5 分钟内进行酶标仪读数，设置双波读数（第二次数据），酶标仪主波长 450nm，副波长 620-630nm 检测吸光度。校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 620-630 nm 的测定值。仅使用 450 nm 测定会导致 OD 值偏高，并且准确度降低。
10. 如果酶标仪没有 620-630nm 的波长，也可以根据酶标仪的情况选择 570-650nm 的波长作为替代。

结果计算与判断：

1. 所有 OD 值都应减除空白值后再计算；先计算 450-630nm 的数据（第二次数据）；
2. 以标准品 250, 100, 40, 16, 6.4, 2.56, 1.024, 0pg/mL 为横坐标，450-630nm 的 OD 值为纵坐标，画出标准曲线。
3. 根据样本 OD 值在该曲线图上查出相对应 Rat VEGF 含量，如样本有稀释，请再乘上稀释倍数。如果样本没有进行预稀释，则稀释倍数为 2。计算出的数值应该乘以 2。
4. 推荐采用双对数方式进行数据拟合。如下是示例数据：

Standard (pg/mL)	O.D. (450 nm-630nm)	Mean	Zero Standard Subtracted (Std.)-(S1)
250pg/ml	2.848,2.855	2.852	2.761
100pg/ml	1.382,1.386	1.384	1.293
40pg/ml	0.592,0.596	0.594	0.503
16pg/ml	0.289,0.294	0.292	0.201
6.4pg/ml	0.166,0.167	0.167	0.076
2.56pg/ml	0.116,0.12	0.118	0.027
1.024pg/ml	0.099,0.104	0.102	0.011
0pg/ml	0.089,0.093	0.091	0



Rat VEGF 标准曲线 (pg/mL)

试剂盒数据批内差 (Intra-Assay) :

选取不同浓度的血浆样本各 3 例在同一次验证实验中加样 20 孔，来验证批内差，检测结果如下：

Sample	1	2	3
N	20	20	20
Mean (pg/mL)	9.25	83.88	166.84
Standard Deviation(pg/ml)	0.58	3.39	6.41
Coefficient of Variation	6.25	4.04	3.84

试剂盒数据批间差 (Inter-Assay) :

选取不同浓度的血浆样本各 3 例在 10 次不同的实验中进行检测，来验证批间差，检测结果如下：

Sample	1	2	3
Sample	1	2	3
N	10	10	10
Mean (pg/mL)	10.25	85.1	169.27
Standard Deviation(pg/ml)	0.91	5.54	9.46

试剂盒灵敏度 (Sensitivity) :

本试剂盒检测 Rat VEGF 的最低浓度为 0.512pg/mL，验证实验选取两条标准品进行梯度稀释确认 0.512pg/mL 以上浓度的反应孔 OD 值呈正相关线性分布，Rat VEGF 浓度在 0.512-1.024pg/ml 之间样本可以被检测到但会有较大偏差，低于 0.512pg/mL 无法被检出。

试剂盒数据回归性 (Recovery) :

选取血清、血浆、细胞上清等不同类型的人样本按低浓度、中浓度、高浓度分组稀释做回归性验证实验，将线性回归后的浓度值与理论浓度值相比较统计结果如下：

样本类型	Average Recovery%	范围%
血清	106	97-115
血浆	100	97-103
细胞上清	100	98-102

试剂盒数据特异性 (Specificity) :

本 ELISA 试剂盒可以检测自然或重组 Rat VEGF 蛋白。本试剂盒不与以下蛋白产生交叉反应：Human VEGF-B。

试剂盒与 Mouse VEGF; Human VEGF(121 and 165 aa.)有 100%的交叉反应率。