

小鼠 VEGF ELISA 试剂盒

产品简介

血管内皮生长因子（VEGF）是特异性最高的血管生成调控因子，可为内皮细胞的迁移和肿瘤细胞的转移提供形态学基础。作为肿瘤基质和毛细血管网形成的基础，VEGF 可抑制肿瘤细胞的凋亡，机制尚不明确。Arcegen Mouse VEGF ELISA（酶联免疫吸附测定）试剂盒是一种体外酶联免疫吸附测定试剂盒，用于定量测定小鼠血清、血浆和细胞培养上清中的血管内皮生长因子（Mouse VEGF）。特异性抗血管内皮生长因子抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入标准品、待测样本，经过孵育，样本中存在的血管内皮生长因子与固相抗体结合。洗涤去除未结合的物质后，加入检测抗体（生物素标记）孵育结合，经洗涤，再加入酶结合物（HRP 标记链霉亲和素）孵育结合。洗涤后，加入显色底物 TMB，避光显色。颜色反应的深浅与样本中血管内皮生长因子的浓度成正比。加入终止液终止反应，在 450 nm 主波长，630 nm 次波长测定吸光度值。

产品信息

货号	P162005S / P162005E
规格	48 T / 96 T
检测范围	6.25~400 pg/mL
检测方法	双抗夹心法
检测物种	小鼠
检测时长	4 小时 30 分钟
灵敏度	0.11 pg/mL
稀释线性	96.7~126.9%
回收率	77.1~124%
板内差	4.4%
板间差	6.33%

组分信息

组分编号	组分名称	保存温度	P162005S	P162005E
P162005-A	酶标板	2~8°C	48 T	96 T
P162005-B	标准品	2~8°C	1 支	2 支
P162005-C	检测抗体	2~8°C	120 μL	240 μL
P162005-D	酶结合物	2~8°C（避光）	30 μL	60 μL
P162005-E	5×稀释液 1	2~8°C	12 mL	25 mL
P162005-F	5×稀释液 2	2~8°C	8 mL	15 mL
P162005-G	20×洗液	2~8°C	25 mL	50 mL
P162005-H	底物液	2~8°C（避光）	8 mL	15 mL

P162005-I	终止液	室温	5 mL	10 mL
P162005-J	封板膜	室温	3 片	5 片

储存条件

试剂盒可全置于 2~8°C 保存，也可按照组分信息中保存条件将试剂依据要求存放，避免污染与反复冻融，稀释成工作浓度试剂即用即弃，不可重复使用。有效期 1 年。

表 1 首次使用后试剂保存表

物料名称	保存条件
酶标板	未使用的板条可放回铝箔袋，严密封口于 2~8°C 保存，避免吸湿
标准品	溶解后 48 小时内用完，2~8°C 保存，避免污染
检测抗体	
酶结合物	稀释后 48 小时内用完，2~8°C 保存，避免污染
5× 稀释液 1	2~8°C 保存 1 个月，避免污染
5× 稀释液 2	
20× 洗液	
底物液	2~8°C 保存 1 个月，需避光
终止液	可室温保存
封板膜	

注意事项

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
2. 试剂盒需在保质期内使用完毕。禁止不同批次的相关试剂进行混用。
3. 本产品仅能够应用于检测说明书中标注的靶点抗原与样本。其它应用需经使用者设计验证后，根据结果评估使用的可靠性与准确性。
4. 不要混合或替代其他试剂盒批次的试剂或材料的供应商。
5. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 用于定量检测血清、血浆、细胞上清中血管内皮生长因子 (Mouse VEGF) 含量。
2. 使用本品前，请仔细阅读说明书。

常见技术提示

1. 样本 OD 值高于 S1 OD 值时，应在适当的样品稀释液中进一步稀释。
2. 混合时避免产生泡沫。
3. 在添加标准品、样本和其他时，要及时更换枪头，避免交叉污染。
4. 在孵育期间，保证酶标板适当密封或封板膜覆盖完全。

5. 请在清洗步骤中完全清除所有溶液和缓冲液。
6. 在溶解标准品之前，请勿将标准品管随意倒置。当将标准品管倒置后，加入缓冲液后请充分上下混匀，然后低速离心。
7. 在实验过程中，试剂按照说明书要求放置。
8. 在实验完成后及时丢弃缓冲液，即用即弃。
9. 不同产品的试剂盒组分不同，不可交叉使用。

其他准备材料

1. 酶标仪，在 450 nm 测量吸光度（参考波长 630 nm）。
2. 恒温箱、自动微孔洗板机。
3. 移液器，1 μ L 到 1 mL 移液枪与配套枪头。
4. 100 mL 和 1 L 刻度量筒。
5. 标准品或样品稀释试管。
6. 吸水纸。
7. 蒸馏水或去离子水。
8. 计算机及分析软件。

实验前准备

1. 样本收集与处理

- 1) 细胞培养上清：1,000 \times g 离心 10 分钟去除沉淀物，即刻检测，或者分装，-20 $^{\circ}$ C 以下保存。
- 2) 血清样本：使用不含热原和内毒素的试管收集血清。血样凝集 30 分钟后，1,000 \times g 离心 10 分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20 $^{\circ}$ C 以下保存。
- 3) 血浆样本：1,000 \times g 离心 30 分钟收集样本。即刻检测，或者分装，-20 $^{\circ}$ C 以下保存。本试剂盒可能适用于其它生物学样本。细胞培养上清、血清和血浆已经过验证。

【注意】检测前，样本中可见的沉淀必须去除。不要使用严重溶血或高血脂的样本。样本应分装并贮存于 -20 $^{\circ}$ C，以避免样本中待测物活性的丢失。如果在 24 小时内检测，样本可以存放在 2~8 $^{\circ}$ C，避免样本的反复冻融。在检测前，冷冻样本应缓慢地恢复至室温（25 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C），轻柔地混匀。

如果样本需要稀释，请使用指定的样本缓冲液进行稀释。

建议正常的血清样本稀释倍数（仅供参考）：20 倍（使用 1 \times 稀释液 1），取 50 μ L 血清样本加入 950 μ L 的 1 \times 稀释液 1 充分混匀即为 20 倍稀释；

建议正常的血浆样本稀释倍数（仅供参考）：20 倍（使用 1 \times 稀释液 1），取 50 μ L 血浆样本加入 950 μ L 的 1 \times 稀释液 1 充分混匀即为 20 倍稀释；

建议细胞培养上清（仅供参考）：原倍。

因样本所含有目标蛋白的含量有差异，每个样本的稀释比例建议根据预实验结果或按实际情况判定。

2. 酶标板准备

酶标板在使用之前需恢复室温。未使用的板条应及时放入干燥剂密封后储存在 2~8°C，建议每个样本复孔实验。

3. 试剂准备

使用前所有试剂以及待测样本需要恢复室温。为了保证实验的准确性，请在使用前 15 分钟内完成。

- 1) 1×洗液配制：浓缩液平衡至室温，充分溶解，不要有结晶。混匀，取 25 mL 20×洗液至蒸馏水中，然后定容到 500 mL；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制。
- 2) 1×稀释液 1 配制：浓缩液平衡至室温，充分溶解，不要有结晶。混匀，取 10 mL 5×稀释液 1 至蒸馏水中，然后定容到 50 mL；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制。1×稀释液 1 用来检测血清/血浆时，稀释标准品、待测血清/血浆样本、检测抗体和酶结合物。
- 3) 1×稀释液 2 配制：浓缩液平衡至室温，充分溶解，不要有结晶。混匀，取 10 mL 5×稀释液 2 至蒸馏水中，然后定容到 50 mL；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制。1×稀释液 2 用来检测细胞培养上清时，稀释标准品、检测抗体和酶结合物。
- 4) 检测抗体 配制：使用前 10000 rpm 离心 20 秒，然后用抗体稀释液以 1:50 稀释至工作浓度使用，如：取 120 μL 用 1×稀释液稀释至 6 mL；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制，充分混匀。
- 5) 酶结合物配制：使用前 10000 rpm 离心 20 秒，然后用酶稀释液以 1: 200 稀释至工作浓度使用，如：取 30 μL，用 1×稀释液稀释至 6 mL；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制，充分混匀。
- 6) 标准品曲线的制备：准备 7 个无菌的 1.5 mL 离心管，按照标准品浓度依次进行标记。S1 制备：取一支标准冻干品用 1×稀释液按标签标示量溶解，充分混匀，即标记其为 400 pg/mL。各离心管分别加入 500 μL 1×稀释液，先取 500 μL S1，加至第一个离心管中充分混匀后，再取 500 μL 至下一个标记浓度的离心管中，充分混匀，进行一系列 2 倍梯度稀释标准品，起始最高浓度标记为 400 pg/mL，最低浓度为 6.25 pg/mL，可按照下面的配制方法来进行。每次试验均需制备相应的标准曲线，不同试剂盒以及不同时间的标准曲线不能混用。样本测试时，每个孔所需标准品量为 100 μL，注意配制体积要高于所需体积，避免使用量不足。

表 2 血管内皮生长因子 (Mouse VEGF) 标准品体系配制 (6.25~400 pg/mL)

标准曲线	样品稀释液 (μL)	标准品添加体积 (μL)	标准品终浓度 (pg/mL)
S1	按标签标示量	/	400
S2	500	500	200
S3	500	500	100
S4	500	500	50
S5	500	500	25
S6	500	500	12.5
S7	500	500	6.25
Blank	500	0	0

实验方法

使用前所有试剂及待测样本需要恢复室温。强烈建议所有的标准品和待检样本进行复孔测定。

1. 试剂准备：备好各种待测试剂、稀释好的标准品和待测样本。
2. 酶标板条确定：计算待测样本和标准品所需酶标板条，将酶标板条从铝箔袋取出，剩余酶标板条放回铝箔袋中并封好袋口，低温保存。
3. 浸泡酶标板：加入 1×洗液（350 μL/孔）浸泡酶标板，静置 30 秒后弃去孔中液体，拍干酶标板。液量对试验结果有重要影响，确保最后一次拍板没有洗液残留。
4. 加样孵育：加入各梯度标准品和已稀释待测样本，100 μL/孔，确保 15 分钟内完成点样，室温孵育 2 小时。
5. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×洗液（350 μL/孔）洗板 3 次，拍干酶标板。
6. 检测抗体孵育：将预先配制至工作浓度的检测抗体加入酶标板中，100 μL/孔，室温孵育 2 小时。
7. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×洗液（350 μL/孔）洗板 3 次，拍干酶标板。
8. 酶结合物孵育：将预先配制至工作浓度的酶结合物加入酶标板中，100 μL/孔，室温孵育 20 分钟。
9. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×洗液（350 μL/孔）洗板 3 次，拍干酶标板。
10. 显色：使用前 10 分钟将底物液恢复至室温，将底物液加入酶标板中，100 μL/孔，室温避光孵育 10 分钟。
11. 终止：加入 50 μL/孔终止液至酶标板中，轻轻震动酶标板至显色均匀。
12. 读值：10 分钟内读取 450 nm/630 nm 的光吸收值。

标曲制定

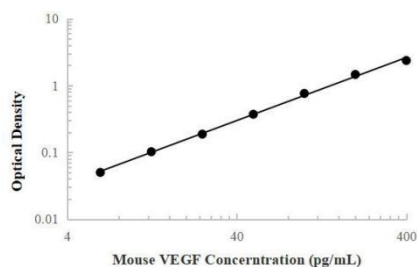
计算标准品和样本复孔的平均 OD 值，并减去空白孔的平均 OD 值作为校准 OD 值。以标准品浓度的对数为横坐标，校准 OD 值的对数为纵坐标绘制标准曲线。多种绘图和统计学软件可以用于辅助绘制标准曲线并进行未知样本浓度的计算。四参数拟合法往往拟合效果较好，其它方法如线性拟合也可能获得较好拟合结果，需要根据具体实验数据进行分析。

实验数据

1. 标曲数据

数据拟合绘制标准曲线，生成的标曲用于实验数据分析。

标准曲线图



浓度 (pg/mL)	显色值		平均值	校准值
400	2.461	2.323	2.392	2.365
200	1.476	1.500	1.488	1.462
100	0.769	0.803	0.786	0.760
50	0.417	0.378	0.397	0.371
25	0.217	0.210	0.213	0.187
12.5	0.125	0.131	0.128	0.102
6.25	0.078	0.074	0.076	0.050
0	0.026	0.026	0.026	/

2. 标曲数据

血管内皮生长因子的最低检测限为 0.11 pg/mL，通过使用重复检测 20 次零孔 OD 值的均值与标准差计算得出。

3. 精密度检测

酶标板内精密度

3 个已知浓度的样本酶标板内重复测定 20 次，评估酶标板内的精密度。

酶标板间精密度

3 个已知浓度的样本酶标板间重复检测 36 次，评估酶标板间的精密度。

项目	板内精密度			板间精密度		
	1	2	3	1	2	3
样本	20	20	20	36	36	36
平均值	9.35	41.89	177.21	9.89	42.80	179.60
标准差	0.36	1.98	8.26	0.81	2.70	8.00
变异系数 (%)	3.84	4.73	4.66	8.21	6.32	4.45

4. 回收率检测

通过不同水平的血管内皮生长因子添加于样本中来测定回收率，其回收率如下：

样本类型	平均回收率 (%)	范围 (%)
血清	88.8	77.1~103.6
血浆	89.5	86.4~91.5
细胞培养上清	110.0	97.1~124.0

5. 稀释线性检测

血清稀释比例	平均期望值 (%)	范围 (%)
--------	-----------	--------

1:02	107.6	105.3~109.5
1:04	112.1	109.9~115.2
1:08	116.3	110.0~124.2
1:16	122.9	112.2~126.9

血浆稀释比例	平均期望值 (%)	范围 (%)
1:02	103.7	102.4~105
1:04	107.6	104.1~111.1
1:08	111.8	111.3~112.4
1:16	122.4	118.5~126.3

细胞培养上清稀释比例	平均期望值 (%)	范围 (%)
1:02	102.8	100.3~105.3
1:04	104.1	104.0~104.2
1:08	99.4	96.7~102.1
1:16	99.1	98.1~100.1

6. 样本值

应用本试剂盒，检测若干样本，背景不详。

样本类型	样本数目	平均值 (pg/mL)	样本值 (pg/mL)
细胞培养上清	10	n.d.	n.d.
血清	10	85.20	58~101
血浆	5	116.80	98~134

n.d. 指样本浓度值低于检测范围内的 6.25 pg/mL

7. 测定特异性

本试剂盒识别天然和重组小鼠血管内皮生长因子。配制 50ng/mL 的下述因子进行了特异性的评估，没有观察到明显的交叉反应和干扰影响。

Recombinant mouse:	Recombinant human:	Other Recombinants:
VEGF R2/Fc Chimera	VEGF121	canine VEGF
	VEGF165	feline VEGF
	VEGF165/PlGF	

检测简图



疑问解答

问题	造成原因	解决方法
标曲不好	移液量不准确	检查移液器,按时校准,仔细操作,充分混匀时盖紧管口并尽量避免泡沫。
	稀释方法不恰当	
显色值偏低	孵育时间太短	给予足够的孵育时间,样本和溶解的标准品隔夜后更换。
	移液量不足或稀释不当	校准移液器和规范操作
CV 偏高	酶标板清洗不当	使用正确的洗涤工序;如果使用洗板机,检查所有的端口是否堵塞。
	受污染的洗液	准备新鲜洗液
灵敏度较低	试剂盒储存不当	按照产品组分表进行保存。