

人 VEGF双抗夹心ELISA抗体对试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: PA00071

规格: 5/10 plates

用途: 此试剂盒用于开发定量检测天然样本和重组样本中人 VEGF浓度的双抗夹心试剂盒

说明: 此试剂盒包含足够的材料, 在满足按说明书叙述方法稀释试剂、按说明书要求操作分析、
使用说明书推荐的耗材及试剂的条件下, 可以在至少5个或10个96孔板上完成ELISA实验

技术提示: 采用高品质的牛血清白蛋白是保证实验质量的关键
可添加适量动物血清来对样本稀释液进行优化

本产品仅用于科学研究, 不适用于临床诊断.

其他所需实验器材

96孔板: 金灿华或赛普

封板膜

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.2-7.4, 0.2 μm filtered

CBS: 15 mM Na₂CO₃, 34 mM NaHCO₃, pH 9.6, 0.2 μm filtered (货号: PR10006)

洗涤液: 0.05% Tween® 20 in PBS, pH 7.2-7.4 (货号: PR10007)

通用稀释液: 0.05% Tween® 20, 1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 μm filtered (货号: PR10008)

显色底物TMB (货号: PK10004)

终止液: 2 M H₂SO₄ (货号: PR10009)

以上材料推荐辅助试剂盒 (货号: PK10029) 包含: 包被液、洗涤液、通用稀释液、双组分TMB显色底物、终止液、板贴、96孔板。也可根据货号单独购买。

试剂盒组分及储存

将未开封试剂盒储存在-20°C, 请勿使用已过期试剂盒

中文名称	规格(5 plates)	规格(10 plates)	配制及储存
人VEGF捕获抗体浓缩液(500×) **	130 μL/支	250 μL/支	具体配制及储存方法 请参照C of A
人VEGF检测抗体浓缩液(500×) **	130 μL/支	250 μL/支	
人VEGF标准品 - 冻干粉状 *	50 ng/瓶	50 ng/瓶 x 2	
HRP标记二抗浓缩液(500×) **	130 μL/支	250 μL/支	

* 使用通用稀释液对标准品进行复溶, 复溶过程避免产生气泡; 复溶后分装成数管冻存于-80°C至-20°C, 避免反复冻融

** 开盖前请离心

实验注意事项

避免皮肤接触终止液以及TMB显色液;

在实验过程中, 注意穿戴个人防护装备, 如实验服, 手套, 口罩和护目镜;

请勿将不同批次的试剂进行混用, 过期产品请勿使用;

在使用自动洗板机时, 板孔加入洗涤液之后, 设置30秒的浸泡程序, 以提高分析的精确度。

试剂准备

兔抗人VEGF捕获抗体(1×):

开盖前瞬时离心, 按1:500比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制(100 μL/孔), 实际配制时应多配制1-2 mL。如24 μL捕获抗体浓缩液(500×)加12 mL CBS稀释液进行配制, 轻轻混匀。

小鼠抗人VEGF检测抗体(1×):

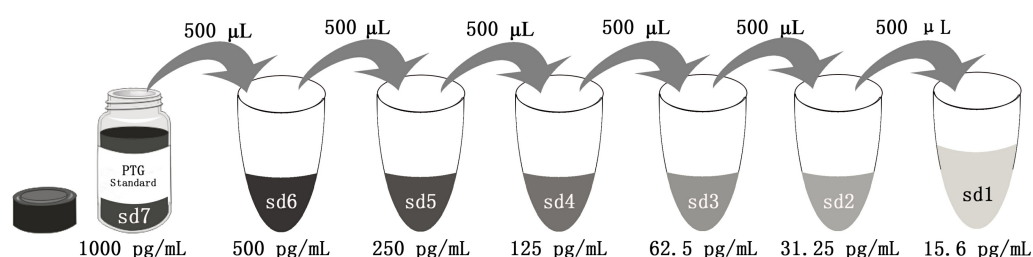
开盖前瞬时离心, 按1:500比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制(100 μL/孔), 实际配制时应多配制1-2 mL。如24 μL检测抗体浓缩液(500×)加12 mL通用稀释液进行配制, 轻轻混匀。

HRP标记二抗(1×):

开盖前瞬时离心, 按1:500比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制(100 μL/孔), 实际配制时应多配制1-2 mL。如24 μL HRP标记二抗浓缩液(500×)加12 mL通用稀释液进行配制, 轻轻混匀。

人VEGF标准品:

使用1 mL通用稀释液复溶标准品并稀释至1000 pg/mL, 用通用稀释液2倍梯度稀释, 具体操作如下:



实验步骤

实验前, 需要将所需试剂在室温平衡20-30 min(抗体浓缩液、HRP标记二抗浓缩液不需要平衡室温, 即用即取); 在进行标准品、样本以及不同试剂加样时, 更换枪头, 避免接触微孔板的内表面, 不同的试剂, 使用不同的加样槽。

1 包被: 每孔加100 μL捕获抗体(1×)(参照试剂准备部分)至96孔板中, 盖上覆膜, 4°C孵育过夜。

2 封闭:

1) 揭开封板膜(动作轻柔, 避免动作过大导致液体溢出串孔), 弃液体, 拍干;

2) 每孔加入200 μL通用稀释液, 盖上覆膜, 37°C孵育2 h;

3 洗涤:

1) 揭开封板膜(动作轻柔, 避免动作过大导致液体溢出串孔), 弃液体, 拍干;

2) 洗涤液洗涤板条, 每孔350-400 μL, 洗涤后, 甩掉液体拍干板条, 重复此步骤4次, 避免异物进入板孔以及板条干燥;

4 加样: 分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL, 余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/孔, 注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔, 尽量避免实验误差, 确保上样不间断, 5-10 min完成加样), 酶标板盖上覆膜, 37°C孵育2 h;

5 重复步骤3;

6 每孔加100 μL检测抗体(1×)(参照试剂准备部分), 盖上封板膜, 37°C孵育1 h;

7 重复步骤3;

8 每孔加100 μL HRP标记二抗(1×)(参照试剂准备部分), 盖上封板膜, 37°C孵育40 min;

9 重复步骤3;

10 显色：每孔加TMB显色液100 μL，37°C避光显色 15-20 min(如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用)；

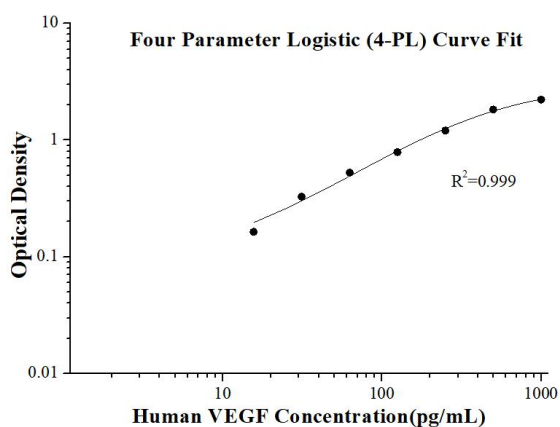
11 终止：每孔加终止液100 μL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；(注意：眼睛和皮肤避免接触终止液)

12 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm波长，也可直接使用450 nm波长读数；

13 数据分析：每个标准品和样品的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL)，根据样品的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

实验参数

参考标曲图



特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人VEGF，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应

Human:

VEGF-B₁₆₇

VEGF-B₁₈₆

VEGF-C

VEGF-D

PIGF

加入50 ng/mL以下细胞因子，有交叉反应

Mouse:

VEGF₁₂₀ 交叉反应约为8.6%

VEGF₁₆₄ 交叉反应约为1.4%

常见问题分析

标准曲线不佳

用于配制稀释液的BSA纯度不佳

标准品储存不当或配制不准确

洗板不完全或加样量不准确

孵育时间或温度不准确

重复性不好

洗板不完全或加样量不准确

试剂混合不均匀

显色低或不显色

用于配制稀释液的BSA纯度不佳

孵育时间或温度不准确

底物加入量不足