Human VEGFA Uncoated ELISA Kit

Catalog No.: RK00023UN

产品简介

本产品使用夹心 ELISA 法检测天然和重组人 VEGFA，所推荐的试剂能适用于大多数细胞培养上清、血清和血浆样品。优化使用的试剂可以改变免疫分析的性能，对含有复杂基质的样品进行稀释优化，例如血清和血浆等，可提高其在本试验中的检测效果。

***本产品仅用于科研，不能用于临床诊断。**在使用本产品之前，请务必阅读产品包装内说明书。

试剂盒组分及保存条件

未拆封的试剂盒储存在 2-8℃不超过 2 个月，如需长时间储存，请置于-20℃储存。不要使用过期的组分。

试剂	规格	货号	数量		工作浓度	试剂保存
			5 plates	10 plates		
人VEGFA捕获抗体 Human VEGFA Capture Antibody (500×)	120 μL/支	RZ21321	1 支	2 支	1/500	最多可于 -20℃保存 12 个月
人VEGFA检测抗体 Human VEGFA Biotin-Conjugate Antibody (500×)	120 μL/支	RZ21319	1 支	2 支	1/500	
人 VEGFA 冻干标准品 Human VEGFA Standard Lyophilized	2000 pg/支	RM00117	10 支	20 支	31.25-2000 pg/mL	
链霉亲和素-HRP（200×） Streptavidin-HRP Concentrated (200×)	300 μL/支	RZ21320	1 支	2 支	1/200	

其他所需的试剂（套装货号：RK04587）也可单独购买

组分	规格	货号	试剂保存
包被液	1 × 20 mL	RM01756	最多可于 2-8℃保存 6 个月
封闭液	1 × 30 mL	RM01757	
标准品/样本稀释液（R1）	1 × 20 mL	RM00023	
检测抗体稀释液（R2）	1 × 12 mL	RM00024	
链霉亲和素-HRP 稀释液（R3）	1 × 12 mL	RM00025	
洗涤液（20x）	1 × 30 mL	RM00026	
显色剂	1 × 12 mL	RM00027	
终止液	1 × 6 mL	RM00028	
封板膜	4 × 1pcs	RM01759	最多可于室温保存 6 个月
酶标板	1 × 96T	RM01758	

***建议使用超纯水稀释洗涤液(20x)，**

上述一些组分可以单独配制：

1. 包被液（PBS）： 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 1.5 mM KH_2PO_4, pH 7.2-7.4, 0.2 μm 过滤。
2. 封闭液：1% BSA, 5% sucrose in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 μm 过滤。
3. 标准品/样本稀释液（R1）、检测抗体稀释液（R2）、链霉亲和素 HRP 稀释液（R3）： 1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 μm 过滤。
4. 洗涤液：0.05% Tween® 20 in PBS, pH 7.2-7.4。
5. 显色剂：试剂 A（H_2O_2）和试剂 B（四甲基联苯胺）以 1：1 比例混合。
6. 终止液：1 N HCL。

实验所需的材料

1. 酶标仪，并配置主波长 450 nm，次波长 630 nm 或 570 nm。
2. 多量程单/多通道移液器及吸头。
3. 去离子水或蒸馏水。
4. 洗瓶或是自动洗板机。
5. 恒温箱。
6. 灭菌的试管或是 EP 管，用于样本或是标准蛋白的稀释。

重要提示

1. 请留意产品标签上的有效期时间，并在有效期前使用本产品。
2. 请勿将不同不批次或者来自不同厂家的试剂混合使用。
3. 实验过程中的加样、洗板、孵育时间、孵育温度等操作均会对最终结果造成影响，请严格管理实验流程并做好记录。
4. 样本的收集、处理及保存均会对检测结果产生影响，请务必严格管理样本的处理过程。
5. 相关试剂中可能存在有害物质，可能导致皮肤过敏反应，避免吸入，使用中请注意佩戴手套，必要时佩戴护目镜。
6. 为保证最佳检测效果，相关试剂组分的保存或使用中请参照标签或说明书，注意避光。
7. 试剂配制后的混匀对检测结果非常重要，但部分蛋白或抗体可能对剧烈的涡旋非常敏感，可能造成活性损失，请谨慎使用涡旋。
8. 在试剂配制及移液过程中，建议使用灭菌的耗材且注意更换，以免造成试剂污染影响最终检测结果。
9. 为保证最佳检测效果，溶解后的标准蛋白及相关试剂的工作液不建议冻存后重复使用。
10. 请严格按照说明书的要求进行试剂配制。

样本收集与保存

1. 细胞培养上清：

   1000 × g 离心 10 分钟，及时检测；或将样本置于-20 至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。如果细胞培养上清样本的稀释度比较大，可先用培养基进行中间的稀释，最后用标准品/样本稀释液(R1)稀释。

2. 血清：

   使用血清分离管，分离血清前让样品凝结 30 分钟，1000 × g 离心 10 分钟并及时检测；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。

3. 血浆：

   收集血浆时用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，在 30 分钟内 1000 × g 离心 15 分钟收集样本，及时检测；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。

4. 避免使用溶血、高血脂血清/血浆样本。

试剂准备

使用前将所需使用的试剂平衡至室温。如果浓缩液中有结晶析出，需要将试剂置于室温轻轻摇动，直至晶体完全溶解。

1. 捕获抗体：

①用包被液稀释捕获抗体至工作浓度，随即加入稀释后的捕获抗体 100μL/孔至 96 孔酶标板中。用封板膜封板，并在 2-8℃下孵育过夜。

②弃去孔内液体，拍干，在每个孔中加入 200 μL 封闭液，37℃下孵育至少 1 小时。

③取出封闭好的酶标板，弃去孔内液体，拍干，用铝箔袋进行抽真空储存。

2. 标准品：

①向冻干品中加入 1 mL PBS 或标准品/样本稀释液（R1）进行复溶，轻轻混匀至少 15 min，按实验需求量取用，剩余标准品分装并保存在-20 至-70℃，避免反复冻融。

②按照标准曲线的浓度用标准品/样本稀释液（R1）进行梯度稀释（建议标准曲线使用以下浓度：2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 pg/mL)。稀释好的标准品在 20 分钟内使用。

3. 检测抗体：

用检测抗体稀释液（R2）稀释检测抗体至工作浓度，按照检测抗体推荐的工作浓度使用。注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。

4. 浓缩链霉亲和素-HRP：用链霉亲和素-HRP 稀释液（R3）将浓缩链霉亲和素-HRP 稀释至工作浓度。注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。

实验步骤

为获得理想的实验结果，请注意，所需使用的试剂在使用前平衡到室温。

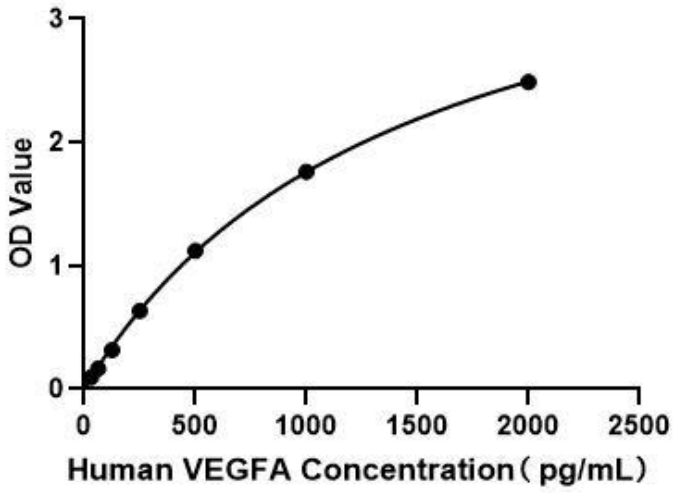
1. 提前准备好所有试剂、即用标准品、样品；使用前 15 分钟配制好检测抗体及链霉亲和素-HRP 工作液。
2. 每孔加入洗涤液 350 μL，静置 40 秒后弃去液体，该步骤共洗涤 3 次，最后一次洗完后充分拍干。
3. 在空白孔中添加 100 μL 标准品/样本稀释液（R1）。在其他孔分别加入 100 μL 不同浓度的标准品或样品，覆膜 37℃孵育 2 小时。
4. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
5. 每孔中加入检测抗体工作液（100 μL/孔），覆膜 37℃孵育 1 小时。
6. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
7. 每孔中加入链霉亲和素-HRP 工作液（100 μL/孔），覆膜 37℃孵育 30 分钟。
8. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
9. 向孔中加入显色剂（100 μL/孔）。 覆膜 37℃下避光孵育 15-20 分钟。
10. 预热酶标仪。
11. 加入终止液（50 μL/孔），并立即放入酶标仪，在 5min 内测定每个孔 450 nm 的 OD 值。 如果可以选择校正波长，则设置为 570 nm 或 630 nm。并从 450 nm 的读数中减去 570 nm 或 630 nm 的读数，这种方式可以校正并去除非显色物质的 OD 值，从而获得更准确的检测结果。如果无法选择校正波长，则获得的读数将偏高，导致读数的准确度下降。

结果计算

1. 计算标准蛋白各浓度、质控、样本等复孔的平均 OD 值，每个测试的 OD 值都应减去空白孔的 OD 值以及次波长的 OD 值；
2. 使用测试获得的 OD 值绘制标准曲线，推荐使用 4-PL 拟合，具体也可根据需求选择其他拟合方式来绘制标准曲线。使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标（Y），相应的 VEGFA 标准品浓度为横坐标（X），绘制标准曲线。样品的含量可根据其 OD 值由标准曲线计算出相应的浓度。
3. 如果样本在上样检测时进行了稀释，那么计算获得浓度需要乘以相应的稀释倍数。

典型数据

此标准曲线图仅供参考，计算实验结果请以实际实验数据进行。



ELISA 常见问题分析及解决方法

问题描述	可能原因	解决方法
高背景值	洗板不充分	按要求充分洗涤，保证洗板时间、次数及每孔加样量无误
	孵育条件不正确	检查孵育时间、温度是否按要求进行
	试剂、样本的交叉污染	注意实验过程中可能造成样本交叉污染的操作；配制新鲜的试剂，重复测试
无信号值或过低的信号值	试剂配制和使用错误	检查试剂配制浓度是否正确，是否按照顺序使用
	酶标仪使用、设置不正确	提前预热；设置正确的主、次波长读数
	显色时间过短	最佳显色时间应控制在 15-25 min
	终止后，未及时读数	加入终止液后，在 5 min 内读数
	样本基质效应	使用阳性质控品对照测试
过强的信号值	TMB 底物变质	检查 TMB 底物是否变蓝，使用新的底物试剂；避免使用金属物质接触底物造成变质失效
	每步实验未更换新的封板膜	每步实验更换新的封板膜
	样本中目标蛋白量过高	预测试，选择适当稀释倍数测试
重复性差	加样量不均一	检查移液器，定期校准
	样本有杂质或沉淀物	样本使用前，请离心样本
	试剂配制未充分混匀	加样前充分混匀试剂