

## Rat VEGF ELISA Kit

### 大鼠血管内皮细胞生长因子 ELISA 试剂盒

产品编号: EK0540

规格: 96T

检测范围: 15.6pg/ml→1000pg/ml。

特异性: 系统和其它细胞因子无交叉反应。

敏感性: <1pg/ml

保存: 2-8℃ (频繁使用时); -20℃ (长时间不用时)。

有效期: 6个月(4℃); 12个月(-20℃)。

用途: 用于体外定量分析大鼠血清、血浆、细胞裂解液、细胞培养上清。

#### 工作原理

血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 是最重要的血管生长因子之一。二个亚单位由二硫键连接, 组成分子量 46-48KDa 的糖蛋白质。大鼠 VEGF 有多个亚型。根据其亚单位所含氨基酸数量的不同, 分别命名为 VEGF120, VEGF164 和 VEGF188 等。本试剂盒所用的标准品为重组大鼠 VEGF164, 有两种分子量, 单链 25KDa, 二聚体 50KDa。

博士德所提供的大鼠 VEGF ELISA Kit 是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒 (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA)。预先包被的抗体为单克隆抗体。检测相抗体为多克隆抗体, 经生物素 (biotin) 标记。样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后, PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲合素反应; 经过 PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 VEGF 呈正相关。

#### 试剂盒中内容 (96 孔)

| 内容                        | 规格     | 数量  |
|---------------------------|--------|-----|
| 预包被抗大鼠 VEGF 抗体的 96 孔板     | 96T    | 1 板 |
| 重组大鼠 VEGF 冻干标准品           | 10ng/管 | 2 管 |
| 生物素标记抗大鼠 VEGF(100X)       | 100ul  | 1 管 |
| 亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) (100X) | 100ul  | 1 管 |
| 样品稀释液                     | 30ml   | 1 瓶 |
| 抗体稀释液                     | 12ml   | 1 瓶 |
| ABC 稀释液                   | 12ml   | 1 瓶 |
| TMB 显色液                   | 10ml   | 1 瓶 |
| 终止液                       | 10ml   | 1 瓶 |
| 洗涤缓冲液(25X)                | 20ml   | 1 瓶 |
| 封板膜                       |        | 4 张 |

**注意: 使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致**



### 需要而未提供的试剂和器材

1. 标准规格酶标仪。
2. 自动洗板机。
3. 恒温箱
4. 系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器。
5. 干净的试管和 Eppendorf 管。
6. 用去离子水将 25X 洗涤缓冲液稀释 25 倍，成 1X 洗涤缓冲液。

### 注意事项

1. 使用前 TMB 显色液应为无色透明溶液，若发现颜色异常，请及时与厂家联系。
2. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
3. 要严格避免操作过程中酶标板干燥。干燥会使酶标板上生物成份迅速失活。
4. 为免交叉污染，要避免重复使用手中的吸头和试管。
5. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂。
6. 本公司提供的 96 孔酶标板是单条可拆型酶标板，用户可按需求使用；剩余的酶标板请按保存条件贮存。
7. 揭封板膜和覆盖封板膜时应避免用力过大导致液体溅出。

### 洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将 1X 洗涤缓冲液至少 300ul 注入孔内，浸泡 1-2 分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

### 样品的准备和保存

样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

细胞培养上清、组织匀浆——离心去除沉淀，立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血清——用干净试管收集血液，室温凝固 2 小时，离心 1500×g 15 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血浆——用干净试管收集肝素、EDTA 或柠檬酸盐抗凝血液，30 分钟内离心，1500×g 15 分钟，收集血浆。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

细胞裂解液——对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后，10000—14000g 离心 3-5 分钟，取上清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

### 样品稀释的一般原则

用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量高、中、低的不同，分别采取不同的稀释方案：



高——指待测因子在 10-100ng/ml。一般按 1: 100 稀释。297ul 样品稀释液加 3ul 样品。

中——指待测因子在 1-10ng/ml。一般按 1: 10 稀释。225ul 样品稀释液加 25ul 样品。

低——指待测因子在 15.6-1000pg/ml。按 1: 2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。

特低——指待测因子 $\leq$ 15.6pg/ml。样品一般不做稀释，或按 1: 2 稀释。

以上方案仅供参考，样品的稀释应有详细记录。

## 试剂的准备和保存

### A. VEGF 标准品的稀释和使用。

试剂盒提供 2 管标准品，每管 10ng，每次使用 1 管。

1. 配制 10,000pg/ml 标准品：取 1ml 样品稀释液加入标准品管内，盖好后静置 10 分钟以上，然后颠倒/搓动以助溶解。
2. 配制 1000pg/ml 标准品：取 100ul 10,000pg/ml 的标准品加入有 0.9ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀，做上标记。
3. 配制 500pg/ml $\rightarrow$ 15.6pg/ml 标准品：准备 6 只 Eppendorf 管，每管加 0.3ml 样品稀释液，分别标记上 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.3pg/ml, 15.6pg/ml。取 0.3ml 1000pg/ml 的标准品加入标记 500pg/ml 的管中，混匀后同样取出 0.3ml，加入下一只管中。余同此类推，直到最后一只样品管。

**注意：**已经稀释的标准品（10,000pg/ml），应在 12 小时内使用。-20℃冷冻保存条件下，2 天内可以使用，但不得反复冻融。

### B. 生物素标记抗大鼠 VEGF 抗体工作液的准备：在使用前 2 小时内准备。

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实际配制时应多配制 100-200ul）。
2. 按 1ul 生物素标记抗大鼠 VEGF 加抗体稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

### C. 亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）工作液的准备：在使用前 1 小时内准备。

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实配时应多配制 100-200ul）。
2. 按 1ul 亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）加 ABC 稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

## 操作程序

已稀释好的 ABC 和 TMB 显色液在加入酶标板孔前都应预先在 37℃中平衡至少 30 分钟。试剂或样品稀释时，**切不可忘记混匀**。每次检测都应该做标准曲线。用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数。

1. 确定本次检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目，并增加 1 孔作为 TMB 空白显色孔。总数=样品数+9；做双份检测时 $\times$ 2。其余重包装好放入冰箱中。
2. 将 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.2pg/ml, 15.6pg/ml 的标准品各 100ul 依次加入一排 7 孔中，1 孔只加样品稀释液的作为零孔。对于血清、血浆、细胞裂解液、细胞培养上清，每孔加 100ul 已用样品稀释液稀释的样品。
3. 酶标板加上封板膜，37℃反应 90 分钟。
4. 反应后用自动洗板机吸去酶标板内的液体；或甩去酶标板内液体，再对着吸水纸拍几下不洗。



- 将准备好的生物素抗大鼠 VEGF 抗体工作液按每孔 100ul 依次加入。(TMB 空白显色孔除外)。酶标板加上封板膜, 37℃反应 60 分钟。
- 1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次浸泡 1 分钟左右 (每孔洗液至少 300ul)。
- 将准备好的 ABC 工作液按每孔 100ul 依次加入 (TMB 空白显色孔除外)。酶标板加上封板膜, 37℃反应 30 分钟。
- 1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次, 每次浸泡 1-2 分钟左右 (每孔洗液至少 300ul)。
- 按每孔 90ul 依次加入已在 37℃平衡 30 分钟的 TMB 显色液, 37℃避光反应 15-20 分钟 (注意: 显色时间供参考, 因用户实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同。此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色, 后 3-4 孔差别不明显)。
- 按每孔 100ul 依次加入终止液, 此时蓝色立转黄色。
- 用酶标仪在 450nm 测定 O.D.值。

有两种设定空白对照的方案:

- (1) 将 TMB 空白显色孔(只加 TMB 显色液和终止液)设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去 TMB 空白显色孔的吸光值后, 在坐标纸上画出曲线, 以吸光值作为纵坐标, 以浓度作为横坐标。
- (2) 将零孔设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去零孔的吸光值后, 得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线。
- 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。用户也可以使用各种应用软件来计算。应记住由于样品稀释了 N 倍, 其实际浓度应该  $\times N$ 。

### 操作程序总结:

- 加样品和标准品, 37℃反应 90 分钟。不洗。
- 加生物素标记抗体, 37℃反应 60 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次。
- 加 ABC, 37℃反应 30 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次。
- TMB 37℃反应 15-20 分钟。
- 加入终止液, 读数。

### 典型数据

TMB 37℃反应 15 分钟。

(数据供参考, 不同用户最佳显色时间会有所不同)

| 浓度   | 0.0pg/ml | 15.6pg/ml | 31.2pg/ml | 62.5pg/ml | 125pg/ml | 250pg/ml | 500pg/ml | 1000pg/ml |
|------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|
| O.D. | 0.003    | 0.088     | 0.147     | 0.290     | 0.586    | 0.986    | 1.683    | 2.179     |

### 参考文献

- Thurston G, Gale NW. Vascular endothelial growth factor and other signaling pathways in developmental and pathologic angiogenesis. Int J Hematol. 2004 Jul;80(1):7-20.
- Tiong A, Freedman SB. Gene therapy for cardiovascular disease: the potential of VEGF. Curr Opin Mol Ther. 2004 Apr;6(2):151-9.
- Alvarez Secord A, Sayer R, Snyder SA, Broadwater G, Rodriguez GC, Berchuck A, Blackwell K. The relationship between serum vascular endothelial growth factor, persistent disease, and survival at second-look laparotomy in ovarian cancer. Gynecol Oncol. 2004 Jul;94(1):74-9.