

目 录

一、背景介绍	1
二、检测原理	1
三、产品组成及储藏条件	1
四、产品注意事项	2
五、不同样本的前处理	2
六、实验准备	2
七、操作步骤	4
八、典型数据.....	6

一、背景简介

Mouse VEGFA 作为 PDGF/VEGF 生长因子家族的成员，通过诱导血管内皮细胞的增殖与迁移，在生理性和病理性血管生成过程中发挥关键作用。在肿瘤生物学中，其表达水平与肿瘤分期及进展密切相关。从分子多样性来看，该基因通过选择性剪接产生多种转录变体。此外，始于上游非 AUG (CUG) 密码子的可变翻译也会产生不同的蛋白质异构体。

二、检测原理

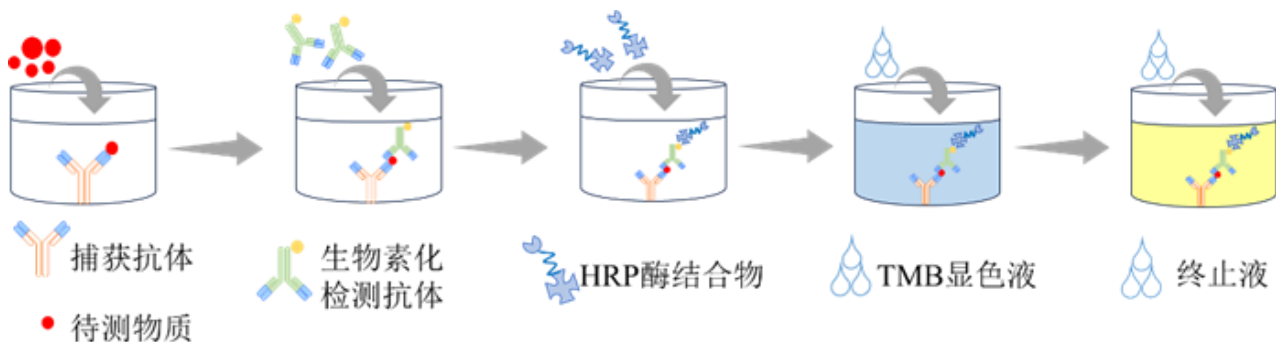


图 1：夹心法模式图

捕获抗体提前包被于 96 孔板上，操作顺序如上图所示。TMB 经 HRP 酶催化后显蓝色，在酸性终止液的作用下转变成黄色，最后用酶标仪读取 OD450nm 处的吸光度值，OD 值的大小与样品（或标准品）中待测物的浓度正相关，以标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘制标准曲线，通过标准曲线准确计算样品中待测物的浓度。

三、产品组成及储藏条件

中英文名称	规格（96T）	规格（48T）	储藏条件
ELISA 酶标板	8*12	4*12	2~8 °C
标准品	2 Vial	1 Vial	2~8 °C
标准品&样品稀释液	1 Vial: 20 mL	1 Vial: 10 mL	2~8 °C
生物素化检测抗体（100X）	1 Vial: 60 μL	1 Vial: 30 μL	2~8 °C
HRP 酶结合物（100X）	1 Vial: 60 μL	1 Vial: 30 μL	2~8 °C
生物素化抗体稀释液	1 Vial: 6 mL	1 Vial: 3 mL	2~8 °C
HRP 酶结合物稀释液	1 Vial: 6 mL	1 Vial: 3 mL	2~8 °C
浓缩洗液（20X）	1 Vial: 20 mL	1 Vial: 10 mL	2~8 °C
TMB 显色液	1 Vial: 12 mL	1 Vial: 6 mL	2~8 °C
终止液	1 Vial: 12 mL	1 Vial: 6 mL	2~8 °C
封板膜	5 张	5 张	2~8 °C

试剂盒不包括以下材料，请自备

- 1) 酶标仪（450 nm 波长滤光片）、摇床。
- 2) 高精度移液枪、离心管、一次性枪头（10 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 1000 μ L）、加样槽、吸水纸。
- 3) 双蒸水或去离子水。

四、产品注意事项

- 1) 实验过程中要做好充足地保护措施（如穿白大褂，佩戴护目镜等）；
- 2) 请勿混用其他批号或其他来源的试剂，过期试剂请勿使用；
- 3) 标准品冻干粉、生物素化检测抗体、HRP 酶结合物含量较少，使用前应短暂离心，且标准品冻干粉在复溶后应尽快使用；
- 4) 建议标准品和样品设置复孔，操作过程中保证试剂加样顺序一致，且每次实验均需重新绘制标准曲线；
- 5) 避免皮肤接触显色液和终止液，终止液加入地顺序要完全和显色液加入地顺序一致；
- 6) 正式实验前应进行预实验，若样品的浓度高于标准品的最高浓度，应对样品进行适当地稀释。

五、不同样本的前处理

- 1) 细胞培养上清：将细胞培养上清转移到无菌的离心管内，离心（3000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}$ C）取上清液待测。
- 2) 血清样本：新鲜收集的全血样本在室温下静置 2 h 或 2~8 $^{\circ}$ C 过夜，离心（3000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}$ C）取上清液待测。
- 3) 血浆样本：将新鲜收集的全血样本加入含抗凝剂（EDTA/柠檬酸/肝素）的离心管内，混匀，离心（3000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}$ C）取上清待测。
- 4) 组织匀浆：用预冷的 PBS 缓冲液（0.01 M, pH7.4）清洗组织，称重后剪碎，加入研磨缓冲液（一般为 PBS，推荐每 1 g 动物组织加入 9 mL PBS，具体比例可根据实际实验需求进行调整），在冰浴条件下进行研磨，得到的组织匀浆可通过超声破碎或反复冻融进一步处理。将制备好的匀浆液离心（5000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}$ C）后取上清液待测。

六、实验准备

1) 试剂回温

实验前半个小时左右，将保存在 2~8 $^{\circ}$ C 的试剂盒拿出平衡至室温。如果试剂盒需要多次使用，仅取出本次实验所需的酶标板和试剂，剩余的酶标板和试剂按照规定的条件贮存，不同试剂盒内的试剂请勿混用。

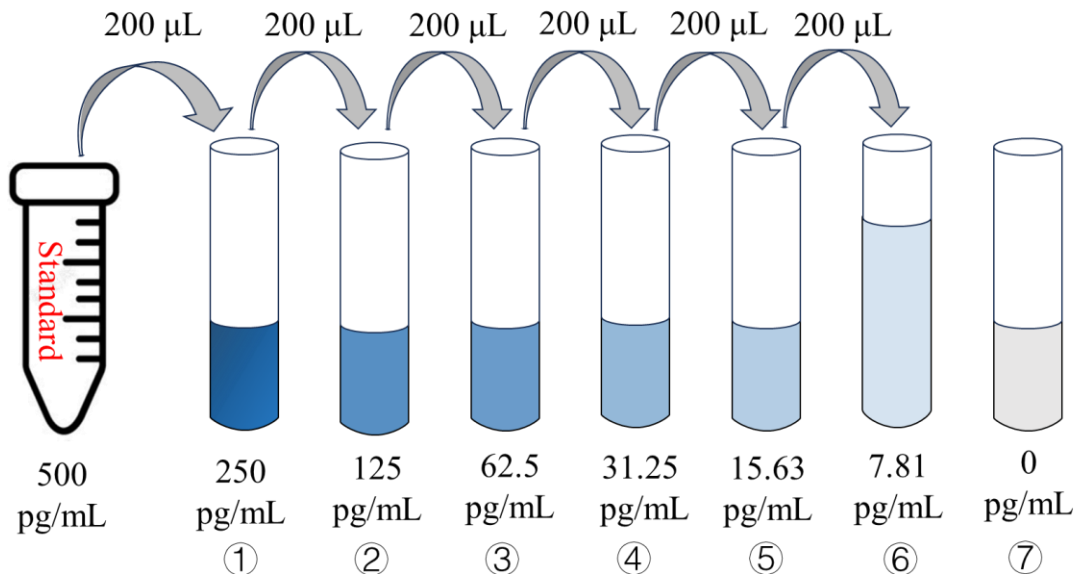
2) 洗液 (1X)

用双蒸水或去离子水按照 1: 19 的比例稀释 **20 X 浓缩洗液**。从冰箱内取出的浓缩洗液若出现结晶属于正常现象，不影响后续实验结果，可用 40 °C 的水浴微微加热使结晶完全溶解后配制洗液。

3) 标准品梯度稀释过程

开盖前对**标准品冻干粉**进行简短离心，加入 1 mL **标准品&样品稀释液**后静置 3 min 左右，用高精度移液枪缓慢吹打或使用低速涡旋仪使其充分溶解。建议标准品的浓度梯度设置为 500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、0 pg/mL。

标准品倍比稀释步骤：取 7 支离心管标记好顺序，每管中加入 200 μ L 标准品&样品稀释液，从原液（500 pg/mL）中取出 200 μ L 加入第一支试管后充分混匀，再从第一支试管取出 200 μ L 加入到第二支试管，以此类推，第七支试管为 200 μ L **标准品&样品稀释液**，具体操作图示如下：



4) 生物素化检测抗体 (1X)

实验前计算好生物素化检测抗体工作液的用量（50 μ L/孔），实际配制时应多配制 100-200 μ L。使用前对**生物素化检测抗体 (100X)**进行简短离心，用**生物素化抗体稀释液**进行稀释（例：1 μ L100X 生物素化检测抗体+99 μ L 生物素化抗体稀释液），注意现配现用。

5) HRP 酶结合物 (1X)

实验前计算好 HRP 酶结合物工作液的用量（50 μ L/孔），实际配制时应多配制 100-200 μ L。使用前对**HRP 酶结合物 (100X)**进行简短离心，用**HRP 酶结合物稀释液**进行稀释（例：1 μ L100X HRP 酶结合物+99 μ L HRP 酶结合物稀释液），注意现配现用。

6) 样品稀释

如果待测样品需要进行稀释，请用试剂盒提供的**标准品&样品稀释液**稀释血清/血浆/组织样本，用细胞培养基稀释细胞培养上清。

七、操作步骤

1) 设定标准孔、样品孔、空白孔。标准孔加入 50 μL 倍比稀释的标准品溶液，空白孔加入 50 μL 标准品&样品稀释液，其余样品孔加入 50 μL 处理好的样品溶液，覆膜（吸附上按压几下），摇床（60 r/min）上室温孵育 2 h；

2) 甩干孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干，每孔加入 275 μL 1X 洗液，浸泡 3 min 后甩干孔内洗液，拍干，此步骤重复三次；

3) 每孔加入 50 μL 稀释好的生物素化检测抗体工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育 1 h；

4) 甩干孔内液体，洗板 3 次，同步骤 2；

5) 每孔加入 50 μL 稀释好的 HRP 酶结合物工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育 1 h；

6) 甩干孔内液体，洗板 3 次，同步骤 2；

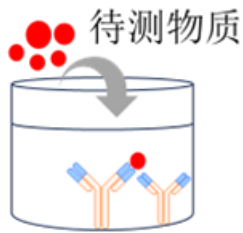
7) 每孔加入 100 μL TMB 显色液，常温下避光反应 5~15 min。**注：具体反应时间可根据实际实验现象调整。**

8) 每孔加入 100 μL 终止液。**注：终止液加入地顺序要和 TMB 显色液加入地顺序一致，加入后轻微震荡酶标板，确保溶液混合均匀。**

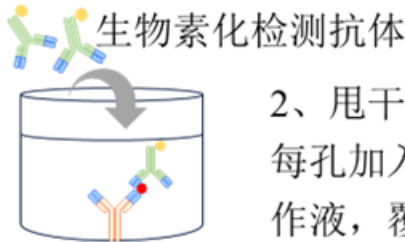
9) 立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度(OD 值)。

10) 数据分析：每个标准品或样品的 OD 值减去空白孔的 OD 值，取平均值，以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用 Origin、ELISACalc 等软件进行四参数拟合，根据拟合出的标准曲线计算出样本浓度（若样本进行稀释处理，还需乘以稀释倍数）。

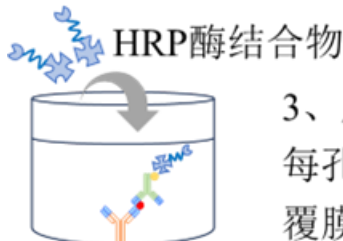
操作流程图



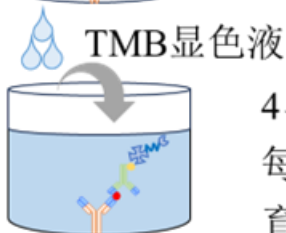
1、向96孔板内加入50 μ L标准品、样品及标准品&样品稀释液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育2 h。



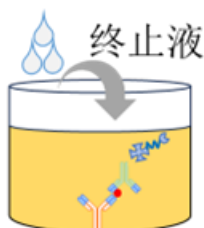
2、甩干孔内液体，拍干，用1X洗液洗板三次。每孔加入50 μ L稀释好的生物素化检测抗体工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育1 h。



3、甩干孔内液体，拍干，用1X洗液洗板三次。每孔加入50 μ L稀释好的HRP酶结合物工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育1 h。



4、甩干孔内液体，拍干，用1X洗液洗板三次。每孔加入100 μ L TMB显色液，室温下避光孵育5~15 min。



5、每孔加入100 μ L TMB终止液，轻轻震荡混匀，用酶标仪在450 nm 波长测量各孔的OD值。

八、典型数据

标准曲线范例：以下数据和曲线仅供参考，实验人员每次实验均需建立标准曲线

