Human VEGF R1/Flt-1 ELISA Kit
检测试剂盒（酶联免疫吸附法）说明书

【货号】EK1117
【包装规格】48T、96T
【预期用途】定量检测血清、血浆和细胞培养上清中的人血管内皮生长因子受体1(VEGF R1)浓度。
【背景介绍】

血管内皮生长因子受体1(VEGF R1)也称为Flt-1，是血管生成因子VEGF(VEGF-A)、胎盘生长因子(PlGF)和VEGF-B的特异性酪氨酸激酶(RTK)受体。根据剪切形式，存在膜型(mbVEGFR)和可溶性(sVEGFR)两种形式。实验和临床上注射sVEGF R1成功地阻止了血管新生和肿瘤生长。在不同的病理条件下，血清/血浆中的sVEGF R1含量有所不同，可能具有诊断价值。在实验和病理条件下，sVEGF R1和VEGF水平相关。在孕妇和原发性高血压患者的血浆中存在高水平的sVEGFR1。心血管疾病患者和吸烟者的血浆中，sVEGF R1水平显著降低。

【检测原理】

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性抗人VEGFR1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、待测样本和生物素化的检测抗体，经过孵育，样本中存在的VEGFR1与固相抗体和检测抗体结合。洗涤去除未结合的物质后，加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Streptavidin-HRP)。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VEGFR1的浓度成正比。加入终止液终止反应，在450nm波长(参考波长570-630nm)测定吸光度值。

【产品组成】

组分	编号	EK1117-48	EK1117-96
酶标板	EK1117P	48T	96T
标准品	EK1117S	1 vial	2 vials
检测抗体	EK1117D	1 vial	1 vial
链霉亲和素	E0290	1 vial	1 vial
10×检测缓冲液	E0310	5 ml	5 ml
显色底物	E0230	6 ml	11 ml
终止液	E0300	11 ml	11 ml
20×洗液	E0281	50 ml	50 ml
封板膜	E0200	6	6

注：不同批号试剂盒中的组分不可以互换使用。如上述组分有任何损坏或遗失，请致电400-6721-600与我们的客服部门联系。未经授权或同意，我们不接受无理由的退货。

完成实验需要但未提供的：

1) 能够检测450nm吸光度的酶标仪，参考波长570nm或630nm，涡旋振荡器、微孔板振荡器；
2) 移液器及枪头、加样槽；试剂用的试管、离心管、量筒等；
3) 蒸馏水或去离子水；

【储存条件及有效期】

2-8℃保存，失效日期参见试剂盒标签；

开封后试剂盒：预包被酶标板2～8℃大约可贮存1个月（未使用的板条请放回铝箔袋，封好封口）；标准品-20℃大约可贮存1个月（重溶使用1次后丢弃）；其它组分在2～8℃大约可以贮存1个月。

【样本处理】

1) **细胞培养上清**：300×g离心10分钟去除沉淀物，即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

2) **血清样本**：离心管收集血清。血样凝集30分钟后，1,000×g离心10分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

3) **血浆样本**：EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。1,000×g离心30分钟收集样本。即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

注意：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。

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℃，以避免待测物质活性的丢失。如果在24小时内检测，样本可以存放在2～8℃。

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℃±3℃），轻柔地混匀。

【检测前准备】

1) **试剂准备**：检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温（25℃±3℃），如果浓缩的试剂出现结晶，37℃温浴，直至结晶全部溶解。显色底物在添加之前应是无色的，请保持显色底物始终处于避光态。

“1×洗液”配制：吸取20×洗液50ml至1L的量筒，加蒸馏水至1,000ml，轻轻混匀，避免泡沫。转移至干净瓶内。2-8℃贮存，1×洗液可稳定保存30天。

“1×检测缓冲液”配制：吸取10×浓缩检测缓冲液5ml至100ml量筒，加蒸馏水至50ml，轻轻混匀，避免泡沫。2-8℃贮存，1×检测缓冲液可稳定保存30天。

“检测抗体工作液”配制：稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用1×检测缓冲液按**1：100**稀释检测抗体。

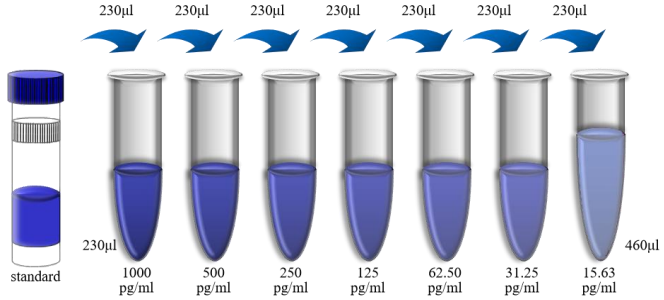
“链霉亲和素工作液”配制：稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用1×检测缓冲液按**1：100**稀释链霉亲和素。

注意：检测抗体工作液、链霉亲和素工作液均应在30分钟内使用。

2) **样本稀释**：为了保证实验成功，由于对样本的处理方式，培养条件等不同，建议首次使用本试剂盒前先进行一次预实验以摸索最佳的样本浓度，避免因浓度过高使显色反应超出酶标仪的检测上限或稀释倍数过大低于试剂盒灵敏度。对于样本的稀释，请用1×检测缓冲液稀释血清/血浆样本，用细胞培养基稀释细胞培养上清。

3) **标准曲线的制备**：开盖前短暂离心，用蒸馏水在聚丙烯管内重溶标准品，重溶体积标注于标准品的标签上。轻柔地涡旋震荡，确保充分混匀，重溶后标准品的浓度为2,000pg/ml。重溶后静置10-30分钟。稀释前充分混匀。

- 血清/血浆样本标准曲线的制备：取230µl重溶后的标准品，加入230µl1×检测缓冲液，作为标准曲线的最高浓度(1,000pg/ml)。在每一个试管中加入230µl1×检测缓冲液。使用高浓度标准品做1：1系列稀释。每次移液时，请确保充分混匀。以1×检测缓冲液作为标准曲线的零浓度。
- 细胞培养上清样本标准曲线的制备：取230µl重溶后的标准品，加入230µl细胞培养基，作为标准曲线的最高浓度(1,000pg/ml)。在每一个试管中加入230µl细胞培养基。使用高浓度标准品做1：1系列稀释。每次移液时，确保充分混匀。以细胞培养基作为标准曲线的零浓度。



注：如若标准品发生部分潮解，此为保存条件变化所致，并不影响组分的使用。1×检测缓冲液中可能会观察到蛋白沉淀，该沉淀不影响使用，可以忽略，或者可通过6,000×g离心5分钟去除沉淀。

【检测方法】

1) 将不需要的板条拆卸下来，放回装有干燥剂的铝箔袋，重新封好封口。**在任何情况下，避免接触微孔板的内表面。**

2) 每个酶标板上待用的孔加入300µl 1×洗液静置浸泡30秒。弃掉洗液之后，在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。

3) 加标准品：标准品孔加入100µl 2倍倍比稀释的标准品。空白孔加入100µl 1×检测缓冲液(血清/血浆样本)或培养基(细胞培养上清样本)。

4) 加样本：**血清/血浆**：样本孔加入80µl 1×检测缓冲液和20µl样本。**细胞培养上清**：样本孔加入100µl细胞培养上清。

5) 加检测抗体：每个待测孔加入50µl“检测抗体工作液”(参见试剂准备)。

6) 应保证标准品、样本和检测抗体的加样在15分钟内完成，是连续的，不能间断。

7) 孵育：使用封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育2小时。**孵育时均应封好封板膜。**

8) 洗涤：弃掉液体，每孔加入300µl洗液洗板，洗涤6次。每次洗板，在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能，必须彻底移除残留液体。

9) 加酶：每孔加入100µl“链霉亲和素工作液”(参见试剂准备)。

10) 孵育：使用新的封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育45分钟。

11) 重复步骤8）。

12) 加底物显色：每孔加入100µl显色底物，避光，室温（25℃±3℃）孵育5-30分钟。

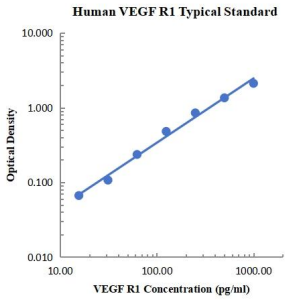
13) 加终止液：每孔加入100µl终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，说明终止液与显色底物没有充分混匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。**终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。**

14) 检测读数：在30分钟之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定450nm最大吸收波长和570nm或630nm参考波长下的OD值。校准后的OD值为450nm的测定值减去570nm或630nm的测定值。仅使用450nm测定会导致OD值偏高，并且准确度降低。

【标准曲线示例】

每次检测，每块酶标板都必须设立标准曲线。下面的标准曲线仅作为示例参考。

pg/ml	O.D.		Average	Corrected
0.00	0.105	0.107	0.106	
15.63	0.148	0.146	0.147	0.041
31.25	0.195	0.189	0.192	0.086
62.50	0.284	0.272	0.278	0.172
125.00	0.439	0.431	0.435	0.329
250.00	0.752	0.740	0.746	0.640
500.00	1.320	1.300	1.310	1.204
1000.00	2.434	2.374	2.404	2.298



【技术要点】

双抗夹心法ELISA试剂盒如何控制标曲显色？

5-30分钟显色时间为经验范围，每个具体的实验，可根据以下情况，确定大致的显色时间：

1) 肉眼观察：标曲S5孔有淡蓝色、Blank孔无明显蓝色时，即可终止；

2) 仪器判断：630nm左右波长下，标曲S1孔的OD值达到0.5-0.7、S5孔的OD值达到0.05-0.08、Blank孔的OD值小于0.05时，即可终止；

3) 高敏系列试剂盒因灵敏度更高，需严格控制显色时长，可较普通试剂盒适当缩短显色时间。

【局限性】

1) 任何标准品稀释、操作人员、移液技术、洗涤技术、孵育温度、试剂盒保存时间的改变，都将影响结合反应。

2) 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

【注意事项】

1) 本试剂盒用于科学研究，不能用于诊断治疗。

2) 所有的样本和试剂理被认为具有潜在危害。实验时佩戴乳胶或一次性手套等防护措施。避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。

3) 只有经过良好实验室培训的工作人员方可使用本试剂盒，请严格按照本说明书操作。

4) 为避免微生物的污染，以及试剂与样本间的交叉污染，请使用一次性枪头，不同的试剂，使用不同的枪头和加样槽；使用干净的容器配制试剂。

5) 请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂；请不要使用过期的试剂；在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。

6) 显色底物避免与氧化试剂和金属接触；暴露于酸性环境会抑制结合。

7) 避免气溶胶的产生。

8) 液体废弃物的处理。不含酸的液体废弃物，加入1.0%的次氯酸钠，浸泡30分钟。含酸的液体废弃物，请先中和，再加入次氯酸钠。

9) 在应用自动洗板机时，加入洗液之后，设置30秒的浸泡程序，或者在不同的洗涤步骤将微孔板掉转180度，这样可以提高分析的准确度。

10) 推荐所有的检测样本和标准品在检测中设复孔。

【基本信息】

生产厂家：杭州联科生物技术股份有限公司

地址：浙江省杭州市萧山区闻堰街道时代大道4887号湘湖科创园15幢1层、2层

技术服务热线：**400-6721-600**

网址：www.liankebio.com