Human VEGFD ELISA Instructions

CAT：EH0340

组分

	CAT	Volume
❶ CP (Coated Plate)	EH0340CP	96 well
❷ S (Standard)	EH0340S,S1~S7,S0	9 vial
❸ DA (Detect Antibody)	EH0340DA	6 ml/bottle
❹ SH (Streptavidin-HRP)	ESH01	12 ml/bottle
❺ AB (Assay Buffer 1×)	EAB01	12 ml/bottle
❻ TS (TMB Substrate)	ETS01	12 ml/bottle
❼ SS (Stop Solution)	ESS01	12 ml/bottle
❽ WB (Wash Buffer 10×)	EWB01	50 ml/bottle
❾ SF (Sealer Film)	ESF01	6 pieces

■ **注:** 试剂盒打开后，各组分可稳定 30 天。

试剂准备

■ 1×洗液制备

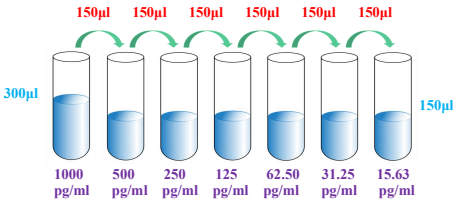
吸取 10×浓缩洗液 50 ml 至 500 ml 量筒，加蒸馏水或去离子水至 500 ml，轻轻混匀。转移至干净瓶内。2-25℃贮存。

■ 标准曲线的制作:

S1 至 S7 和 S0 直接用于血清和血浆样本检测。

其他样品类型，使用样本制备缓冲液（SPB，样品制备缓冲液）制备标准曲线，例如细胞培养上清液，组织研磨液，细胞裂解物等。尿液样品使用 AB（检测缓冲液）制备标准曲线。

人 VEGFD 标准 EH0340S 10000 pg/ml 30 µl + 270 µl SPB 作为高标准（1000 pg/ml）。每个稀释试管中加入 150 µl SPB，使用高标准制备 1：1 稀释系列。在进行下一步转移之前彻底混合每个试管。SPB 用作零标准（0 pg/ml）。



检测步骤

检测之前请将所有的试剂、样本恢复至室温

❶ 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。

❷ 将不需要的**板条**拆卸下来，放回铝箔袋，重新封好封口。

❸ 每孔加入 50 µl **检测缓冲液（AB）**。

❹ 加入 50 µl 或 10 µl 的标准品（S）、样本。保证连续加样，请不要间断。加样过程在 15 分钟内完成。

❺ 每孔加入 50 µl **检测抗体（DA）**。

❻ 使用**封板膜（SF）**封板。500 转/分钟振荡，室温孵育 1 小时。

❼ 弃掉孔内液体，每孔加入 300 µl **洗液**洗板，洗涤 4 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。

❽ 加入 100 µl **辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素（SH）**。

❾ 使用新的**封板膜（SF）**封板。500 转/分钟振荡，室温(18-25℃)孵育 30 分钟.

❿ 重复步骤 7。

⓫ 每孔加入 100 µl **显色底物 TMB（TS）**，室温孵育 5-30 分钟。

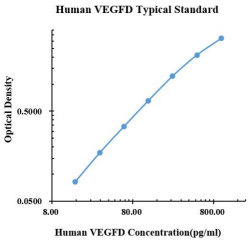
⓬ 每孔加入 100 µl **终止液（SS）**。

⓭ 在 30 分钟之内，**酶标板** 450 nm 波长测定 OD 值，校正波长设定为 570 nm 或者 630 nm。

攸克生命科学技术（杭州）有限公司

典型数据

每一次的检测，每一块微孔板都必须设立标准曲线。下方标准曲线仅作为示例展示。



pg/ml	O.D.		Average	Corrected
0.00	0.0241	0.0249	0.0245	
15.63	0.1064	0.1080	0.1072	0.0827
31.25	0.2020	0.1917	0.1969	0.1724
62.50	0.3535	0.3726	0.3631	0.3386
125.00	0.7002	0.6523	0.6763	0.6518
250.00	1.2830	1.2150	1.2490	1.2245
500.00	2.0660	2.1710	2.1185	2.0940
1000.00	3.2990	3.1610	3.2300	3.2055

灵敏度

人 VEGFD 的最低可检测浓度为 0.08 pg/ml(50 μl 上样量)或 0.49 pg/ml(10 μl 上样量)。

10 个零浓度空白值 OD 的平均值加上两个 SD，计算最低可检测浓度。

精密度

■ 酶标板内精密度：3 个已知浓度的样本酶标板内重复测定 22 次，评估酶标板内的精密度。

■ 酶标板间精密度：3 个已知浓度的样本酶标板间重复检测 6 次，评估酶标板间的精密度。

	酶标板内精密度			酶标板间精密度		
样本数量	S1	S2	S3	S1	S2	S3
	22	22	22	6	6	6
平均值（pg/ml）	19.7	94.6	305.1	20.0	96.5	312.6
标准差	0.6	2.6	9.8	0.7	3.2	14.1
变异系数（%）	3.2	2.8	3.2	3.3	3.3	4.5

回收率

健康人血清加入 3 个不同浓度水平的人 VEGFD，未加入人 VEGFD 的血清作为本底，计算回收率。

回收率的范围从 80%至 97%，平均回收率为 89%。

稀释线性

5 份健康人血清加入高浓度的人 VEGFD，并在标准曲线的动力学范围内进行系列稀释，评估检测的线性。

线性范围为 82%至 94%，总体平均回收率为 88%。

样本值

应用本试剂盒，检测 30 份健康志愿者血清样本。

样本类型	检测样本数量	浓度范围 (pg/ml)	可测百分率 (%)	可测样本平均浓度 (pg/ml)
血清	30	158.06-415.47	100	264.05

n.d. =测不到浓度值。样本的浓度值低于灵敏度被认为测不到浓度值。