优品生物
UpingBio

(For scientific research use only, not for clinical diagnosis!)

Human vascular non-inflammatory protein 3 (VNN3) quantitative detection kit (ELISA) instruction manual

Specification: 96T/48T Catalog number: SYP-H2075

Purpose: Used to detect non-inflammation of human blood vessels in serum, plasma, cell culture supernatant and other samples

Concentration of protein 3 (VNN3).

Please read the instructions carefully before use. If you have any questions, please contact us via:

Official hotline: 400-999-8863

Technical phone number: 18358180525

Email: UpingBio@163.com

Company website: www.upingbio.com **For specific shelf life, please refer to the outer packaging label of the kit. Please use the kit within the shelf life. When contacting us, please provide the product number and production date (see box label) so that we can serve you more efficiently.**

[Kit performance]

Physical properties: Each liquid component is clear and transparent, with no sediment or floc. Microplate aluminum foil bags should be vacuum packed without damage or leakage.

Calibration curve linearity: The correlation coefficient r value of the calibrator dose-response curve is greater than or equal to 0.9900. Precision: intra-batch variation coefficient CV% is less than 10%; inter-batch variation coefficient CV% is less than 15%. Sensitivity: The lowest detectable dose is less than 0.078 ng/ml.

Recovery rate: The recovery rate is between 85%-115%.

Sensitivity: This kit recognizes native human vascular non-inflammatory protein 3 (VNN3) and has no crossover with structural analogs.

Stability: Stored at 2℃-8℃, validity period is 6 months.

Detection range: 0.312 ng/ml – 10 ng/ml.

【Experimental principle】

本试剂盒采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）。在预包被抗 人血管非炎性蛋白 3(VNN3)抗体（固相抗体）的微孔酶标板中，加入人血 管非炎性蛋白 3(VNN3)校准品和待测样本，再加入生物素标记抗体，经过 温育与充分洗涤后，再加入 HRP 偶联的亲和素，经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，在微孔板固相表面形成固相抗体-抗原-生物素标记抗 体-亲和素酶的夹心复合物。加 TMB 显色液，产生蓝色产物，在终止液作 用下，最终转化为黄色，在酶标仪 450nm 波长上测定吸光度（OD 值），吸光度（OD 值）与待测样品中人血管非炎性蛋白 3(VNN3)的浓度正相关。拟合校准品曲线，可以计算出样本中人血管非炎性蛋白 3(VNN3)的浓度。

【试剂盒组分与保存】

组分		数量	主要成分
校准品	High Standard	2 vial	校准品冻干粉
校准品复溶液	Reconstitution	2 vial	PBS
校准品＆样本稀释液	Standard ＆ Sample Diluent	25mL	PBSTN
包被微孔板	Microelisa Stripplate	96T/48T	预包被固相抗体
生物素抗体	Bio-Antibody	10mL	生物素抗体
HRP 标记亲和素	HRP-Conjugate	10mL	HRP 标记亲和素
TMB 显色液	TMB	10mL	TMB
终止液	Stop Solution	6mL	酸性溶液
20×浓缩洗涤液	20X Wash Solution	25mL	0.05%Tween20
说明书	说明书	1 份	--
自封袋	自封袋	1 个	--
不干胶	不干胶	4 片	--

注意：1、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。

2、试剂盒 2-8℃保存，不得使用过期试剂盒。

3、包被微孔板单次未使用完，要谨记密封放到 2-8℃保存。

4、复溶后的校准品仅限当天使用。

5、如果试剂盒的组份需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

试验所需自备试验器材 (不提供，但可协助购买)

1、标准规格酶标仪。

2、自动洗板机。

3、振荡器。

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。

【试剂盒限制性】

1、仅供科研使用，不得用于临床诊断。

2、在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。

3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。

4、使用试剂盒配套的样品稀释液。

5、如果样本值高于最高校准品浓度值，请将样本适当稀释后，再重新测定。 6、待测样本中存在的人抗鼠等异嗜抗体会干扰检测结果，检测前，请 排除该因素。

7、通过其他方法得到的检测结果，与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

【注意事项】

1、本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

2、试验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。特别是检测血液 或者其他体液样品时，请按国家生物试验室安全防护条例执行。

3、严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都 必须在使用前达到室温 20-25℃。使用后立即冷藏保存试剂。

4、洗板不正确可能导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔 内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。

5、消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。

6、底物显色液应呈无色或很浅的颜色。

7、避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。

8、在储存和温育时避免强光直接照射。

9、平衡至室温后再打开密封袋以防水滴凝聚在冷板条上。

10、任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反应试剂的生物活性。

11、检测使用的酶标仪需要安装能检测 450±10nm 波长的滤光片，

Optical density ranges from 0-3.5. It is recommended to preheat 15 minutes in advance before use.

12. Do not mix or replace the reagents in this kit with reagents from other batch numbers or other sources. 13. The EP tubes and suction tips used in the test are single-use and are strictly prohibited from mixing.

14. Do not use expired reagents.

【Sample preparation and storage】

The following lists only general guidelines for sample collection and preservation. During the collection and storage of all samples, sodium azide must not be used as a preservative. If the sample is not analyzed immediately, it should be aliquoted and stored frozen, and repeated freezing and thawing should be avoided.

Cell culture supernatant: centrifuge to remove precipitate, analyze immediately or aliquot and store frozen at -20°C.

Serum: Collect blood in a clean test tube, coagulate at room temperature for 30 minutes, centrifuge at 2000×g for 20 minutes, and collect serum. Analyze immediately or aliquot and store frozen at -20°C.

Plasma: Anticoagulate with heparin, citrate or EDTA, and centrifuge at 2000 × g for 20 minutes at 2-8°C within 30 minutes of blood drawing. To eliminate the influence of platelets, it is recommended to further centrifuge at 10,000 × g for 10 minutes at 2-8°C. Analyze immediately or aliquot and store frozen at -20°C.

Cell lysis medium: For adherent cells, remove the culture medium and replace with PBS, physiological saline or blood-free

Wash with culture medium. Add an appropriate amount of lysis solution and pipet several times to ensure full contact between the lysis solution and cells. Typically after 10 seconds, cells are lysed. For suspended cells, collect the cells by centrifugation and wash them once with PBS, physiological saline or serum-free culture medium. Add an appropriate amount of lysis solution, pipet with a pipette to disperse the cells, and flick with your fingers to fully lyse the cells. After full lysis, centrifuge at 10000-14000×g for 3-5 minutes and take the supernatant. Analyze immediately or aliquot and store frozen at -20°C.

Urine: Collect in sterile tubes and centrifuge at 2000×g for 20 minutes. Carefully collect the supernatant. If a precipitate forms, centrifuge again.

【Reagent preparation】

1. Before use, all components must be rewarmed for at least 120 minutes to ensure full rewarming to room temperature.

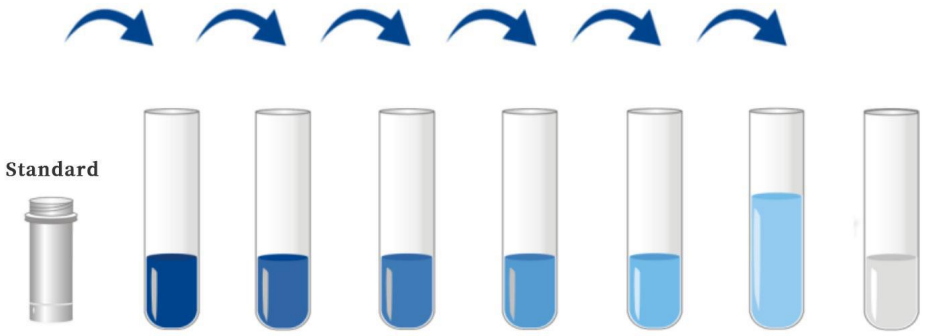
2. Concentrated washing liquid: The concentrated washing liquid taken out from the refrigerator will produce crystals. This is a normal phenomenon. Heating

in a water bath will completely dissolve the crystals. Concentrated detergent and distilled water, dilute 1:20, that is, 1 part of concentrated detergent, add 19 parts of distilled water.

[Calibration dilution method]

校准品重溶步骤：用校准品复溶液重溶校准品，将一瓶校准品复溶液中的液体，全部加入到一瓶的校准品冻干粉中，轻柔地涡旋震荡，确保充分混匀，重溶后校准品的母液浓度为 **20 ng/ml** ,稀释前充分混匀。

校准品母液稀释步骤：稀释前校准品工作液静置 **1-2** 分钟，用校准品＆样本通用稀释液将校准品母液进行倍比稀释，倍比稀释方法：取 **7** 支 **EP** 管，每管中加入 **500 μL** 校准品＆样品稀释液，从 **20 ng/ml** 的校准品母液中吸取 **500 μL** 到第一支 **EP** 管中混匀配成 **10 ng/ml** 的校准品工作液，按此步骤往后依次吸取混匀。如下页图示。



20 ng/ml

校准品建议稀释浓度：建议配制成以下浓度：**10**、**5**、**2.5**、**1.25**、**0.625**、

0.312、0 ng/ml，并作为拟合标曲的校准品浓度值。

提示：最后一管直接加入校准品＆样本通用稀释液作为 0 值，不需要再从倒数第二管中吸取液体。倍比稀释的校准品工作液需要现配现用。

【操作程序】

推荐样本稀释方案：建议老师先做预实验摸索样本最佳稀释倍数，然后再做正式实验。

所有试剂和组分都先恢复到室温，校准品、质控品和样品，建议做复孔。

1、按前面说明书描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。

2、从铝箔袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。

3、设置校准品孔、样本稀释液孔、空白孔和样本孔，校准品孔各加不 同浓度的校准品 50μL，样本稀释液孔加样本稀释液 50μL，空白孔不加，样本孔加待测样本 50μL。除空白孔外，每孔加入生物素抗体 100uL，用 封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光温育 60min。

4、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置

1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复 5 次。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡 30s 的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。

5、除空白孔外，每孔加入 HRP 标记亲和素 100uL，用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光温育 20min。

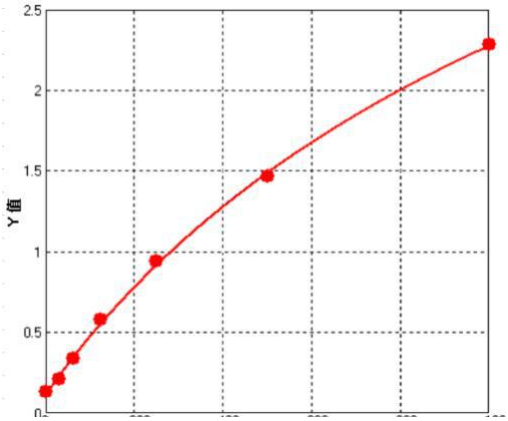
6、重复步骤 4。

7、所有孔中加入 TMB 显色液 100μL。用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光温育 15min。

8、所有孔加入终止液 50μL，在 450nm 波长酶标仪上读取各孔吸光度（OD 值）。

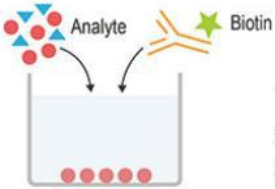
【结果计算】

1、以校准品浓度做为横坐标，对应的吸光度（OD 值）作为纵坐标，利用计算机软件，采用四参数 Logistic 曲线拟合（4-pl），创建标准曲线方程，通过样本的吸光度（OD 值），利用方程计算样品的浓度值。【用 ELISA Calc 软件计算】2、如果样品被稀释，通过上述方法测的的浓度值，要乘以稀释倍数，才 是样品的最终浓度。



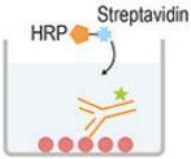
（示意图，仅供参考）

【操作概要】

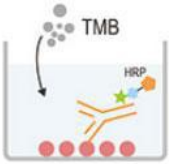


1、反应板孔中加入50uL校准品工作液或样本后,立即每孔加入100uL生物素化抗体工作液，37℃孵育60分钟。

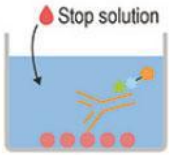
2、弃掉板内液体，洗板5次。



3、每孔加入100uL HRP酶结合物工作液37℃孵育20分钟，弃掉板内液体，洗板5次。



4、每孔加入100uL TMB显色液，37℃孵育 15分钟。



5、每孔加入 50uL 终止液。

6、立即在 450nm波长下读数，处理数据。

【问题分析】

问题描述	可能原因	相应对策相应对策
阴阳性对照 结果不稳定	吸液或加液不准	检查移液器及吸头
	平衡时间太短	保证充足的平衡时间
	洗涤不完全	保证洗涤时间和洗涤次数 及每孔的加液量
显色很弱或 无色	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	实验温度不正确	使用推荐的实验温度
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程，保证 所有试剂按顺序
	稀释不正确	
	酶标记物失活或底物失效	混合酶结合物和底物，通过 迅速显色来检查
读数数值低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长及滤 光片设置
		提前打开酶标仪预热
变异系数大	加液不正确	检查加液情况
背景值高	检测抗体的工作浓度过	使用推荐的稀释倍数
	酶标板洗涤不完全	保证每步清洗完全；如果用 自动洗板机，请检查所有 的出口是否有堵塞；是否使 用
	洗液有污染	配制新的洗液
灵敏度低	ELISA 试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试 剂
	读数前未终止	OD 读数前应在每孔中加 入终止液

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保存实验数据，保留所用板条及未使用试剂，然后联系我公司技术支持为您解决问题。

【声明】

1、限于现有条件及科学技术水平，尚不能对所有原料进行全面的鉴定 分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。

2、本试剂盒在研发过程中去除/降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能影响的因素均已去除。

3、最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实 验环境等因素密切相关，本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒 所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本可能的使用量，预留充足的样本。

4、为了达到好的实验结果，请只使用本公司试剂盒内提供的试剂，不 要混用其他制造商的产品，严格按照说明书操作。

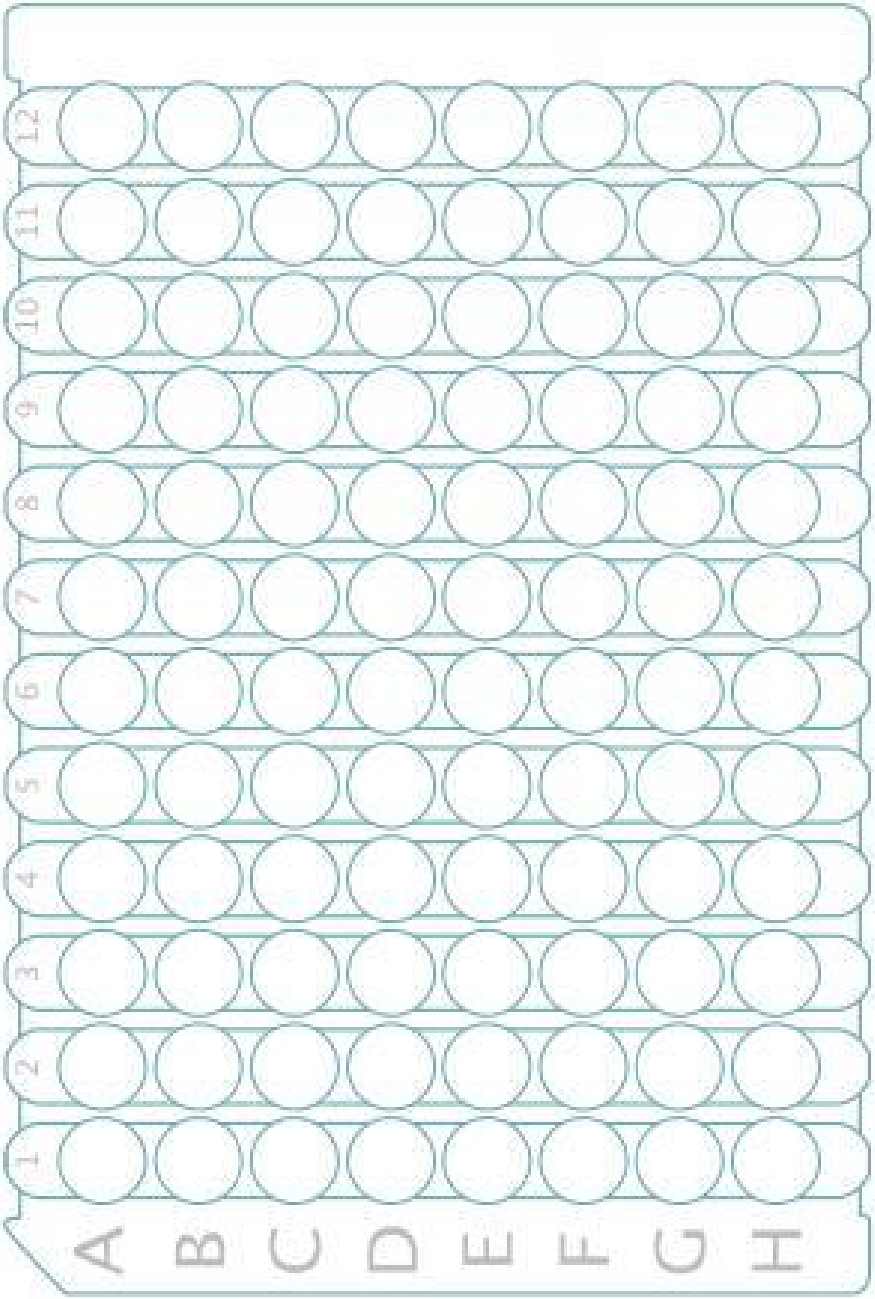
5、由于操作过程中试剂制备以及酶标仪参数设置不正确，可能导致结 果异常，实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器。

6、即使是相同人员操作也可能在两次独立实验中得到不同的结果，为 保证结果的重现性，需要控制实验过程中每一步的操作。

7、试剂盒发货前会经过严格的质检，然而，因为运输条件、实验设备 差异等等因素影响，用户检测结果可能跟出厂数据不一致。

8、本试剂盒未与其他厂家同类试剂盒或不同方法检测同一目的物的产 品进行对比，所以不排除检测结果不一致的情况。

9、试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公 司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
A
B
C
D
E
F
G
H

【实验心得】

【实验心得】