

(SADECE ARAşTIRMA KULLANIMI İÇİNDİR. KLİNİK TANIDA KULLANMAYIN!)

Katalog No: ER21487

## Sıçan VEGFA (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A) ELISA Kiti Kullanım Kılavuzu

Deney sırasında herhangi bir sorunuz varsa veya daha fazla yardıma ihtiyacınız olursa lütfen aşağıdaki yöntemlerle bizimle iletişime geçmekten çekinmeyin:

✉ E-posta (Emir) order@enkilife.com

✉ E-posta (Teknik Destek) techsupport@enkilife.com

☎ Tel: 0086-27-87002838

🌐 Web sitesi: www.enkilife.com

**Raf ömrü:** Lütfen dış ambalaj üzerindeki etikete bakınız.

**Teknik Destek:** Size daha iyi hizmet verebilmemiz için lütfen dış paketin etiketindeki parti numarasını bize bildiriniz.

## Ürün Açıklaması

Bu ELISA kiti, serum, plazma ve diğer biyolojik sıvılardaki Fare VEGFA konsantrasyonlarının in vitro kantitatif tayini için geçerlidir.

## Temel Özellikler

- Duyarlılık: 6.3pg/mL.
- Tespit aralığı: 15.6-1000pg/mL.
- Özgüllük: Diğer analoglarla belirgin bir çapraz reaksiyona girmeden örneklerde Fare VEGFA 'sini tespit edebilir.
- Tekrarlanabilirlik: Plakalar arası ve plakalar içinde varyasyon katsayısı %10'dan azdır.

## Test Prensibi

Bu ELISA kiti Sandviç-ELISA prensibini kullanır. Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, Sıçan VEGFA'sına özgü bir antikora önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler mikro ELISA plakası kuyularına eklenir ve özgül antikora birleştirilir. Ardından, Sıçan VEGFA'sına özgü biyotinlenmiş bir tespit antikoru ve Avidin-Yaban Turpu Peroksidaz (HRP) konjugatı her bir mikro plaka kuyusuna sırayla eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanır. Her bir kuyuya substrat çözeltisi eklenir. Yalnızca Sıçan VEGFA'sı, biyotinlenmiş tespit antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyular mavi renkte görünür. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve renk sarıya döner. Optik yoğunluk (OD), 450 nm  $\pm$  2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri, Sıçan VEGFA konsantrasyonuyla orantılıdır. Numunelerdeki Rat VEGFA konsantrasyonunu, numunelerin OD'sini standart eğri ile karşılaştırarak hesaplayabilirsiniz.

## Bileşenler ve depolama

Ürünü açılmadan önce 2-8°C'de saklayın. Teslim aldıktan sonra ambalajını hemen açın ve talimatlarda önerildiği şekilde saklayın.

| Bileşenler                                        | Özellikler                    | Depolama ve Notlar                 |                                                                                                               |
|---------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mikro Plaka</b><br>(Micro Plate)               | 96T: 8 kuyu $\times$ 12 şerit | <b>Açılmamış:</b><br>-20°C, 12 ay  | <b>Kullanılmayan:</b><br>Tekrar alüminyum folyo poşete koyup ağzını kapatın, -20°C'de saklayın.               |
|                                                   | 48T: 8 kuyu $\times$ 6 şerit  |                                    |                                                                                                               |
| <b>Referans Standardı</b><br>(Reference Standard) | 96T: 2 şişe                   | <b>Çözülmemiş:</b><br>-20°C, 12 ay | Lütfen her deney için taze çözünmüş standartlar kullanın . Çözündükten sonra kullanılmayan standartları atın. |
|                                                   | 48T: 1 şişe                   |                                    |                                                                                                               |

|                                                                                                     |                   |                               |                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Biyotinlenmiş Tespit Ab Konsantresi (100×)</b><br>[Biotinylated Detection Ab Concentrate (100×)] | 96T: 120µL×1 şişe | -20°C, 12 ay                  | <b>Kullanılmamış:</b> Lütfen konsantreyi kapatın ve -20°C'de saklayın ve çalışma solüsyonunu atın. |
|                                                                                                     | 48T: 60µL×1 şişe  |                               |                                                                                                    |
| <b>HRP Konjugat Konsantresi (100×)</b><br>[HRP Conjugate Concentrate (100×)]                        | 96T: 120µL×1 şişe | -20°C(Işıktan koruyun), 12 ay | <b>Kullanılmamış:</b> Lütfen konsantreyi kapatın ve -20°C'de saklayın ve çalışma solüsyonunu atın. |
|                                                                                                     | 48T: 60µL×1 şişe  |                               |                                                                                                    |
| <b>Referans Standardı ve Numune Seyreltici</b><br>(Reference Standard & Sample Diluent)             | 20 mL×1           | 2-8°C, 12 ay                  |                                                                                                    |
| <b>Biyotinlenmiş Tespit Ab Seyreltici</b><br>(Biotinylated Detection Ab Diluent)                    | 14mL×1            |                               |                                                                                                    |
| <b>HRP Konjugat Seyreltici</b><br>(HRP Conjugate Diluent)                                           | 14mL×1            |                               |                                                                                                    |
| <b>Yıkama Tamponu Konsantresi (25×)</b><br>[Wash Buffer Concentrate (25×)]                          | 30mL×1            |                               |                                                                                                    |
| <b>Substrat Reaktifi (TMB)</b><br>[Substrate Reagent(TMB)]                                          | 10mL×1            | 2-8°C(Işıktan koruyun),12 ay  |                                                                                                    |
| <b>Durdurma Çözümü</b><br>(Stop Solution)                                                           | 7mL×1             | 2-8°C/Oda sıcaklığı           |                                                                                                    |
| <b>Plaka Muhafazası</b>                                                                             | 5 parça           |                               |                                                                                                    |
| <b>Ürün kılavuzu</b>                                                                                | 1 kopya           |                               |                                                                                                    |
| <b>Analiz Sertifikası</b>                                                                           | 1 kopya           |                               |                                                                                                    |

Not:

Lütfen reaktifin buharlaşmasını ve mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için tüm reaktif şişelerinin kapaklarının sıkıca kapatıldığından emin olun.

Gerçek hacim, etikette belirtilen hacimden biraz daha büyük olacaktır. Lütfen doğrudan dökmek yerine hassas ölçüm cihazları kullanın.

## Deneme Prosedürleri



1. Her kuyucuğa 100 µL standart veya numune ekleyin, 37°C'de 90 dakika inkübe edin.



2. Sıvıyı atın, her kuyucuğa 100 µL Biotinlenmiş Tespit Ab çalışma solüsyonu ekleyin. 37°C'de 60 dakika inkübe edin.



3. Plakayı 3 kez aspire edin ve yıkayın.



4. 100 µL HRP konjugat çalışma solüsyonu ekleyin. 37°C'de 30 dakika inkübe edin. Aspire edin ve plakayı 5 kez yıkayın.



5. 90 µL Substrat Reaktifi ekleyin. 37°C'de 15 dakika inkübe edin.



6. 50µL Durdurma Solüsyonu ekleyin.



7. 450nm'de okumalar. Sonuçların hesaplanması.

## Çalışma yöntemi

### Önlemler

1. Deney sırasında lütfen koruyucu ekipman giyin. Kan örnekleri veya diğer biyolojik örneklerle temasta bulunurken Biyolojik Laboratuvar Güvenliği Koruma Yönetmeliği'ne göre biyogüvenlik korumasına dikkat ediniz .
2. Farklı partilerdeki kit bileşenleri karıştırılamaz (Stop Solution hariç).

3. Deneyde kullanılan EP tüpleri ve pipet uçları tek kullanımlıktır, lütfen karıştırmayınız .
4. Yeni açılan ELISA plakasının kuyucuklarında az miktarda su benzeri madde bulunabilir. Bu normal bir durumdur ve deney sonuçlarını etkilemez. Geçici olarak kullanılmayan şeritler yedek bir alüminyum folyo torbaya konulmalı ve gerekli saklama koşullarına göre saklanmalıdır.
5. Seyreltilmiş standart, biyotinlenmiş antikor çalışma solüsyonu ve enzim konjugatı çalışma solüsyonunu tekrar kullanmayın.
6. Kullanılmamış Biotinylated Detection Ab Concentrate (100×), HRP Conjugate Concentrate (100×) ve diğer orijinal solüsyonlar gerekli depolama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
7. ELISA okuyucusunun  $450\pm 10\text{nm}$  dalga boyunu tespit edebilen bir filtre ile donatılmış olması gerekmektedir ve tespit aralığı 0-3,5 arasındadır.

### **Gerekli ancak sağlanmayan malzemeler**

1. Mikroplak okuyucu (450nm dalga boyu filtresi), 37°C'yi koruyabilen inkübatör.
2. 1,5 mL EP tüp, emici kağıt.
3. Pipet ve tek kullanımlık uç: 0,5-10µL, 2-20µL, 20-200µL, 200-1000µL.
4. Çift damıtılmış su veya deiyonize su.

### **Örnek işleme**

#### **Örnek toplama**

Farklı numuneler farklı işleme yöntemleri gerektirebilir. Numune hazırlamadan önce, numunenin özelliklerini anlamak ve sonraki deneyleri etkileyebilecek reaktiflerden kaçınmak önemlidir. Ayrıca, numunelerin uygun olmayan sıcaklıklara veya sürelerle maruz kalmasını önleyin. Aşağıdaki yöntemler yalnızca referans amaçlıdır. Daha fazla bilgi için resmi **ELISA Numune Hazırlama Kılavuzu'na bakın** .

#### **Örnek işleme önerileri:**

**1.Serum:** Serum ayırıcı tüp (SST) kullanın ve örneklerin 1000 x g'de 15 dakika santrifüjlemeden önce oda sıcaklığında 30 dakika pıhtılaşmasını bekleyin. Serumunu hemen çıkarın ve analiz edin veya alikotlayın ve örnekleri  $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklayın. Tekrarlanan dondurma-çözme döngülerinden kaçının. Hemolize veya hiperlipidemili örneklerin kullanımından kaçınılmalıdır.

**2.Plazma:** Antikoagülan olarak EDTA-Na2 kullanarak plazma toplayın (Kan toplama için

antikoagülan içeren tüplerin kullanılması önerilir ) . Örnekleri, toplama işleminden sonraki 30 dakika içinde  $1000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüjleyin. Testi gerçekleştirmek için üst fazı toplayın . Kısa süreli saklama için numuneyi  $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 'ye yerleştirin. Hemolize veya hiperlipidemili numuneleri kullanmaktan kaçının.

### **3.Doku homojenizasyonu:**

3.1 Genel bilgi olarak, hemolize olmuş kan sonuçları etkileyebileceğinden, dokular küçük parçalara ayrılıp buzlu PBS (0,01 M, pH=7,4) ile yıkanarak fazla kanın iyice uzaklaştırılması gerekmektedir. Daha sonra kullanmak üzere tartın.

3.2 Doku parçaları tartılıp PBS'de homojenize edildi (Doku ağırlığı (g): PBS (mL) hacim=1:9). Homojenizasyon sırasında açığa çıkan proteazların aktivitesini inhibe etmek ve hedef proteinlerin proteolizini önlemek için PBS'ye PMSF gibi bir proteaz inhibitörü eklenmesi önerilir.) buz üzerinde cam bir homojenizatör ile .

3.3 Hücreleri daha fazla parçalamak için sonikasyon yapabilirsiniz Ultrasonik hücre parçalayıcı ile süspansiyon haline getirin (Örneği soğutmak için buz banyosu kullanın ve protein denatürasyonunu ve aşırı serbest radikal üretimini önlemek için ultrasonik gücü ve zamanı sıkı bir şekilde kontrol edin) . Homojenatlar daha sonra  $5000 \times g$ ' de 5-10 dakika santrifüj edilir ve üstteki sıvı toplanarak analiz gerçekleştirilir.

### **Notlar:**

A. Bazı doku örnekleri (örneğin karaciğer, böbrek ve pankreas), TMB substratı ile reaksiyona girerek yanlış pozitif sonuçlara neden olabilen yüksek seviyelerde endojen peroksidaz içerir. Bu gibi durumlarda, dokuyu incecik doğrayın ve %3  $\text{H}_2\text{O}_2$  solüsyonunda 10-15 dakika bekletin . Kalan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi önceden soğutulmuş PBS ile durulayın , ardından homojenize edin ve her zamanki gibi test edin.

B. Doku lizisi ve hücre içi proteinlerin salınımını kolaylaştırmak için hafif bir lizis tamponu da kullanabilirsiniz. Ancak, Triton X-100, NP-40 veya SDS içeren lizis tamponlarından kaçının. Çünkü bunlar lizozomları lize edebilir ve proteaz inhibitörlerinin yokluğunda proteaz salınımını artırarak hedef proteinleri parçalayabilir ve test doğruluğunu azaltabilir. Ayrıca, yüksek içerikleri test kitinin reaksiyonunu ciddi şekilde etkileyebilir. Fiziksel lizis etkisizse, EnkiLife yeni nesil lizis sıvısı RC0005 Hücre/Doku Lizis Tamponunu deneyin.

### **4.Hücre lizatları:**

#### **4.1 Hücre koleksiyonu:**

**Yapışık hücreler:** Hücreleri önceden soğutulmuş orta miktarda sıvı ile yavaşça yıkayın. PBS ile hücreleri ayırın ve tripsin kullanarak ayırın (EnkiLife RC0001 Tripsin Sindirim Ortamı kullanılması önerilir). Hücre süspansiyonunu bir santrifüje alın. Tüpe konulup  $1000 \times g$ ' de 5 dakika santrifüj edilir.

**Askıya alınmış hücreler:**  $1500 \times g$ ' de 5 dakika santrifüjleyin .

**Yarı yapışkan hücreler:** Üst fazı askıda hücreler için kullanılan yöntemle toplayın. Ardından,

yapışık hücreleri yapışık hücreler için kullanılan yöntemle toplayın. Toplanan her iki hücre fraksiyonunu da PBS'de tekrar süspanse edin, iyice karıştırın ve hücre toplama işlemini tamamlamak için 1000×g'de 5 dakika santrifüjleyin.

#### 4.2 Hücre lizisi:

Hücreleri 3 kez yıkayın önceden soğutulmuş PBS ile. Her  $1 \times 10^6$  için Hücrelere, önceden soğutulmuş PBS'nin 150-250 µL'sini ekleyin (İçerik çok düşükse, PBS hacmi azaltılabilir ) Hücreler askıya alınır. Hücreler tamamen parçalanana kadar ultrasonik hücre parçalayıcı kullanın . (Referans ayarları: Buz banyosu, 3-5 mm prob, 150-300 W güç kullanın. Her seferinde 1-2 saniye, 30 saniye aralıklarla çalışın ve 3-5 döngü gerçekleştirin.) 1500×g'de 10 dakika santrifüj edin. Hücre parçalarını ayırın, üstteki sıvıyı toplayarak testi gerçekleştirin.

**5. Hücre kültürü üst sıvısı veya diğer biyolojik sıvılar:** Örnekleri 1000×g'de 20 dakika santrifüjleyin, safsızlıkları ve hücre kalıntılarını giderin. Analizi gerçekleştirmek için üst sıvıyı toplayın.

### ① Örnekler için not

1. Numunenin toplanmasından sonra saklanması:

1 hafta içinde deneyin: 2-8°C'de saklayın.

1 ay içinde deneyin: Lütfen tek kullanımlık miktarlara bölün ve -20°C'de saklayın.

3 ay içinde deneyin: Lütfen tek kullanımlık miktarlara bölün ve -80°C'de saklayın.

Tüm numunelerin tekrar tekrar dondurulup çözülmesinden kaçınılmalıdır.

2. Lütfen denemeden önce konsantrasyonu tahmin edin. Numune konsantrasyonu standart eğri aralığında değilse , sonuçların doğruluğunu sağlamak için uygun seyreltme oranını belirlemek üzere bir ön deney yapılması önerilir. (Seyreltme katını belirlemek için literatüre danıştıktan sonra bir ön deney yapılması önerilir.)

3. Örnek türü kılavuzda yer almıyorsa, geçerliliği doğrulamak için ön bir deney önerilir.

4. Doku homojenatları veya hücre lizatları hazırlamak için lizis tamponu kullanılıyorsa, verilen kimyasal madde nedeniyle sapmaya neden olma olasılığı vardır.

5. Bazı rekombinant proteinlerin Kaplanmış antikor veya tespit antikoru ile uyumsuzluk nedeniyle tespit edilebilir.

### 📍 Hazırlık

1. **Oda sıcaklığına gelmesini sağlayın:** ELISA Kitini 20 dakika önceden buzdolabından çıkarın ve oda sıcaklığına gelmesini bekleyin.

2. **Mikroplak okuyucuyu önceden ısıtın:** Deney sırasında mikroplak okuyucunun ışık

kaynağını stabilize etmek için lütfen mikroplak okuyucuyu en az 15 dakika önceden açın.

**3. Yıkama solüsyonu:** Wash Buffer Concentrate (25×) iki kez damıtılmış suyla (1:24) seyreltin. İpucu: Buzdolabından çıkarılan Wash Buffer Concentrate (25×) kristaller olabilir; bu normal bir durumdur. Yıkama solüsyonunu hazırlamadan önce, kristalleri tamamen çözmek için 40°C'lik bir su banyosu kullanarak hafifçe ısıtabilirsiniz. Aynı gün kullanın.

#### 4. Standart çalışma çözümü:

4.1 Standardı 10000×g' de 1 dakika santrifüjleyin.

4.2 Dondurularak kurutulmuş standarda 1,0 mL **Reference Standard & Sample Diluent** ekleyin. Tüp kapağını sıktıktan sonra 10 dakika bekletin ve birkaç kez yavaşça ters çevirin.

4.3 Standart tamamen çözüldükten sonra, bir pipetle yavaşça karıştırarak bir çözelti hazırlayın. 1000pg/mL standart çalışma solüsyonu.

4.4 Deneysel gereksinimlere göre standart, katlar halinde seyreltilir. Önerilen konsantrasyon gradyanı: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 0 pg/mL.

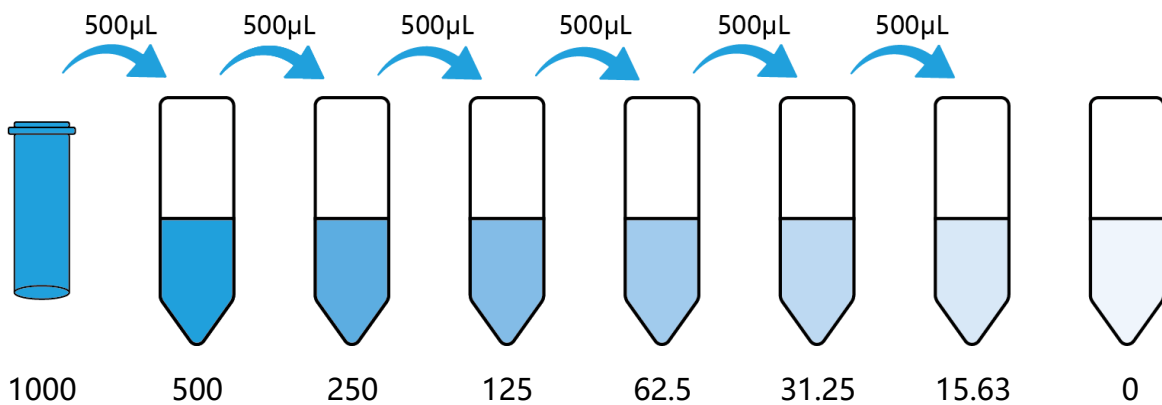
4.5 Çoklu seyreltme yöntemi:

7 EP tüpü hazırlayın ve her tüpe 500 µL Reference Standard & Sample Diluent ekleyin. 1000pg/mL standart çalışma solüsyonundan 500 µL pipetleyin ve ilk EP tüpüne ekleyin. 500 pg/mL standart çalışma solüsyonu hazırlamak için pipetle karıştırın.

Sonra, 500 pg/mL EP tüpünden 500 µL alın ve ikinci EP tüpüne ekleyin. 250 pg/mL standart çalışma solüsyonu hazırlamak için pipetle karıştırın. Çoklu seyreltmelerle standart çalışma solüsyonu elde etmek için bu şekilde devam edin.

Not: Son tüp boş olarak kabul edilir. Sadece Referans **Sadece Reference Standard & Sample Diluent** ekleyin.

The illustration as below is for reference:



#### 5. Biotinlenmiş Tespit Ab çalışma solüsyonu:

Deneyden önce gerekli miktarı hesaplayın (kuyu başına 100 µL) ve eksiklik durumunda ilave 100-200 µL hazırlayın. **Biotinylated Detection Ab Concentrate (100×)** santrifüjleyin. 1



dakika boyunca 800×g'de bekletin, ardından Biotinlenmiş Tespit Ab Konsantresini (100×) seyreltin 1× çalışma çözümüne **HRP Conjugate Diluent** ile . ( Biotinylated Detection Ab Concentrate (100×): Biotinylated Detection Ab Diluent = 1: 99 ). Kullanmadan önce çalışma solüsyonunu hazırlayın ve aynı gün kullanılmalıdır.

#### 6. HRP Conjugate çalışma çözümü:

Deneyden önce gerekli miktarı hesaplayın (kuyu başına 100 µL) ve eksiklik olması durumunda ilave 100-200 µL hazırlayın. **HRP Conjugate Concentrate (100×)** 800×g'de 1 dakika santrifüjleyin, ardından HRP Konjugat Konsantresini (100×) seyreltin. 1× çalışma çözümüne **HRP Conjugate Diluent** ile . (HRP Conjugate Concentrate (100×): HRP Conjugate Diluent = 1: 99). Kullanmadan önce çalışma solüsyonunu hazırlayın ve aynı gün içinde kullanın.

### İşlem Adımları

#### 1. Standart ve numuneyi ekleyin:

ELISA plaka kuyularının ilk iki sütununa yukarıdan aşağıya doğru farklı konsantrasyonlarda **Standart çalışma solüsyonu ekleyin, her konsantrasyon için iki kuyu, kuyu başına 100 µL;**

her birine 100 µL numune ekleyin . Yüksek konsantrasyonlu numunelerin önce seyreltilmesi gerekir.

Çalışma sırasında, çözelti mikrol ELISA plakasının dibine eklenmeli, iç duvara dokunmaktan kaçınılmalıdır, Karışımı hafifçe çalkalayın, kabarcık oluşmasını önleyin ve numune ekleme işlemini 10 dakika içinde tamamlayın.

#### 2. Plakayı kapatın ve inkübe edin:

Kit içerisinde bulunan **Plaka Kapatıcı** ile plakayı kapatın . 37°C' de 90 dakika inkübe edin.

#### 3. Biotinlenmiş Tespit Ab çalışma solüsyonu :

Sızdırmazlık maddesini yırtın, plaka kuyularındaki sıvıyı çıkarın ve kurutun, yıkamaya gerek yoktur.

Her kuyucuğa 100 µL **Biotinlenmiş Tespit Ab çalışma solüsyonu** ekleyin . Karıştırmak için hafifçe çalkalayın ve plakayı yeni bir **Plaka Kapatıcı ile kapatın** . 37°C'de 60 dakika inkübe edin.

#### 4. Plak yıkama 1:

Manuel Yıkama:

Plaka kuyularındaki sıvıyı aspire edin veya boşaltın, her kuyucuğa 350 µL **Yıkama Solüsyonu ekleyin** . 1-2 dakika bekletin, plaka kuyularındaki sıvıyı aspire edin veya

boşaltın, temiz emici bir kağıda hafifçe vurarak kurulayın ve bir yıkama işlemini tamamlayın. Bu yıkama adımını 3 kez tekrarlayın. İyi bir performans için her adımda sıvının tamamen uzaklaştırılması şarttır.

Mikroplak Yıkayıcı :

350µL /kuyuya ekleyin , plağı 3-5 saniye çalkalayın.

#### **5.HRP Konjugat çalışma solüsyonunu ekleyin :**

Her kuyucuğa 100 µL **HRP Konjugat çalışma solüsyonu** ekleyin . Karıştırmak için hafifçe çalkalayın, plakayı yeni bir **Plaka Kapatıcı ile kapatın** . 37°C'de 30 dakika inkübe edin.

#### **6. Plak yıkama 2:**

Plak 5 kez yıkanır; adımlar 4. adımla aynıdır. (**Plak yıkama 1**)

#### **7. Substrat Reaktifi (TMB) Ekleyin:**

Her kuyucuğa 90 µL **Substrate Reagent (TMB)** ekleyin . Plakayı yeni bir **Plaka Kapatıcı ile kapatın** . Yaklaşık 15 dakika boyunca 37°C'de inkübe edin. Plakayı ışıktan koruyun.

İpuçları: İnkübasyon süresini renk değişimine göre ayarlayın, ancak 30 dakikayı aşmayın. Standart kuyucuklarda belirgin bir renk değişimi görüldüğünde inkübasyon durdurulabilir.

#### **8. Tepkimeyi durdurun:**

Reaksiyonu durdurmak için her kuyuya 50 µL **Stop Solution** ekleyin .

İpucu: Durdurma Çözeltisinin eklenme sırası, Substrate Reagent (TMB) eklenme sırasına mümkün olduğunca uygun olmalıdır.

#### **9. OD değerini ölçün:**

ELISA plakasının her bir kuyucuğunun OD değerini (optik yoğunluk) hemen 450 nm'ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucusu ile ölçün.

### **📍 Sonuçların hesaplanması**

#### **1. Standart bir eğri oluşturun:**

Her standart, kontrol ve numune için tekrarlanan okumaların ortalamasını alın ve ortalama sıfır standart optik yoğunluğunu çıkarın.

Dört parametrelili lojistik (4-PL) oluşturun Mikroplaka okuyucunun sunduğu eğri uydurma yazılımını kullanarak, her bir standart için y eksenindeki ortalama OD değerini x eksenindeki konsantrasyona karşı çizerek eğriyi oluşturun.

#### **2. Numune konsantrasyonunun hesaplanması:**

Konsantrasyonu elde etmek için numunenin OD değerini standart eğriye yerleştirin.

Numuneler seyreltilmişse, standart eğriden okunan konsantrasyon seyreltme faktörü ile

çarpılmalıdır.

### 3. Yüksek OD değerli numunelerin işlenmesi:

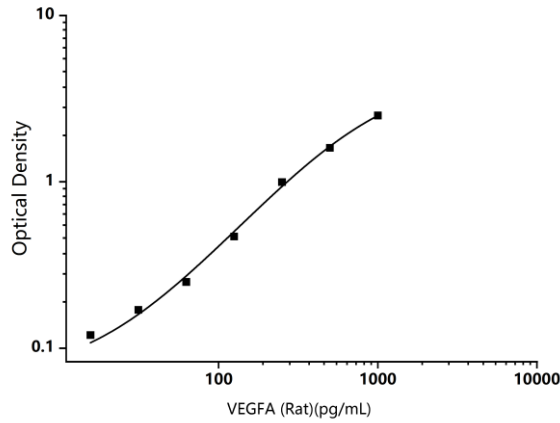
Örneğin OD'si standart eğrinin üst sınırını aşarsa, örnek uygun şekilde seyreltilmeli ve yeniden ölçülmelidir.

## Teknik Veriler

### Tipik Veriler:

Aşağıdaki veriler yalnızca referans amaçlıdır. Her analizde bir standart eğri çalıştırılmalıdır.

|                      |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Konsantrasyon: pg/mL | 1000  | 500   | 250   | 125   | 62.5  | 31.25 | 15.63 | 0     |
| OD                   | 2.422 | 1.584 | 0.945 | 0.493 | 0.281 | 0.179 | 0.131 | 0.079 |
| Düzeltilmiş OD       | 2.343 | 1.505 | 0.866 | 0.414 | 0.202 | 0.1   | 0.052 | -     |



### Kesinlik:

**Deney İçi Hassasiyet (Deneme içindeki hassasiyet):** Deney içi hassasiyeti değerlendirmek için bilinen konsantrasyondaki üç numune bir plaka üzerinde yirmi kez test edildi.

**Deneyler Arası Hassasiyet (Deneyler Arası Hassasiyet):** Deneyler arası hassasiyeti değerlendirmek için bilinen konsantrasyondaki üç numune yirmi ayrı deneyde test edildi. Deneyler, en az üç teknisyen tarafından iki parti bileşen kullanılarak gerçekleştirildi.

|                  | Deneme içi Hassasiyet |        |       | Denemeler Arası Hassasiyet |       |        |
|------------------|-----------------------|--------|-------|----------------------------|-------|--------|
| Örnek            | 1                     | 2      | 3     | 1                          | 2     | 3      |
| n                | 20                    | 20     | 20    | 20                         | 20    | 20     |
| Ortalama (pg/mL) | 52.82                 | 152.12 | 348.7 | 56.33                      | 164.1 | 319.37 |
| Standart sapma   | 3.34                  | 8.84   | 13.32 | 3.42                       | 7.14  | 14.02  |
| CV (%)           | 6.32                  | 5.81   | 3.82  | 3.42                       | 4.35  | 4.39   |

## İyileşmek:

Çeşitli matrislerdeki analiz aralığı boyunca örneklerde üç farklı seviyeye ulaşan Fare VEGFA'nin geri kazanımı değerlendirildi.

| Örnek Türü                 | Menzil (%) | Ortalama Kurtarma (%) |
|----------------------------|------------|-----------------------|
| Serum (n=5)                | 85-98      | 92                    |
| EDTA plasma (n=5)          | 85-96      | 90                    |
| Hücre kültürü ortamı (n=5) | 90-103     | 96                    |

## Doğrusallık:

Denemenin doğrusallığını değerlendirmek için, çeşitli matrislerde yüksek konsantrasyonlarda Fare VEGFA içeren ve/veya bu maddeyle zenginleştirilmiş numuneler, denemenin dinamik aralığında değerlere sahip numuneler üretmek için Referans Standardı ve Numune Seyreltici ile seyreltilti.

|      |              | Serum<br>(n=5) | Plasma<br>(EDTA)(n=5) | Hücre kültürü ortamı<br>(n=5) |
|------|--------------|----------------|-----------------------|-------------------------------|
| 1:2  | Menzil (%)   | 97-115         | 97-112                | 96-107                        |
|      | Ortalama (%) | 105            | 105                   | 102                           |
| 1:4  | Menzil (%)   | 100-117        | 98-115                | 93-107                        |
|      | Ortalama (%) | 107            | 103                   | 100                           |
| 1:8  | Menzil (%)   | 96-110         | 98-113                | 94-108                        |
|      | Ortalama (%) | 104            | 103                   | 100                           |
| 1:16 | Menzil (%)   | 96-110         | 99-111                | 94-107                        |
|      | Ortalama (%) | 101            | 105                   | 101                           |

## ❗ Sorun giderme

Sonuçlar yeterince iyi değilse, lütfen fotoğraf çekin ve deneysel verileri zamanında kaydedin. Kullanılmış plakayı ve kalan reaktifleri saklayın. Ardından, sorunu çözmek için teknik destek ekibimizle iletişime geçin. Bu arada, aşağıdaki kaynaklara da başvurabilirsiniz:

| Sorun               | Nedenler                    | Çözümler                                                                         |
|---------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Zayıf standart eğri | Yanlış pipetleme            | Pipetleri kontrol edin                                                           |
|                     | Uygunsuz standart seyreltme | Standart şişeyi kısa bir süre döndürün ve tozu hafifçe karıştırarak iyice çözün. |

|                  |                                           |                                                                                                                                                                        |
|------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  | Kuyular tamamen aspire edilmemiştir       | Adımlar arasında kuyuları tamamen aspire edin                                                                                                                          |
| Düşük sinyal     | Yetersiz kuluçka süresi                   | Yeterli kuluçka süresini sağlayın                                                                                                                                      |
|                  | Yanlış deney sıcaklığı                    | Önerilen kuluçka sıcaklığını kullanın                                                                                                                                  |
|                  | Yetersiz reaktif hacimleri                | Pipetleri kontrol edin ve doğru hazırlığı sağlayın                                                                                                                     |
|                  | Uygunsuz seyreltme                        | Seyreltme adımlarını kontrol edin                                                                                                                                      |
|                  | HRP konjugatı inaktif veya TMB yetmezliği | HRP konjugatını ve TMB'yi karıştırın, hızlı renklendirme                                                                                                               |
| Düşük değer      | Plaka okuyucu ayarı optimum değil         | Mikroplaka okuyucusunda (450 nm) dalga boyu ve filtre ayarını doğrulayın                                                                                               |
|                  |                                           | Mikroplak Okuyucuyu önceden açın ve en az 15 dakika önceden ısıtın                                                                                                     |
| Büyük            | Yanlış pipetleme                          | Pipetleri kontrol edin.                                                                                                                                                |
| Yüksek arka plan | Hedef proteinin konsantrasyonu çok        | Önerilen seyreltme faktörünü kullanın                                                                                                                                  |
|                  | Tabak yeterince yıkanmamış                | Doğru yıkama için kullanım kılavuzunu inceleyin. Plaka yıkayıcı kullanıyorsanız, tüm bağlantı noktalarının tıkalı olmadığından emin olun. Elisa kitinde verilen yıkama |
|                  | Kirlenmiş yıkama tamponu                  | Taze yıkama tamponu hazırlayın                                                                                                                                         |
| Düşük hassasiyet | ELISA kitinin uygunsuz şekilde saklanması | Tüm reaktifler talimatlara göre saklanmalıdır.                                                                                                                         |
|                  | Durdurma çözeltisi eklenmedi              | Ölçümden önce her kuyucuğa durdurma solüsyonu eklenmelidir.                                                                                                            |

## ① İfade:

1. **Kalite ve Teknik Risk İpuçları** : Mevcut koşullar ve bilimsel teknoloji nedeniyle, sağlanan tüm hammaddeler üzerinde kapsamlı bir tanımlama ve analiz yapamıyoruz. Bu nedenle, kiti kullanan kullanıcılar için bazı niteliksel ve teknik riskler olabilir.
2. **Deneyisel sonuçları etkileyen faktörler**: Deneyisel sonuçlar, reaktiflerin etkinliği, operatörün becerileri ve deney ortamı gibi birçok faktörden etkilenir. Sonuçların doğruluğunu sağlamak için lütfen test edilecek yeterli sayıda numune hazırlayın.
3. **Reaktif Kullanım Kılavuzu**: En iyi deneyisel sonuçları elde etmek için, yalnızca bu kitte bulunan reaktifleri kullanmanız ve talimatlara kesinlikle uymanız önerilir. Diğer üreticilerin ürünleriyle karıştırmaktan kaçınınız.
4. **Çalıştırma Önlemleri**: Reaktif hazırlama veya mikro plaka okuyucu parametre ayarlarının yanlış yapılması, anormal deney sonuçlarına yol açabilir. Lütfen deneyden önce talimatları dikkatlice okuyun ve cihaz parametrelerini doğru şekilde ayarlayın.
5. **Sonuç Tekrarlanabilirliği**: Aynı operatör bile iki bağımsız deneyde farklı sonuçlar elde edebilir. Sonuçların tekrarlanabilirliğini sağlamak için, lütfen deney sırasında işlemin her adımını sıkı bir şekilde kontrol edin.
6. **Kalite Güvencesi ve Fark Açıklaması**: Her kit kalite kontrol testinden başarıyla geçmiştir. Ancak, taşıma koşulları, farklı laboratuvar ekipmanları vb. gibi bazı değişkenler nedeniyle kullanıcı sonuçları verilerimizle tutarsız olabilir. Farklı partilerden kitler arasında test içi farklılıklar da yukarıdaki nedenlerden kaynaklanabilir.
7. **Bu kit yalnızca araştırma amaçlıdır, klinik tanı amaçlı kullanmayınız!**

 Her zaman yüksek kaliteli ürünler sunmaya kendimizi adadık ve anlayışınız ve desteğiniz için teşekkür ederiz. Herhangi bir sorunuz varsa, lütfen teknik destek ekibimizle iletişime geçmekten çekinmeyin.