

产品说明书

人血管内皮生长因子 ELISA 试剂盒 (Human VEGF ELISA KIT)

产品货号: H6139S, H6139M, H6139L

产品规格: 24T, 48T, 96T

产品内容:

组分 \ 规格	24T	48T	96T	使用方法	开封后保存条件
A. 标准品	2000 pg	2000 pg	2×2000 pg	按说明书进行稀释	-20℃可存放一月
B. 标准稀释液	16 mL	16 mL	16 mL	即用型	4℃可存放一月
C. 浓缩生物素化抗体 (100×)	30 μL	60 μL	2×60 μL	按说明书进行稀释 (现配现用)	
D. 生物素化抗体稀释液	16 mL	16 mL	16 mL	即用型	
E. 浓缩酶结合物 (避光 100×)	30 μL	60 μL	2×60 μL	按说明书进行稀释 (现配现用)	
F. 酶结合物稀释液	16 mL	16 mL	16 mL	即用型	
G. 浓缩洗涤液 (20×)	16 mL	16 mL	25 mL	即用型	
H. 显色剂 (避光)	6 mL	6 mL	12 mL	即用型	
I. 终止液	12 mL	12 mL	12 mL	即用型	
J. 预包被 96 孔板	8×3	8×6	8×12	即用型	密封干燥 4℃保
K. 封板胶纸	1 张	2 张	4 张	即用型	存

注: 终止液和显色剂具有腐蚀性, 一旦接触到液体, 请尽快用大量清水冲洗。

储存条件

4℃避光保存, 有效期见外包装。开封后, 保存温度详见说明书。

产品介绍

Human VEGF ELISA Kit (Human Vascular Endothelial Cell Growth Factor Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit), 即人血管内皮生长因子 ELISA 试剂盒, 可以定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液等样本中的天然和重组 VEGF 浓度。

人 VEGF 是由两个相同亚基以二硫键交联组成的二聚

体糖蛋白, 基因定位于第 6 号染色体长臂, 由 8 个外显子和 7 个内含子交替构成, 约 14 kb。由于 mRNA 剪接方式不同, 产生了单链分别含 121, 145, 165, 183, 189 和 206 个氨基酸的不同变异体。VEGF 121 分子量约为 34-46 kDa, 是可溶性分泌型蛋白质, 以游离状态存在, 不能与肝素结合; VEGF 165 分子量为 45 kDa, 30-50%以可溶性形式分泌于细胞外基质, 其余部分与细胞膜、基底膜或细胞外基质含有肝素的糖蛋白结合。VEGF 145 存在于胎盘细胞和女性生殖道肿瘤细胞。VEGF 189 及 VEGF 206 分泌后完全结合于细胞膜或基底膜含有肝素的糖蛋白上。骨骼肌, 心肌, 肝细胞, 成骨细胞, 中性粒细胞, 巨噬细胞, 角质形成细胞, 血小板, 褐



色脂肪组织, CD34⁺细胞, 星形细胞, 神经元和内皮细胞等多种细胞和组织均可产生 VEGF。血清和血浆样本均可检测到 VEGF, 由于血小板可释放 VEGF, 因此血清中 VEGF 含量较高。VEGF 是一种特异作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子, 可增加血管通透性、促进血管形成、引起细胞外基质成分改变等。

目前, VEGF 和 VEGFR 因其在肿瘤血管生成中的重要作用而成为抗肿瘤血管生成疗法的重要靶点。目前应用单克隆抗体、小分子抑制物、反义寡核苷酸, 可溶性受体等方法通过阻断其信号转导通路或耗竭肿瘤细胞产生的 VEGF, 下调 VEGF 或 VEGFR 的表达, 从而抑制肿瘤血管生成, 切断肿瘤血供, 最终达到抑制肿瘤生长及转移的作用。

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中人 VEGF 浓度。在人 VEGF 单克隆抗体预包被酶标板中加入适度稀释的样品和标准品, 其中的 VEGF 会与其单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗人 VEGF 抗体, 抗人 VEGF 抗体与结合在单抗上的人 VEGF 结合而形成免疫复合物, 洗去游离的成分; 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 洗去未结合的酶结合物; 加入显色剂, 若反应孔中有 VEGF, 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂出现蓝色; 加终止液变为黄色。在 450 nm 下测 OD 值, 人 VEGF 浓度与 OD 450 值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线计算出样品中人 VEGF 浓度。

使用方法

1. 样品准备

- (1) 细胞上清样品: 4°C 约 1000 ×g 离心 10 min 取上清。
- (2) 血清样品: 使用不含热原和内毒素的试管收集血液, 室温静置 30 min, 4°C 约 1000 ×g 离心 10 min 取黄色上清。
- (3) 血浆样品: 使用 EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆, 4°C 约 1000 ×g 离心 15 min 取黄色或淡黄色上清。

注:

- a. 样品制备好后置于冰上待用。
- b. 若待测样品不能及时检测, 样品制备好后可先进行分装, 于 -20°C 或 -80°C 冻存, 避免反复冻融。

- c. 室温 (25°C-28°C) 解冻, 温度不可高于 37°C。
- d. 请勿使用溶血、高血脂或污染的样品检测。
- e. 如果血清中含有大量颗粒, 检测前先离心或过滤去除。
- f. 可根据实际情况, 将样品做适当倍数稀释 (可做预实验, 以确定稀释倍数, 正常人血清或血浆样本建议做 1:2 稀释)。

2. 试剂准备

- (1) 试剂盒提前 30 min 从冰箱中取出, 室温解冻。
- (2) 标准品: 将 1 mL 标准稀释液加入冻干标准品中, 静置 15 min, 用移液枪轻轻吸打混匀, 标准品浓度为 2000 pg/mL, 根据需要进行稀释。

标准品稀释方法

溶液	浓度 (pg/mL)	加入溶液 (μL)	标准品稀释液 (μL)
A (标准品)	2000	—	1000
B	1000	500A	500
C	500	500B	500
D	250	500C	500
E	125	500D	500
F	62.5	500E	500
G	31.25	500F	500

- (3) 生物素化抗体工作液: 将浓缩生物素化抗体用生物素化抗体稀释液稀释 (1:100), 现配现用。
- (4) 酶结合物工作液: 将浓缩酶结合物用酶结合物稀释液稀释 (1:100), 现配现用。
- (5) 洗涤缓冲液: 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释 (1:20), 若从冰箱中取出的浓缩洗涤液有结晶, 可加热并轻轻摇晃使结晶溶解再进行配制, 未用完的 4°C 保存。

注:

- a. 稀释后的标准品不可重复使用, 未用完的标准品分装, 于 -20°C 或 -80°C 冻存, 避免反复冻融。
- b. 浓缩生物素化抗体、浓缩酶结合物稀释前请先离心处理, 使管内液体沉入底部。
- c. 不同批号试剂不可混用。



d. 混匀要充分，最好使用微量振荡器（用最低频率进行震荡）。

3. 操作步骤

(1) 根据待测样品和标准品的数量计算实验所需的预包被板条数，增加一孔作为对照。

(2) 分别将样品和不同浓度的标准品（每孔100 μL）加入相应的孔中，用封板胶纸封住反应孔，37°C孵育90 min。

(3) 每孔注入350 μL 洗涤液进行洗板（自动洗板机注入与吸出间隔15-30 s, 手工洗板静置30 s后甩尽液体），洗板4次，最后一次置于厚吸水纸上拍干。

(4) 将生物素化抗体工作液（每孔100 μL）加入相应的孔中，用封板胶纸封住反应孔，37°C孵育60 min。

(5) 洗板4次（同上）。

(6) 将酶结合物工作液（每孔100 μL）加入相应的孔中，用封板胶纸封住反应孔，37°C孵育30 min。

(7) 洗板4次（同上）。

(8) 加入显色剂（每孔100 μL），37°C避光孵育10-20 min。

(9) 加入终止液（每孔100 μL），混匀后立即测量OD值。

（于450 nm处测量，操作时间在5 min以内。）

注：

- 每步使用新的封板胶纸，防止污染。
- 孵育温度和时间要适当，孵育时不可在变温环境中，时间不可过短，若标准曲线两点之间区别低，可适当延长底物孵育时间。
- 洗涤时每孔充满洗涤液，倾倒时迅速，洗涤酶标板应充分拍干，不要将吸水纸放入酶标反应孔中吸水。
- 整个实验应连续操作，不可间断，在实验开始前准备好样品和试剂。

4. 结果分析

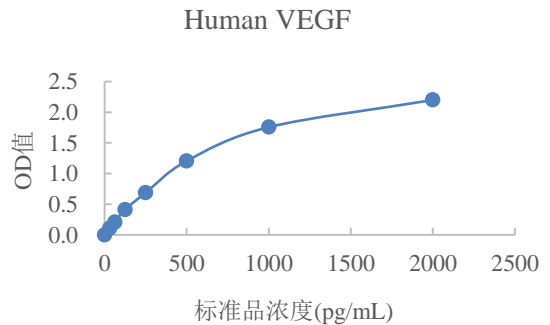
(1) 每个标准品和样品的 OD 值应减去空白对照的 OD 值；如果做复孔，差异范围在 20% 以内有效，其平均值可作为测量值。

(2) 绘制标准曲线时，以标准品浓度为横坐标 (X)，OD 值为纵坐标 (Y)。样品的 VEGF 含量可通过样品 OD 值由标准曲线换算得出。

(3) 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重新测定，计算浓度时应乘以样品的稀释倍数。

(4) 参考数据

标准品浓度 (pg/mL)	OD 值 1	OD 值 2	平均值	矫正值
0	0.049	0.043	0.046	—
31.25	0.154	0.152	0.153	0.107
62.5	0.256	0.255	0.255	0.209
125	0.458	0.460	0.459	0.413
250	0.734	0.732	0.733	0.687
500	1.252	1.250	1.251	1.205
1000	1.801	1.804	1.802	1.756
2000	2.246	2.244	2.245	2.199



本图仅供参考，以同次试验结果所绘标准曲线为准



常见问题及解决方法

问题	原因	解决办法
无颜色	不同批号的试剂混合使用	重新检查试剂的标签，确保所有组分都属于同一批号。
	试剂配制、使用有误	重做试验，严格按说明书操作。
	HRP 酶污染了叠氮钠	使用新配制的试剂，禁含叠氮钠
颜色弱	产品超过有效期	检查产品有效期
	孵育时间过短	检查孵育时间
	使用的试剂被污染	检查试剂是否被污染
	洗涤操作不规范	检查洗涤是否充分，每孔是否有残留的洗液
		洗涤时，每孔完全充满洗涤缓冲液，倾出时要迅速
		检查或每孔加样量的体积是否准确
仪器设定不正确	检查仪器设定、滤光片的使用等是否正确	
背景过高	孵育温度和时间不适当	确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当
	酶加量过多	加酶前验看移液器调节量是否准确
		检查稀释度，必要时进行效价测定
全部板子变成规则的蓝色	洗涤不充分，仍有残留物	检查每孔是否有残留的洗液
		使用洗板机充分洗涤
	酶结合物太多	检查稀释度，必要时进行效价测定
	封板膜、试剂容器被重复使用	使用新封板膜，每步使用不同的试剂容器
CV 值过高	操作不慎或洗涤不充分	严格按照说明书操作，特别是洗板步骤
	酶标板干板，未使用封板膜或封板膜重复使用	每两个步骤间酶标板保持湿润，每个步骤使用新的封板膜
	移液器不准，吸头重复使用	检查并校准移液器，每次取样更换新的吸头
标准曲线两点间差别低	酶结合物、检测抗体不足	检查稀释度，必要时进行效价测定
	板子显色不足	延长底物孵育时间
无期望的阳性信号	样品中无相应待检测物质	使用内参对照，或重复实验，重新考虑实验参数
	样品基质遮盖检测	对样品进行稀释
边缘效应	工作环境不均衡	孵育时避免在变温环境中进行
漂移	实验过程中短	整个实验应连续操作，不可间断，在实验开始前准备好样品和试剂
	试剂未按说明书平衡至室温	在正式进行实验操作前，所有试剂平衡至室温（除说明书中有其它要求外）

特异性

本试剂盒可定量检测天然和重组人 VEGF，均不与下列细胞因子及蛋白发生反应。

重组人细胞因子	EC-VEGF/PK1, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PtGF, VEGF-B167, VEGF-C, VEGF-D, VEGF R3(Flt-4) /Fc Chimera
重组小鼠细胞因子	PtGF-2, VEGF120, VEGF164, VEGF-D, VEGF R2(KDR)/Fc Chimera, VEGF R3(Flt-4) /Fc Chimera
其他蛋白	Rat VEGF 120(0.07%), zebrafish VEGF 165

