proteintech
Antibodies | ELISA kits | Proteins

AuthentiKine®

人VEGF双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00216

规 格: 96T

灵敏度: 1 pg/mL

检测范围: 31.25 - 2000 pg/mL

用 途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞上清中人VEGF浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

目录

一：背景信息 3
二：检测原理 3
三：需自备的实验器材 3
四：试剂盒组分及储存 4
五：实验注意事项 4
六：样本准备 4
七：试剂准备 5
八：实验步骤 6
九：实验参数 7
9.1 参考标曲图 7
9.2 精密度 7
9.3 加标回收率 7
9.4 样本值 8
9.5 灵敏度 8
9.6 线性 9
9.7 特异性 9
十：参考文献 9

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

一：背景信息

血管内皮生长因子(VEGF)，是细胞产生的一种信号蛋白，刺激血管生成和血管生成。它是系统的一部分，当血液循环不足时，例如在缺氧的情况下，恢复组织的氧气供应。支气管哮喘和糖尿病患者血清VEGF浓度较高。VEGF的活动并不局限于血管系统；VEGF在骨形成、造血、伤口愈合和发育等正常生理功能中发挥作用。该基因的破坏导致小鼠胚胎血管形成异常。VEGF在许多已知的肿瘤中表达上调，其表达与肿瘤的分期和进展有关

二：检测原理

◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长)；

3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头；

3.3 洗板机 (亦可手动洗板)；

3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本)；

3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干)；

3.6 烧杯和量筒；

3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法)，如：Origin，ELISA Calc等。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	4000 pg/瓶	2 瓶
Detection antibody (100×)	检测抗体浓缩液（100×）**	120 µL/支	1 支
HRP-conjugated antibody (100×)	HRP标记二抗浓缩液（100×）**	120 µL/支	1 支
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液（20×）	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张
储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8°C存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；

5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；

5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；

5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

6.2 血浆: 可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融

(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。

6.3 细胞上清: 收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到洗涤液（1×）。

7.2 检测抗体（1×）：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制（100 µL/孔）, 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 µL 检测抗体浓缩液（100×）加 990µL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

7.3 HRP标记二抗（1×）：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制（100 µL/孔）, 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 µL HRP标记二抗浓缩液（100×）加 990µL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

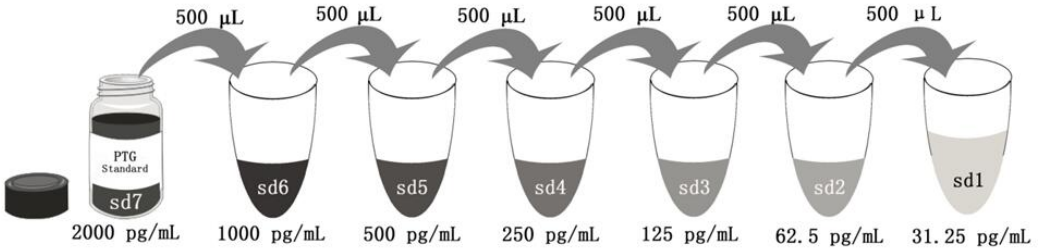
7.4 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：人血清、血浆以及细胞上清样本1:2或1:4稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.5 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 4B1样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



Add # µL of Standard diluted in the previous step	—	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
# µL of Sample Diluent PT 4B1	**2000 µL**	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30 min（检测抗体 浓缩液、HRP标记二抗浓缩液不需要平衡室温，即用即取）；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽；

8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C，并于一周之内用完；

8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 µL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；

8.3 酶标板盖上覆膜，37°C孵育2 h；

8.4 洗涤

1） 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；

2） 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 µL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；

8.5 每孔加100 µL 检测抗体（1×）(参照试剂准备部分7.2)，盖上封板膜，37°C孵育1 h；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 每孔加 100 µL HRP标记二抗（1×）(参照试剂准备部分7.3)，盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.8 重复步骤8.4；

8.9 显色：每孔加TMB显色液100 µL，37°C避光显色 15-20 min（如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用）；

8.10 终止：每孔加终止液100 µL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免接触终止液）

8.11 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm 波长，也可直接使用450 nm 波长读数；

8.12 数据分析： 每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

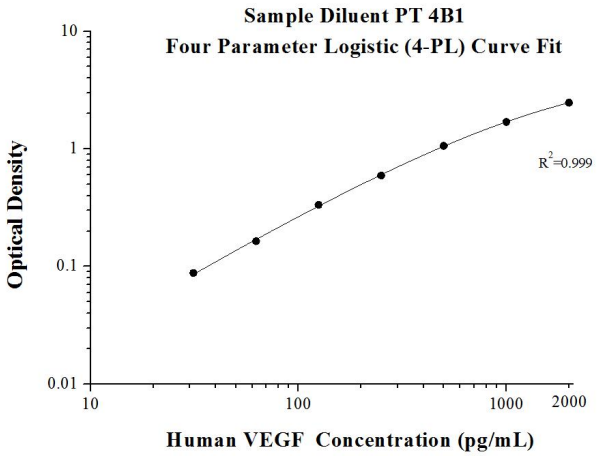
操作流程如下：

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 µL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体 (1×)	100 µL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记二抗（1×）	100 µL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 µL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
5	终止液	100 µL	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.091 0.092	0.092	-
31.25	0.181 0.178	0.182	0.088
62.5	0.269 0.242	0.256	0.164
125	0.438 0.412	0.425	0.334
250	0.708 0.66	0.684	0.593
500	1.175 1.127	1.151	1.060
1000	1.805 1.767	1.786	1.695
2000	2.57 2.555	2.563	2.471

9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	287.8	10.9	3.8
2	20	578.2	35.1	6.4
3	20	1,183.3	54.8	4.6

板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	325.2	23.9	7.4
2	24	685.1	67.6	9.9
3	24	1,498.9	134.0	8.9

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人VEGF的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
人血清	1:2	84	83-86
	1:4	83	82-85
细胞上清	1:2	86	83-89
	1:4	87	84-89

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com
ptglab.com

9.4 样本值

应用本试剂盒，检测来自人血清以及血浆中人VEGF的浓度。

样本类型	均值 (pg/mL)	范围 (pg/mL)
人血清 (n=16)	507.5	55.5-982.8
人血浆 (n=13)	127.3	14.3-385.4

细胞上清：

在含有8%胎牛血清，5μM β-巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素、100 μg/mL硫酸链霉素的RPMI-1640细胞培养基中培养人外周血单个核细胞PBMC(1×10^6 cells/mL)，细胞分别在未刺激或10 μg/mL 植物血凝素PHA 刺激下培养5天。收集细胞上清，并检测人 VEGF的浓度。

刺激条件	(pg/mL)
未刺激 5天	230.3
刺激 5天	861.3

在含有10%胎牛血清、2 mML-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素、100 μg/mL硫酸链霉素的RPMI培养基中培养人前列腺癌细胞PC-3，细胞分别在未刺激或60 nM PMA刺激下培养1天，收集细胞上清，并检测人VEGF的浓度。

刺激条件	(pg/mL)
未刺激 1天	2692
刺激 1天	3966

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人VEGF的灵敏度为1 pg/mL。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

稀释倍数		人血清	细胞上清
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	105	105
	范围 (%)	103-109	102-108
1:8	均值 (%)	98	109
	范围 (%)	97-100	107-111
1:16	均值 (%)	92	115
	范围 (%)	81-101	109-121

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人VEGF。

加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应

Human:

VEGF-B_{167}

VEGF-B_{186}

VEGF-C

VEGF-D

PlGF

加入50 ng/mL以下细胞因子，有交叉反应

Mouse:

$VEGF_{120}$ 交叉反应约为8.6%

$VEGF_{164}$ 交叉反应约为1.4%

十：参考文献

1. Senger DR. et al. (1983). Science. 219: 983-5.

2. Ferrara N. et al. (1992). Endocr Rev. 13: 18-32.

3. Boocock CA. et al. (1995). J Natl Cancer Inst. 87: 506-516.

4. Sunderkotter C. et al. (1994). Int J Cancer. 55: 410-422.

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com