



## 人血管内皮生长因子受体1酶联免疫吸附测定试剂盒

货号: R90096-96T

### 储存条件:

本产品需冰袋运输。保存于4℃,保质期6个月;保存于-20℃,保质期12个月。

### 产品参数:

|      |                       |
|------|-----------------------|
| 规格   | 96次                   |
| 检测范围 | 0.156 ng/mL~10 ng/mL  |
| 敏感性  | 30 pg/mL              |
| 特异性  | 系统和其它因子无交叉反应          |
| 样本类型 | 人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清 |

### 产品简介:

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中人 VEGFR1 的浓度。人 VEGFR1 捕获抗体已经预包被于酶标板上,当加入样品或标准品时,其中的人 VEGFR1 会与捕获抗体结合,而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着,再加入生物素标记的人 VEGFR1 抗体后,抗人 VEGFR1 抗体与人 VEGFR1 接合,形成夹心的免疫复合物,其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物,生物素与酶复合物特异性结合,这样酶复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来,而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂,若样品中存在人 VEGFR1,则会形成免疫复合物,其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质,而后加入终止液,最终产物呈黄色。通过酶标仪检测,读取 450 nm 处的 OD 值,人 VEGFR1 浓度与 OD450 值之间呈正比,通过检测标准品绘制标准曲线,对照未知样品中 OD 值,即可计算出样品中人 VEGFR1 的浓度。

### 背景简介:

血管内皮生长因子受体 1(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1, 简称 VEGFR1) 也被称为 Fms 样酪氨酸激酶 1(Fms-Like Tyrosine Kinase 1, 简称 FLT1),



是 VEGFR 家族的一个成员，能够与 VEGF-A、PlGF 和 VEGF-B 结合。VEGFR1 的一个显著特点是它表达两种类型的 mRNA，一种用于全长受体，另一种用于可溶性短蛋白，即可溶性 VEGFR-1 (sFlt-1)。VEGFR1 对 VEGF-A 的亲和力比 VEGFR-2 高一个数量级，但其激酶活性大约是 VEGFR-2 的十分之一。在胚胎发育过程中，VEGFR1 通过其配体结合区域和捕获配体，在血管生成中发挥负向调节作用。然而，在成年期，VEGFR1 不仅表达在内皮细胞上，还表达在巨噬细胞上，并通过其激酶活性促进巨噬细胞功能、炎症性疾病、癌症转移和动脉粥样硬化。可溶性 VEGFR-1 在子痫前期患者的胎盘中异常过表达，并可能通过阻断生理性 VEGF-A 引起母体方面的高血压和肾功能不全等主要病理症状。VEGFR1，包括其可溶性形式，涉及多种人类疾病，使其成为开发新策略以抑制疾病的重要靶点。

VEGFR1 在促进细胞迁移和增殖方面的作用主要通过 PLC $\gamma$ 和 PI3K 途径。研究表明，VEGFR1 诱导的细胞增殖主要是通过 PLC $\gamma$ 激活的。VEGFR1 诱导的迁移显著受到 PLC $\gamma$ 的调节，而 PI3K 和 Abl 抑制对细胞增殖的影响不显著。这些发现为我们理解 VEGF 信号传导提供了新的结构基础，并为针对 VEGFR1信号传导的治疗药物开发提供了指导。

#### 产品内容:

| 组分                  | 体积或数量                 |
|---------------------|-----------------------|
| 人 VEGFR1 预包被板       | 8 孔条 $\times$ 12 个    |
| 样品稀释液               | 30 mL                 |
| 重组人 VEGFR1 标准品(冻干)  | 2 支(10 ng/支)          |
| 生物素标记人 VEGFR1 抗体    | 130 $\mu$ L(效价 1:100) |
| 抗体稀释液               | 12 mL                 |
| 酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素)  | 130 $\mu$ L(效价 1:100) |
| 酶复合物稀释液             | 12 mL                 |
| 浓缩洗涤液(25 $\times$ ) | 30 mL                 |
| 显色剂 TMB             | 10 mL                 |



|      |       |
|------|-------|
| 终止液  | 10 mL |
| 封板胶纸 | 4张    |

## 操作步骤:

### 样品制备

#### 1. 根据样品种类选择相应的处理方法:

A. 细胞上清: 将细胞培养上清液100~500×g离心5 min, 去除悬浮物后即可;

B. 血清样品: 将全血在室温下静置0.5~2 h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可 (4℃, 1,000~2,000×g, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;

C. 血浆样品: 使用EDTA对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

D. 组织匀浆/体液: 离心去除沉淀即可。

注意: ① 若待测样品无法及时检测, 样品制备完成后, 请分装冻存于-20℃, 避免反复冻融;

② 请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;

③ 为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

#### 2. 稀释样品

查阅相关文献, 预估样品中待测因子的含量, 从而确定适当的稀释倍数, 使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同, 分别采取不同的稀释方案:

① 待测因子含量在 100~1,000 ng/mL 范围内, 一般按 1:100 稀释, 即向 297 μL 样品稀释液中加入 3 μL 样品;

② 待测因子含量在 10~100 ng/mL 范围内, 一般按 1:10 稀释, 即向 225 μL 样品稀释液中加入25 μL 样品;



③ 待测因子含量在 0.156~10 ng/mL 范围内, 一般按 1:2 稀释, 即向 100  $\mu$ L 样品稀释液中加入 100  $\mu$ L 样品;

④ 待测因子含量 $\leq$ 0.156 ng/mL, 样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考, 实验中请详细记录样品的稀释方法。

## 检测准备工作

3. 试剂盒自 4℃冰箱取出后, 请置于室温平衡 20 min; 如从 -20℃取出, 各组分需彻底融化后再平衡20 min; 检测完成后, 剩余试剂请及时置于4℃或 -20℃保存;

4. 将浓缩洗涤液(25 $\times$ )用双蒸水或去离子水稀释成1 $\times$ 洗涤液;

5. 重组人VEGFR1标准品的稀释和使用(在使用前2 h内准备, 室温操作, 请严格控制在25~28℃)

① 配制 10 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置 15 min 以上, 然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;

② 按下表将 10 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 10 ng/mL, 将标准品稀释液作为浓度 0 ng/mL。)

| 管号 | 稀释液用量( $\mu$ L) | 复溶后标准品用量( $\mu$ L) | 标准品的最终浓度(ng/mL) |
|----|-----------------|--------------------|-----------------|
| A  | 0               | 1,000              | 10              |
| B  | 300             | 300(从A管中取)         | 5               |
| C  | 300             | 300(从B管中取)         | 2.5             |
| D  | 300             | 300(从C管中取)         | 1.25            |
| E  | 300             | 300(从D管中取)         | 0.625           |
| F  | 300             | 300(从E管中取)         | 0.312           |
| G  | 300             | 300(从F管中取)         | 0.156           |
| H  | 300             | 0                  | 0               |

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

## 6. 准备生物素标记人 VEGFR1 抗体工作液

① 按每孔需添加 100  $\mu$ L 抗体工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200 $\mu$ L);



② 按 1  $\mu\text{L}$  生物素标记人 VEGFR1 抗体 添加 99  $\mu\text{L}$  抗体稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

7. 准备酶复合物工作液 ( 需在使用前 1 h 内准备 )

① 按每孔需添加 100  $\mu\text{L}$  酶复合物工作液, 计算其总用量 ( 为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200  $\mu\text{L}$  ) ;

② 按 1  $\mu\text{L}$  酶复合物 添加 99  $\mu\text{L}$  酶复合物稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

检测流程

8. 通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于 4 $^{\circ}\text{C}$  或 -20 $^{\circ}\text{C}$ ;

注意: ① 标准品和样品建议做双复孔检测;

② 每次实验均需绘制标准曲线。

9. 将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品 (100  $\mu\text{L}$ / 孔 ) 分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 90 min;

注意: ① 请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;

② 整个加样过程不宜超过 10 min, 否则可能会影响检测结果。

10. 甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干;

11. 加入稀释后的生物素标记人 VEGFR1 抗体工作液 (100  $\mu\text{L}$ / 孔 ), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min;

12. 洗板 5 次, 每孔 1 $\times$  洗涤液用量为 300  $\mu\text{L}$ , 注入与吸出间隔 15~30s, 洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干;

注意: 洗涤过程至关重要, 洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

13. 加入稀释后的酶复合物 (100  $\mu\text{L}$ / 孔 ), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min;

14. 洗板 5 次, 方法同步骤 12;



15.加入显色剂 TMB(100  $\mu$ L/ 孔 ), 用封板胶纸封住反应孔, 避光 37℃ 反应 10~25 min;

注意: ① 在保存和使用时, 请勿将 TMB 接触氧化剂和金属;

② 因实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。

16.加入终止液 (100  $\mu$ L/ 孔 ), 混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450, 同时设定 540 nm 或 570 nm 作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值 (OD450-OD540 或 OD450-OD570);

注意: 读取 OD 值建议在 10 min 内完成。

#### 数据分析

17. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑 (4-PL) 曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

注意: ① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效, 复孔 OD 值取平均后可作为测量值;

② 若样品 OD 值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数。

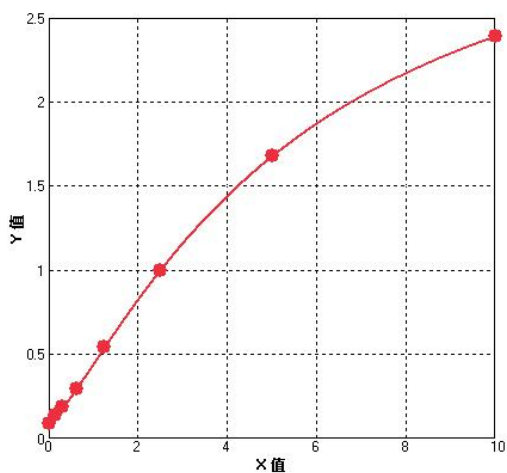
#### 标准曲线范例

人 VEGFR1 参考标准曲线

| 标准品浓度       | O.D.  |
|-------------|-------|
| 0 ng/mL     | 0.089 |
| 0.156 ng/mL | 0.138 |
| 0.312 ng/mL | 0.186 |
| 0.625 ng/mL | 0.297 |
| 1.25 ng/mL  | 0.540 |
| 2.5 ng/mL   | 1.001 |



|          |       |
|----------|-------|
| 5 ng/mL  | 1.681 |
| 10 ng/mL | 2.389 |



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

#### 注意事项：

1. 浓缩洗涤液 低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分；
3. 加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
4. 说明书中提到的室温条件，请严格控制在25~28℃；
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
6. 本产品仅限科研使用。