

利用SpectraMax L化学发光酶标仪进行VEGF 化学发光法免疫检测

By Cathy Olsen, Ph.D., Molecular Devices, Inc., 1311
Orleans Drive, Sunnyvale, CA 94089.

简介:

血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGFs)是一类分泌类多肽,其参与哺乳动物的血管发育和病理下血管的异常增生。在胚胎发生中已有VEGFs的表达,而敲除VEGFs,哪怕是一个VEGF等位基因的敲除都会严重影响血管发育并胚胎致死。在哺乳动物中,VEGF165是丰度最高的具有生物学活性的VEGF亚型1。QuantiGlo VEGF化学发光免疫测定法是应用固相ELISA分析细胞培养上清,血清,血浆,唾液和尿液等样本中VEGF165的水平。该方法基于定量免疫反应技术,将VEGF特异的单克隆抗体包被在96孔板上,并加入标准品和样品2。在清洗掉未结合的成分后,加入辣根过氧化物酶偶联的VEGF特异多抗至孔中。进一步通过清洗过程除去未结合抗体-酶复合物,最后加入luminol/peroxide底物(见图1)进行化学发光反应,其光强度和起始结合到孔板上的VEGF量成比例,并可以用微孔板化学发光酶标仪进行测量。

本应用中使用SpectraMax® L微孔板化学发光酶标仪进行检测,其兼容96和384孔板的快反应和慢反应体系。专为化学发光检测设计的光路设计使SpectraMax® L具有出众的信噪比率,更低的孔间干扰和超过8个数量级的动力学范围。SpectraMax® M5/M5e和FlexStation® 3多功能酶标仪的化学发光检测模式也能提供可比的结果。数据的收集和计算由SoftMax® Pro软件完成,其预设的模板极大的简化相应流程。

材料

- QuantiGlo人VEGF免疫测定试剂盒(R&D Systems P/N QVE00B)。该试剂盒包括标准品,预包被抗VEGF单抗板等相关试剂。
- SpectraMax L微孔板化学发光酶标仪。注意:该实验也可以用SpectraMax® M5/M5e和FlexStation® 3多功能酶标仪的化学发光检测模式进行检测。



方法

试剂和标准品的准备

1. 实验前将所有试剂平衡至室温。
2. 用去离子水10倍稀释洗涤液储液。
3. 使用前15分钟至4小时之内在塑料管中以1比2的比例混合Glo\试剂A和Glo试剂B,制备Glo工作液。避光保存。
4. 用0.5 ml 去离子水复融VEGF标准品,静置15分钟以上。轻度振荡后配置标准品。用Calibrator稀释液RD5L 10倍梯度稀释标准储液。标准品范围为20,000至1.3 pg/mL。试剂和标准品的准备试剂和标准品的准备

Oxidation of Luminol (Figure 1)

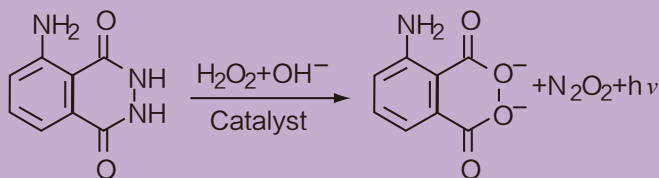


图1: 增强luminol/peroxide底物用于化学发光检测

实验步骤

1. 每孔加入150 μL 实验稀释液RD1-8
2. 在微孔板中按3复孔形式加入50 μL 标准品或空白对照(Calibrator稀释液)。室温轻度振荡(推荐 500 ± 50 rpm)微孔板2小时。
3. 孵育结束后使用排枪吸干孔内反应液,并用400 μL 洗涤液清洗4遍。最后吸干剩余洗涤液并在干净的吸水纸上拍干。
4. 每孔加入200 μL VEGF复合物,贴上新的粘合带。室温轻度振荡(推荐 500 ± 50 rpm)微孔板3小时。
5. 按照步骤3进行清洗步骤。
6. 每孔加入100 μL Glo工作液。室温避光孵育5至20分钟
7. 用SpectraMax L微孔板化学发光酶标仪测定RLU值。相关参数如下: 1秒检测时间, PMT自动和470 nm目标校准波长。

结果

图2显示由SpectraMax L微孔板化学发光酶标仪按照上述的参数所得的VEGF标准曲线,其动态范围超过4个数量级,计算所得的检测限,也就是空白对照信号标准差3倍值的相应量为1.5 pg/mL ,与R&D Systems宣称的该试剂盒平均检测下限为3.3 pg/mL 相符。类似的结果可由SpectraMax M5和FlexStation 3多功能酶标仪获得(结果未显示)。结果的分析 and 标准曲线的绘制均由SoftMax Pro 软件完成。

总结

Quantiglo人VEGF免疫测定法是一种高度灵敏的,可用于分析多种样本VEGF水平的检测手段。配合SoftMax Pro软件SpectraMax L 微孔板化学发光酶标仪为该检测方法提供了卓越的灵敏度和检测范围的同时,简化了数据的采集和分析过程。

文献

1. Holmes, David IR and Zachary, Ian (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology* 6: 209.
2. Quantiglo Human VEGF Immunoassay (P/N QVE00B) package insert.

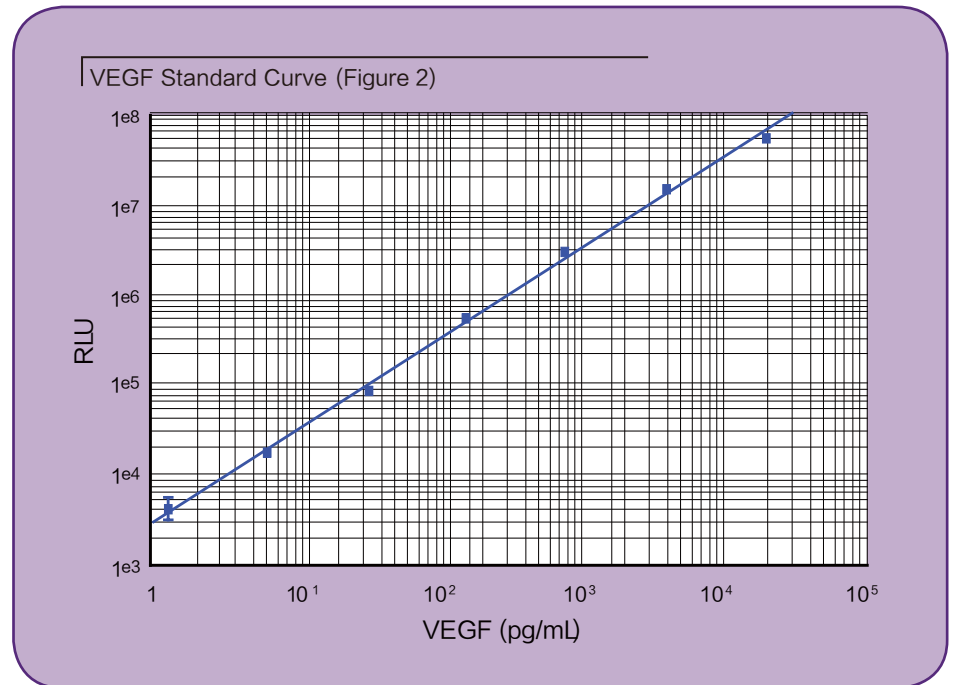


图2: 20000至1.3 pg/mL 的标准品检测曲线图。实验由SpectraMax L微孔板化学发光酶标仪按照1秒检测时间, PMT自动和470 nm目标校准波长的参数进行读取。标准曲线由SoftMax Pro软件绘制