

人FLT4/VEGFR3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: KE00957

规格: 96T

灵敏度: 0.03 ng/mL

检测范围: 0.156-10 ng/mL
0.313-20 ng/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞裂解液中的人FLT4/VEGFR3浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

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	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	8
9.7 特异性	9
十：参考文献	9

一：背景信息

FLT4，也称为血管内皮生长因子受体 3（VEGFR-3），是一种主要参与淋巴管生成和血管发育的受体酪氨酸激酶。它与配体VEGF-C和VEGF-D结合后激活下游信号通路，促进淋巴管内皮细胞增殖、迁移和存活。FLT4在胚胎发育期参与心血管和淋巴管形成，成年后主要表达于淋巴管内皮细胞，维持淋巴系统稳态。FLT4功能缺失突变导致Milroy病（先天性淋巴水肿），表现为下肢肿胀和纤维化。FLT4介导的淋巴管生成与多种癌症（如乳腺癌、黑色素瘤）的淋巴结转移密切相关，是预后不良的标志。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

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。

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 *	20 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1 (用于人血清和血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 3	样本稀释液 PT 3 (用于细胞裂解液样本)	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
Extraction Reagent	裂解液	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℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年
2：已开启试剂盒可在2-8℃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℃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℃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 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8℃)的1×PBS洗3次，500×g离心5 min。细胞计数，离心弃上清；加PMSF至细胞裂解液中，终浓度为1 mM；按每 1×10^7 个细胞，加入1 mL细胞裂解液(含PMSF)，冰上裂解30 min，其间上下颠倒使裂解更充分，超声波破碎处理，8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80℃存放，并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度，避免反复冻融。

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 HRP标记检测抗体 (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 HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

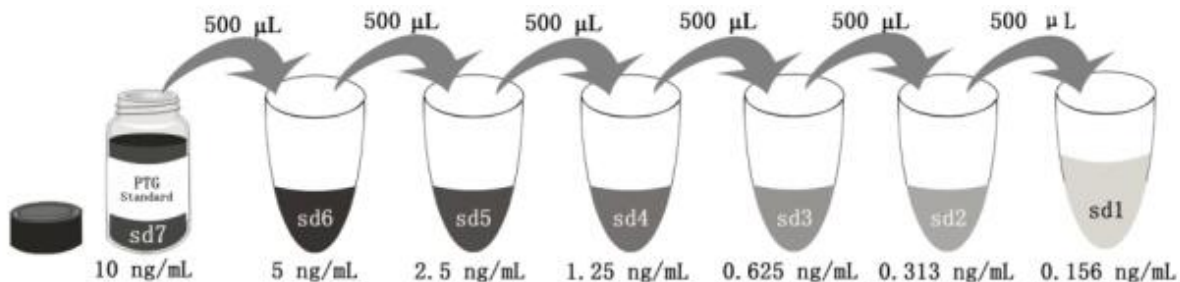
7.3 待检测样本：

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：人血清和血浆样本1:80或1:160稀释；细胞裂解液样本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。

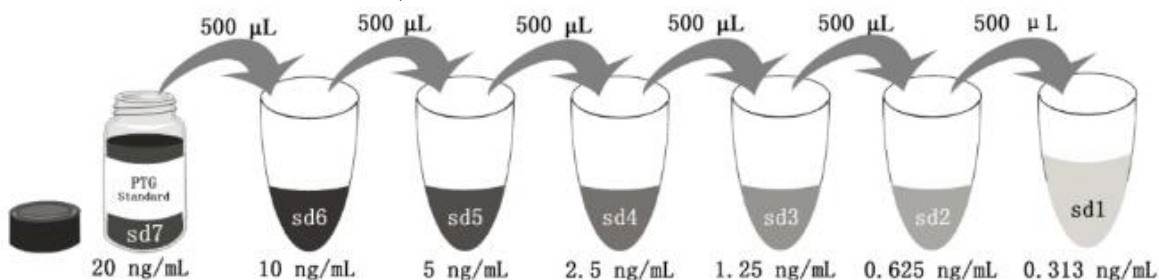
7.4 梯度稀释的标准品：

检测血清和血浆样本使用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"

检测细胞裂解液样本使用1 mL PT 3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 3	1000 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30min（HRP标记检测抗体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 HRP标记检测抗体（1×）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 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）；

8.8 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）

8.9 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；

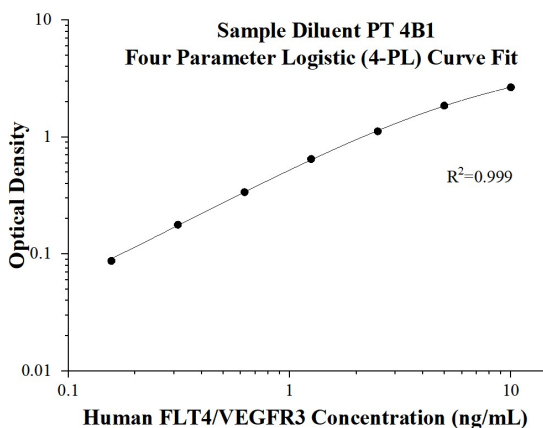
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

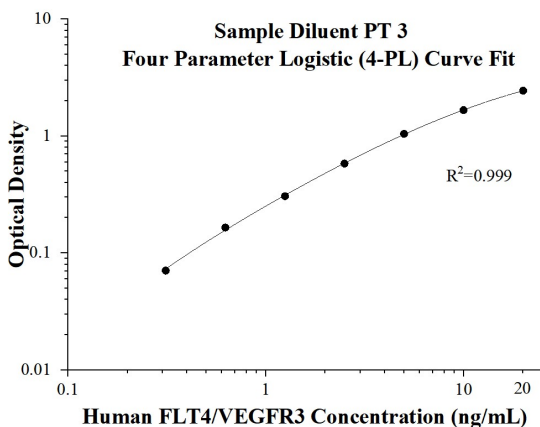
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0387 0.0551	0.0469	-
0.156	0.1381 0.1343	0.1362	0.08715
0.313	0.2251 0.2289	0.227	0.17795
0.625	0.384 0.3908	0.3874	0.33835
1.25	0.6887 0.7079	0.6983	0.64925
2.5	1.1361 1.2	1.16805	1.119
5	1.8918 1.9186	1.9052	1.85615
10	2.6829 2.7393	2.7111	2.66205



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0387 0.0551	0.0469	-
0.313	0.1167 0.1183	0.1175	0.0706
0.625	0.2136 0.2103	0.21195	0.16505
1.25	0.3422 0.3638	0.353	0.3061
2.5	0.6293 0.6276	0.62845	0.58155
5	1.0897 1.0887	1.0892	1.0423
10	1.7492 1.6817	1.71545	1.66855
20	2.4885 2.4885	2.4885	2.4416

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 8 次;

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	5.09	0.29	5.63
2	8	1.40	0.05	3.56
3	8	0.70	0.03	4.64

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	16	4.83	0.40	8.26
2	16	1.36	0.08	5.71
3	16	0.69	0.03	4.58

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FLT4/VEGFR3的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
人血清	1:320	121	105-133
细胞裂解液	1:16	81	75-91

9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒，检测人血清样本中人FLT4/VEGFR3的浓度。

样本类型	平均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血清 (n=16)	81.38	60.57-122.70

细胞裂解液

	人 FLT4 VEGFR3 (ng/mL)	总蛋白 (mg/mL)
HUVEC细胞裂解液	2896.27	2.20

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FLT4/VEGFR3的灵敏度为0.03 ng/mL。

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：

(人血清样本预先稀释40倍。)

		人血清 (样本稀释液PT 4B1)	细胞裂解液 (样本稀释液PT 3)
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	94	89
	范围 (%)	94-95	87-90
1:8	均值 (%)	99	100
	范围 (%)	98-99	96-105
1:16	均值 (%)	95	118
	范围 (%)	88-102	112-124

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人FLT4/VEGFR3。

十：参考文献

1. Aprelikova, O et al. Cancer research vol. 52,3 (1992): 746-8.
2. Jeltsch, M et al. Science (New York, N.Y.) vol. 276,5317 (1997): 1423-5.
3. Alitalo, Kari et al. Nature vol. 438,7070 (2005): 946-53.
4. Karkkainen, M J et al. Nature genetics vol. 25,2 (2000): 153-9.
5. Kuonqui, Kevin et al. Cells vol. 13,1 68. 28 Dec. 2023.