



产品使用说明书

# Rhinogen<sup>®</sup> VEGF Reporter Bioassay

货号：RA-CK24



## 目 录

目 录 .....	1
试剂包装与保藏条件 .....	2
试剂包装 .....	2
保藏条件 .....	2
产品综述 .....	3
背景 .....	3
概述 .....	3
特性 .....	3
用户自备实验材料 .....	4
试剂 .....	4
耗材及仪器 .....	4
试剂配制 .....	4
VEGF 报告基因测活细胞培养 .....	5
培养须知 .....	5
细胞复苏 .....	5
细胞传代 .....	6
细胞冻存 .....	6
VEGF 报告基因测活细胞检测 .....	7
操作简介 .....	7
试剂准备 .....	7
培养板检测孔布局设计 .....	9
接种 VEGF 报告基因测活细胞 .....	10
加入 VEGF .....	10
加入待检样品 .....	10
加入荧光素酶分析试剂检测光信号 .....	10
数据分析 .....	11
相关产品 .....	12
联系我们 .....	13

## 试剂包装与保藏条件

**试剂包装** Rhinogen® VEGF Reporter Bioassay 包装规格如下:

组分	规格	货号
VEGF 报告基因测活细胞 ( $5 \times 10^6$ cells/ml)	1 × 1ml	RA-CK24

**保藏条件** 收到细胞后, 请立即将 VEGF 报告基因测活细胞冻存管转移至-140°C 以下的保存条件长期保存。若将细胞暂时保存在-80°C 冰箱, 保存时间请勿超过 2 周。

## 产品综述

### 背景

血管内皮生长因子（Vascular Endothelial GrowthFactor, VEGF），是细胞内刺激血管生成的信号蛋白，具备促进血管新生和再生的功能。细胞内 VEGF 通过结合并活化细胞表面的血管内皮生长因子受体（Vascular Endothelial GrowthFactor Receptor, VEGFR，又称酪氨酸激酶受体），最终导致血管生成。VEGFR 有几种亚型：VEGFR1，VEGFR2，VEGFR3。VEGFR2（又称 KDR）介导几乎所有已知的受体对 VEGF 的细胞应答。VEGF/VEGFR 靶点抗体通过特异性的结合 VEGF/VEGFR，从而抑制下游信号通路，实现抑制血管生成。

单克隆抗体药物的生物学活性作为其关键质量属性在质控中而备受关注，目前用于测定 VEGF 靶点抗体生物学活性的经典方法为 HuVEC 增殖抑制法，其工作细胞为原代细胞，实验周期长，变异性大且操作复杂，为了保证用药的安全性和时效性，满足质量检验的需求，急需建立一种简单，快速，精确的检测方法用于 VEGF 靶点抗体生物学活性检测。

### 概述

Rhinogen® VEGF Reporter Bioassay 是一种生物发光报告基因检测方法，其作用机理（图 1）基于 VEGF 与 VEGFR2 的结合来刺激细胞应答。本系统采用工程改造的 Hek293 细胞作为测活细胞，该细胞株稳定表达 VEGFR2 以及由 NF- $\kappa$ B 应答元件驱动表达的萤火虫荧光素酶。当 VEGF 与 VEGF Responsive Cell 细胞结合时，受体转导细胞内信号进而产生光。

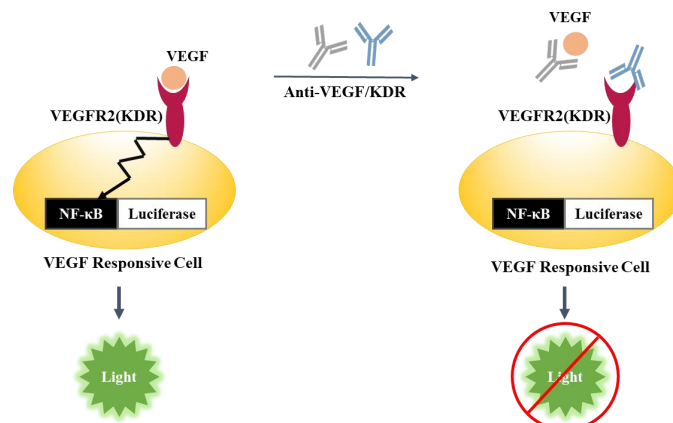


图 2. Rhinogen® VEGF Reporter Bioassay 原理图

### 特性

Rhinogen® VEGF 报告基因检测系统提供的 VEGF 药物生物学活性检测方法操作具有操作简便、变异性低、灵敏度高等特点。

- ✓ **通量高：**可在 96 孔、384 孔培养板中进行 VEGF 靶点抗体药物的高通量筛选、药物高通量检测
- ✓ **快速易用：**检测过程简单（图 2），检测试剂易用
- ✓ **信噪比高：**信号/背景的比率高

Rhinogen® VEGF 报告基因检测系统的各项特性使得其可作为针对 VEGF 药物筛选及检测的有效手段。同时，该法可作为针对 VEGF 药物的生物学活性常规检测方法 & 批签发检测指标。

## 用户自备实验材料

<b>试剂</b>	✓ DMEM/F12 培养基
	✓ FBS
	✓ G418 (Rhinogen, Cat.# RA-AD02)
	✓ 潮霉素 B (Hygromycin B) (Rhinogen, Cat.# RA-AD03)
	✓ 博来霉素 (Rhinogen, Cat.# RA-AD05)
	✓ 0.25%Trypsin-EDTA (1×) or 柠檬酸钠
	✓ DMSO
	✓ PBS
	✓ 台盼蓝溶液
	✓ 荧光素酶分析试剂 (推荐使用 Bio-Glory™ One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒, Rhinogen®, Cat.# RA-GL04)
<b>耗材及仪器</b>	✓ 白色平底 96 孔发光检测板
	✓ 96 孔稀释板
	✓ 冻存管
	✓ 单道或多道加样枪
	✓ 无菌 15ml 和 50ml 离心管
	✓ 无菌加样槽
	✓ 37°C、5%CO <sub>2</sub> 培养箱
	✓ 37°C 水浴锅
✓ 96 孔板化学发光检测仪器	
<b>试剂配制</b>	✓ 细胞生长培养基: 90% DMEM/F12 培养基, 10% FBS, 200µg/ml G418, 25µg/ml Hygromycin B 及 50µg/ml 博来霉素
	✓ VEGF 检测缓冲液: 99.9% DMEM/F12 培养基, 0.1% FBS
	✓ 细胞冻存培养基: 80% DMEM/F12 培养基, 10% FBS, 10% DMSO

## VEGF 报告基因测活细胞培养

---

### 培养须知

- 本产品含 1 支冻存的 VEGF 报告基因测活细胞，细胞密度为  $5 \times 10^6$  cells/ml，冻存体积为 1ml，冻存培养基为 80% DMEM/F12 培养基，10% FBS, 10% DMSO。
  - 请使用第 5 页方法进行 VEGF 报告基因测活细胞的复苏。
  - 避免剧烈的温度变化：收到干冰运输的冻存细胞后，如非立刻使用，则尽快将细胞转移至液氮罐中，复苏前，保证细胞已在液氮中保存 3-4 天。
  - 对于细胞的操作需要温和，避免剧烈的摇晃或吹打细胞。
  - 在开始检测实验前，请确保细胞已经进行冻存保种。保种时，请注意细胞代次，尽量以低代次细胞建库使用。
  - 冻存的细胞需要保存在  $-140^{\circ}\text{C}$  以下环境直至使用。
  - 在进行细胞复苏及传代过程中，请使用预热培养基。
- 

### 细胞复苏

1. 将装有细胞的冻存管浸于  $37^{\circ}\text{C}$  水浴，轻柔晃动 1-2min 快速融化细胞。
  2. 在超净工作台以 70%酒精消毒冻存管外周。
  3. 打开冻存管，轻柔的将细胞转移至装有 5ml 细胞生长培养基的无菌离心管中。
  4. 室温下  $125 \times g$  离心 5min（更高速度离心会影响细胞活力），吸去上清，用 5ml 在  $37^{\circ}\text{C}$  预热的细胞生长培养基重悬细胞。
  5. 放入  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱培养。细胞代次记作第 1 代（P1）。  
**重要：**培养基请置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱至少 15min 使其 pH 平衡至中性后，再用于细胞的培养。在细胞复苏过程中，过度碱性的培养基会对细胞造成伤害。  
**注：**细胞传代过程中，请严格记录细胞代次，每传代 1 次作为 1 个代次。
  6. 培养 1-2 天后，确定细胞密度及活力，收集所有细胞室温下  $125 \times g$  离心 5min，吸去上清，用 5-10ml 在  $37^{\circ}\text{C}$  预热的细胞生长培养基重悬细胞，并将细胞转移至适合的培养瓶中，放入  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱培养。  
**注：**细胞复苏后需 1 周左右恢复期，细胞倍增率稳定后即可用于检测或冻存。传代时细胞活力一般在 80%以上。
-

---

## 细胞传代

1. 显微镜下观察，当细胞覆盖率达到80-90%时，进行传代，每2-4天进行传代；
2. 培养箱中取出培养瓶，弃去上清，然后加入10 ml的PBS，轻轻冲洗细胞，并去除PBS；
3. 根据培养瓶表面积加入1~5ml 0.25%Trypsin-EDTA到细胞培养瓶中（T25培养瓶推荐使用1~2ml，T75培养瓶推荐使用2~3ml，T225培养瓶推荐使用3~5ml），使其覆盖细胞；
4. 37°C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育1-3 min；
5. 轻轻拍打培养瓶，使细胞单层脱落，可观察到细胞开始滑落；
6. 用10mL移液管向培养瓶中加入约3倍体积0.25%Trypsin-EDTA的细胞生长培养基，终止胰酶消化，轻柔吹打重悬细胞直至看不到细胞团聚物，并转移到50 ml的离心管中，旋紧盖子；
7. 将离心管置于离心机中离心，离心参数设置：室温125×g，离心5min；
8. 弃去上清，并加入10mL的细胞生长培养基重悬细胞；
9. 细胞计数并按照接种密度为1-2×10<sup>5</sup> cells/mL进行传代；
10. 选择T25、T75或T225细胞培养瓶，于37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养至满足实验需求。

---

## 细胞冻存

1. 确定细胞密度及活力。
  2. 转移细胞悬液至 50ml 离心管，室温 125×g 离心 5min 收集细胞。
  3. 以适当体积的预冷细胞冻存培养基重悬细胞，使细胞密度达到 5×10<sup>6</sup>cells/ml。
  4. 每管 1ml 细胞悬液分装于冻存管中。
  5. 将冻存管置于适当的容器中-80°C 冰箱过夜缓慢降温。
  6. 将冻存管转移至-140°C 冰箱或者液氮中保存。
-

## VEGF 报告基因测活细胞检测

### 操作简介

- 以举例的方法来说明如何操作 VEGF 报告基因测活细胞进行检测。
- 下面将在 96 孔板中检测 2 个待检样品，每个样品均为 9 个浓度稀释点，每浓度 3 复孔。
- 针对不同样品，检测条件可调整优化，主要为接种细胞数目、样品浓度范围及梯度、诱导时间。
- 样品浓度范围及梯度调整可参考本说明书第 6 页“梯度稀释待检样品”部分内容
- 诱导时间可在 2-24h 调整。
- 加样顺序为 VEGF 测活细胞株 → VEGF → 待测样品 → 荧光底物（图 2）。
- 建议针对您的检测系统进行优化以获得最佳数值。

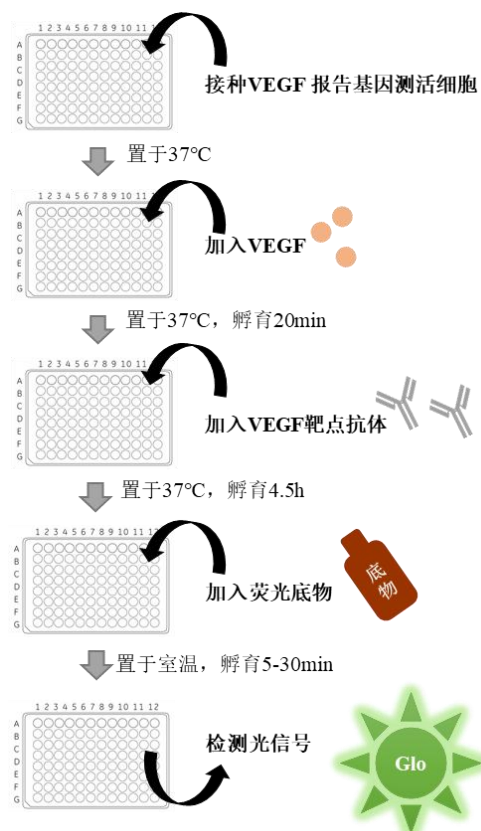


图 3. Rhinogen® VEGF Reporter Bioassay 检测流程图

### 试剂准备

#### 1. 荧光素酶分析试剂

按照试剂盒说明书进行。如果使用推荐的 Bio-Glory® One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒，则按照以下流程进行：

实验当天提前 4-6h 配制底物试剂，首先将荧光素酶反应缓冲液及荧光素酶反应底物取出解冻并平衡至室温。用移液枪取出少量荧光素酶反应缓冲液至装有荧光素酶反应底物的棕色西林瓶中，反复吹吸几次以溶解底物干粉。将溶解后的底物溶液转回至荧光素酶反应缓冲液的棕色瓶中，重复上述步骤多次，确保底物完全转



移至缓冲液中，轻柔颠倒混合直至完全溶解，室温（22-25℃）避光保存，待用。

## 2. 检测缓冲液

检测当天将适量 VEGF 检测缓冲液（含 0.1% FBS 的 DMEM）提前预热至 37℃。一般 2 块 96 孔板的检测，预热 35-50ml 检测缓冲液已足够使用。

## 3. 梯度稀释待检样品

若无相关数据参考，可选用 10 $\mu$ g/ml 作为起始浓度，3 倍比稀释数个梯度后进行检测，根据实验结果再调整样品工作浓度范围。

实验当日上午，按照图 5 所示操作流程进行样品稀释：

- 1) 依次将一定体积的待检样品采用适量的 VEGF 检测缓冲液在 1.5ml 离心管中稀释至 10 $\mu$ g/ml（记为 dilu1）。
- 2) 在 96 孔稀释板中第 2 列至第 9 列中加入 100 $\mu$ l VEGF 检测缓冲液。
- 3) 然后取 dilu1 样品 150 $\mu$ l/孔加至 96 孔稀释板中第一列，后续稀释过程按照稀释表格（表 1）在 96 孔稀释板（图 3）中用排枪进行稀释。

表 1. 抗体样品稀释梯度表

稀释代号	稀释步骤	抗体浓度 (ng/ml)
dilu1	根据样品浓度进行稀释	10000
dilu2	50 $\mu$ l dilu1 + 100 $\mu$ l VEGF 检测缓冲液	3333.333
dilu3	50 $\mu$ l dilu2 + 100 $\mu$ l VEGF 检测缓冲液	1111.111
dilu4	50 $\mu$ l dilu3 + 100 $\mu$ l VEGF 检测缓冲液	370.3704
dilu5	50 $\mu$ l dilu4 + 100 $\mu$ l VEGF 检测缓冲液	123.4568
dilu6	50 $\mu$ l dilu5 + 100 $\mu$ l VEGF 检测缓冲液	41.15226
dilu7	50 $\mu$ l dilu6 + 100 $\mu$ l VEGF 检测缓冲液	13.71742
dilu8	50 $\mu$ l dilu7 + 100 $\mu$ l VEGF 检测缓冲液	4.572474
dilu9	50 $\mu$ l dilu8 + 100 $\mu$ l VEGF 检测缓冲液	1.524158

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
C	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
D	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
E	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
F	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
G	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
H												

图 3. 96 孔稀释板排布图

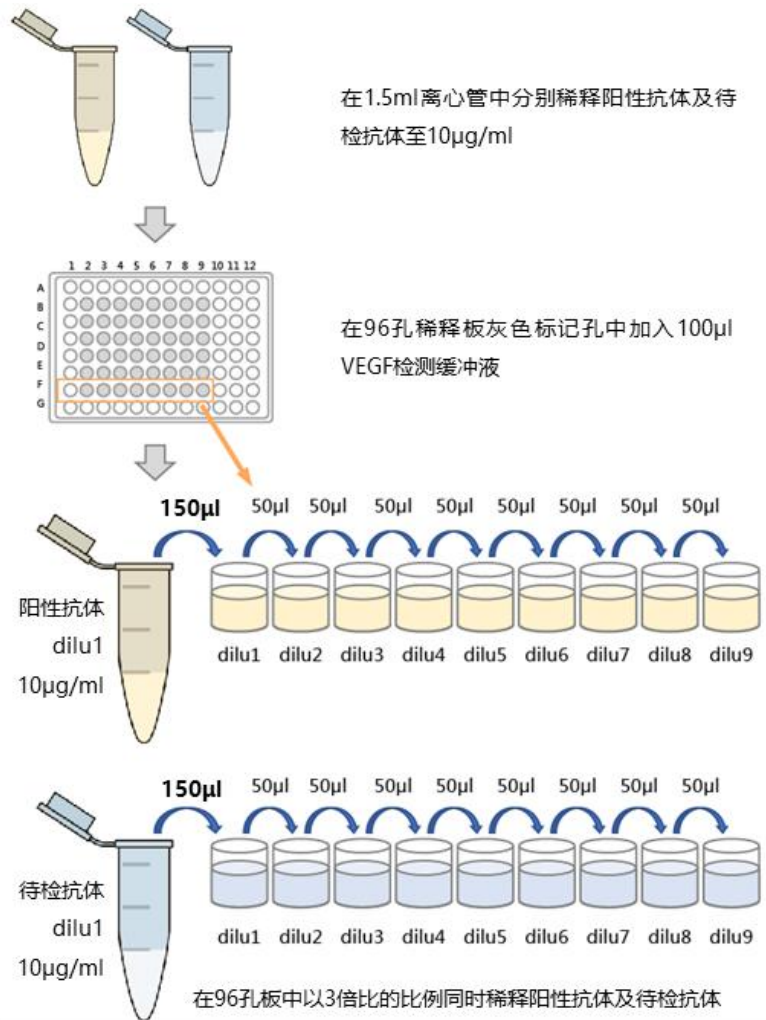


图 4. 待检样品稀释流程

**培养板检测孔布局设计**

检测板的排布有 2 种形式供您选择，一种为图 5 所示的常规形式，另一种为图 6 所示的随机排布形式。其中图 5 排布形式方便操作；图 6 排布形式可降低位置效应带来的孔间差异。

孔板在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中放置时，建议在孔板上下叠加辅助板，以避免与金属托盘直接接触，减少孔间差异。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
阳性抗体		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9	NTC	
		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
待检抗体		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9	BG	
		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		

H												
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

图 5. 检测板排布（常规）

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
阳性抗体	B		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9	NTC	
	C		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
	D		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
待检抗体	E		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9	BG	
	F		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
	G		dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
H													

图 6. 检测板排布（随机）

注：NTC, Negative control, 阴性对照；BG, Background, 背景；黄色标记孔和蓝色标记孔为不同待见样品检测孔。

**接种  
VEGF 报  
告基因测  
活细胞**

1. 细胞准备：参照细胞传代（本说明书第5页“细胞传代”）操作步骤，终止消化后离心弃去上清，用10ml VEGF检测缓冲液（含0.1% FBS的DMEM/F12）轻柔吹打5~8次重悬制成单细胞悬液；
2. 细胞计数：取细胞悬浮液600μl，用细胞计数仪计数。根据实验需求，若细胞活率≥85%，活细胞密度满足要求则进行细胞接种；若不满足细胞活率和密度要求则继续传代培养或重新复苏细胞；
3. 根据计数结果，用预热的VEGF检测缓冲液将细胞密度调整为 $6\pm 0.5 \times 10^5$  cells/ml；
4. 用多通道移液器向96孔白板B-G行的2-11列中每孔加入50 μl的细胞悬液，每孔（图4所示NTC及黄色、蓝色标记孔）的细胞个数为30000。100μl VEGF检测缓冲液作为背景加入孔板内的背景孔（BG）中。96孔白板的其余空白孔每孔加入100 μL的VEGF检测缓冲液或PBS，盖上96孔板盖；
5. 暂至于37°C，5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。
6. **注意：**接种时，枪尖贴壁加液，轻柔加入，减少对 VEGF 测活细胞株的损伤。

**加入  
VEGF**

用 VEGF 检测缓冲液将 VEGF 稀释至 4ng/mL，加至已接种 VEGF 测活细胞株的孔板中，每孔 120μl，至于 37°C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 20min。

**加入待检  
样品**

将各稀释梯度待检样品加至上述 96 孔板中，每孔 50μl，每个测量点 3 复孔。以 100μl VEGF 检测缓冲液代替待检样品，加至阴性对照孔（NTC）及背景孔（BG）中。将完成加样的 96 孔板置 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4.5h。

**加入荧光**

1. 将检测板从培养箱中取出，放置于室温（22-25°C）中，平衡至少 15min。

**素酶分析  
试剂检测  
光信号**

- 
2. 用排枪将 Bio-Glory® One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂加入至所有检测孔中（含 NTC 及 BG 孔），30 $\mu$ l/孔，避免产生气泡。  
**注：Bio-Glory® One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂必须平衡至室温后再加入。**
  3. 室温避光孵育 5-30min。
  4. 将孔板放入 96 孔板化学发光检测仪器中检测光信号。
- 

**数据分析**

1. 计算平均背景值。
  2. 计算诱导倍数（Fold of induction, FI）=（诱导孔数值-背景值）/（阴性对照孔数值-背景值）  
**注：计算诱导倍数时，如果样本数值高于背景值 100 倍以上，则不必减去背景值。**
  3. 以具有拟合曲线功能的软件制作图形数据，计算抗体效应的 EC<sub>50</sub> 数值。数据纵坐标为光信号值或诱导倍数，横坐标为样品浓度的对数值（Log<sub>10</sub>）。
-

## 相关产品

产品名称	货号
ADCC Reporter Bioassay, Core Kit	RA-CK01
ADCC Reporter Bioassay, Complete (Raji)	RA-CK02
ADCC Reporter Bioassay, Complete (WIL2-S)	RA-CK03
ADCC Reporter Bioassay, Complete (BT474)	RA-CK04
ADCC Reporter Bioassay, Complete (A431)	RA-CK05
潮霉素 B (Hygromycin B) 50mg/ml, 1ml	RA-AD03
博来霉素 (Zeocin) 100mg/ml, 1ml	RA-AD05

## 联系我们

---

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- 电 话：[0512-87663137](tel:0512-87663137)
  - 技术支持：[techserv@rhinobio.com](mailto:techserv@rhinobio.com)
-

# RHINO BIO



上海瑞诺生物科技有限公司  
苏州瑞特佰生物科技有限公司  
网 址: [www.rhinobio.com](http://www.rhinobio.com)  
电 话: 0512-87663137  
邮 箱: [techserv@rhinobio.com](mailto:techserv@rhinobio.com)



公众号



联系客服

