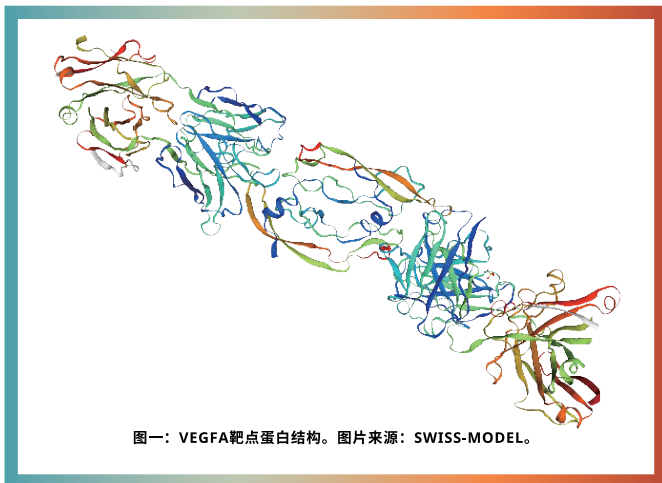


VEGFA (VEGFA)



VEGFA 靶点介绍

蛋白功能

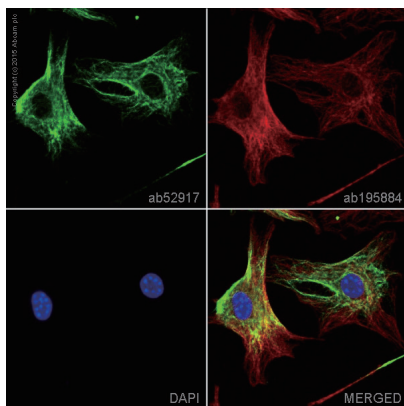
- 在血管生成和内皮细胞生长中具有生长因子活性。
- 诱导内皮细胞增殖，促进细胞迁移，抑制细胞凋亡并诱导血管透化。
- 与 FLT1 / VEGFR1 和 KDR / VEGFR2 受体，硫酸乙酰肝素和肝素结合。
- VEGFA 存在多个异构体，如 VEGF-206, VEGF-165, VEGF-145 等。
- NRP1 / Neuropilin-1 结合异构体 VEGF-165 和 VEGF-145。
- 异构体 VEGF165B 与 KDR 结合，但不激活下游信号通路，不激活血管生成并抑制肿瘤生长。

蛋白表达

- 异构体 VEGF189、VEGF165 和 VEGF121 广泛表达。
- 异构体 VEGF206 和 VEGF145 表达不广泛。
- 与垂体相比，在垂体肿瘤中的表达水平更高。
- VEGFA 的表达在胚胎发生过程中上调，随后下调，但在生理性和病理性血管生成中 VEGFA 的表达再次上调。

蛋白定位

- VEGFA 属于分泌型蛋白。
- 异构体 L-VEGF189 定位于内质网、高尔基体，也可分泌，定位于细胞外空间，细胞外基质。
- N-VEGF 定位于细胞质和细胞核。
- 异构体 VEGF121、异构体 VEGF165 和异构体 VEGF189 是分泌型。



图二：VEGFA ICC 实验结果图，
Anti-VEGFA 抗体 [EP1176Y] (ab52917)。
绿色：VEGFA，红色：Tubulin，蓝色：DAPI。

异构体 & 翻译后修饰

- 人 (P15692)：异构体 1 (VEGF206) , 2 (VEGF189) , 3 (VEGF183) , 4 (VEGF165) , 5 (VEGF148) , 6 (VEGF145) , 8 (VEGF165B) , 9 (VEGF121) , 10 (VEGF111) , L11 (VEGF165) , L12 (VEGF121) , L13 (VEGF189) , L14 (VEGF206) , 15-18: 16-45kDa (预测)
- 小鼠 (Q00731)：异构体 1-6: 14-40kDa (预测)
- 大鼠 (P16612)：异构体 1-4: 17-25kDa (预测)
- 存在 N- 糖基化修饰。

WB 实验贴士

注意事项

- VEGFA 的表达在胚胎发生过程中上调，在出生后几周内大多数组织中 VEGFA 表达下降，在大多数成年器官中表达相对较低，可能较难检测。
- VEGFA 由多种细胞类型产生，包括主动脉血管平滑肌细胞、角化细胞、巨噬细胞和许多肿瘤细胞。
- 由于 VEGFA 在不同组织表达差异很大，建议选择高表达的样本作为阳性对照，例如 bEND.3 全细胞裂解液。
- 由于 VEGFA 异构体较多，并且有可能被翻译后修饰，因此不同样本中，可能会检测到不同的多带现象或者分子量大小不同的现象。

阳性对照

- 重组人和小鼠 VEGFA 蛋白。
- bEND.3 全细胞裂解物。

结果示例

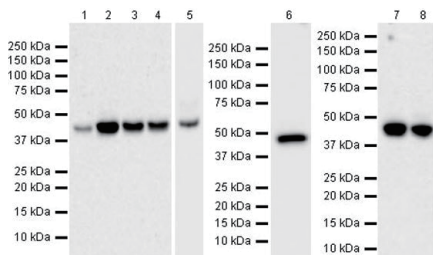


图 三：WB-Anti-VEGFA 抗体 [EPR20705] (ab214424)。

泳道 1：20 μ g 人胎儿血管裂解液。

泳道 2：20 μ g HeLa(人宫颈腺癌上皮细胞系)全细胞裂解液。

泳道 3：20 μ g HUVEC(人脐静脉内皮细胞系)全细胞裂解液。

泳道 4：20 μ g SH-SY5Y(人骨髓神经母细胞瘤细胞系)全细胞裂解液。

泳道 5：20 μ g neuro2a(小鼠神经母细胞瘤细胞系)全细胞裂解液。

泳道 6：20 μ g bEND.3(小鼠脑内皮瘤细胞系)全细胞裂解液。

泳道 7：20 μ g C6(大鼠胶质肿瘤细胞系)全细胞裂解液。

泳道 8：20 μ g RAW 264.7 (Abelson 小鼠白血病病毒转化小鼠巨噬细胞系)全细胞裂解液。

一 抗：Anti-VEGFA 抗体 [EPR20705](ab214424)，浓度 1/1000 稀释。

二 抗：使用 HRP 标记山羊抗兔二抗 (ab97051)，浓度 1/100000 稀释。

预测条带大小：27kDa

检测条带大小：40kDa

曝光时间：3 分钟 (泳道 1-4, 7, 8)；41 秒 (泳道 5)；15 秒 (泳道 6)。

关键控制点

在实验中除了需要注意常规问题外，还要特别关注以下关键控制点：

- 样本制备：» 添加复合蛋白酶抑制剂以避免靶蛋白降解。
 - » 整个样本制备过程中，保持样本置于冰上。
 - » 通过 Bradford 分析、Lowry 分析或 BCA 分析测定样本总蛋白浓度。
- 电泳：» 对于分子量较小的靶蛋白，请使用较高浓度的分离胶进行电泳。
 - » 至少上样 20 μ g 总蛋白进行电泳。
- 转膜：» PVDF 膜，建议孔径 0.22 μ m。
 - » 建议转膜完成后使用丽春红染色，确定转膜是否成功。
- 检测：» 由于 VEGFA 在很多样本表达量较低，若无信号或信号弱时，建议选择超敏显色液。
 - » 若无信号或信号弱时，适当增加曝光时间。

IHC 实验贴士

注意事项

- VEGFA 的表达在胚胎发生过程中上调，在出生后几周内大多数组织中 VEGFA 表达下降，除了少数血管床，包括脑脉络膜丛、肺泡、肾小球和心脏在大多数成年器官中表达相对较低，可能较难检测。
- 由于 VEGFA 在不同组织表达差异很大，建议选择高表达的样本作为阳性对照，例如血管丰富的组织、肾组织肾小球部位。

阳性对照

- 人肾组织。

结果示例

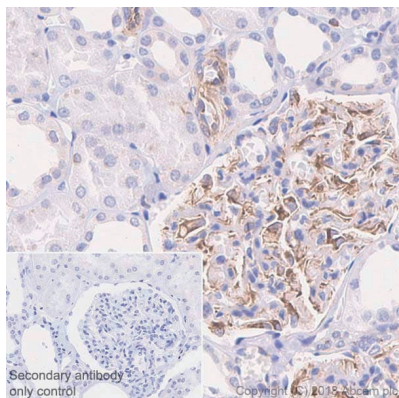


图 四：IHC-Anti-VEGFA 抗体 [EP1176Y]-C-terminal (ab52917)

样品名称：福尔马林 /PFA 固定的人肾组织石蜡切片

一 抗：使用 Anti-VEGFA 抗体 [EP1176Y]-C-terminal (ab52917)，浓度 1/100 稀释 (2.96 μ g/ml)。

二 抗：使用 HRP 标记的山羊抗兔二抗。

抗原修复方法：使用 pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液进行热诱导抗原修复。

关键控制点

在实验中除了需要注意常规问题外，还要特别关注以下关键控制点：

- 样本固定：» 样本固定时间取决于组织块大小与组织类型，但对于大多数样本，室温固定 18-24 小时较为合适。
 - » 过度固定则会封闭抗原表位，虽然抗原修复会暴露其中一部分表位，但如果组织固定时间非常长（如一周以上），则会发生抗原修复后依然无信号的现象。
- 抗原修复：» 对石蜡切片进行免疫组化实验时，我们建议使用高压锅进行热诱导抗原修复。可以尝试 110 $^{\circ}$ C 修复切片 15 分钟。
- 抗体孵育：» 建议您在湿盒中进行抗体孵育，防止发生干片现象。

参考文献

PMID: 11427521, 16489009, 25825981, 35964475, 15693956.