

Human VEGF Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)は、ヒト下垂体前葉由来細胞株の培養上清から発見された血管内皮細胞に特異性の高い増殖因子であり、同時に発見されたVPF (Vascular Permeability Factor)と同一の因子であることが遺伝子解析の結果明らかになりました。タンパク質の三次構造の基本はPDGF (Platelet Derived Growth Factor)と類似しており、PDGFファミリーの一員とされています。

VEGFは培養血管内皮細胞の増殖、遊走、プロテアーゼ活性の亢進、コラーゲンゲル内での血管様構造の形成など血管新生の為のすべてのステップを促進し、*in vivo*でも血管新生や血管透過性を促進します。また多くの腫瘍細胞から産生分泌され、そのレセプターはおもに血管内皮細胞で発現していることから、腫瘍の血管新生との関連が考えられています。

本製品は、Human VEGF (VEGF-A)を測定するために特異性の高いモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ法によるEIAキットです。本製品は、組み換え体、自然体どちらのHuman VEGFも測定可能です。

2. 原理および測定方法

本製品は、サンドイッチ法によるEIA (Enzyme Immuno Assay) キットです。1次抗体は、プレートに固相されていますので、検体および標準物質を加え、1次反応を行い、洗浄後、HRP 標識された2次抗体を加え、2次反応を行います。反応後、過剰の2次抗体を洗浄除去します。Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この発色は、Human VEGFの量に比例します。

3. 測定範囲

15.63 ~ 1,000 pg/mL (1次反応 37°C60分間)
7.81 ~ 500 pg/mL (1次反応 4°C over night)

4. 使用目的

培養上清およびEDTA-血漿中のHuman VEGFを測定できます。

5. 構成試薬

1 抗体プレート (抗 Human VEGF (16F1) Mouse IgG MoAb A.P.固相)	96Well x 1
2 標識抗体濃縮液 (30倍濃度 HRP 標識抗 Human VEGF-1 Rabbit IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (Recombinant Human VEGF 165)*	0.5mL x 2
4 希釈用緩衝液*	30mL x 1
5 標識抗体用溶解液*	12mL x 1
6 TMB 基質液	15mL x 1
7 停止液*	12mL x 1
8 濃縮洗浄液*	50mL x 1

6. 用法および用量 (操作方法)

(1) 必要な器具・器材

プレートリーダー (測定波長: 450nm)	マイクロピペットおよびチップ
恒温器 (37°C±1°C)	洗浄ビン
希釈用テストチューブ	メスシリンダーおよびビーカー
精製水	グラフ用紙 (両対数)
ペーパータオル	冷蔵庫 (4°Cとして)
採取用容器 (未使用試験管など)	

(2) 準備

濃縮洗浄液の希釈方法

濃縮洗浄液は40倍濃度です。使用前に常温に戻し十分に転倒混和します。濃縮洗浄液50mLに対して精製水を1,950mL加え混和します。これを洗浄液とします。冷蔵保存し2週間以内に使用してください。

標識抗体の希釈方法

標識抗体は30倍濃度です。

別に用意した採取用容器にて、必要量に応じて標識抗体濃縮液を標識抗体用溶解液で30倍希釈してください。これを標識抗体とします。

希釈例)

1スリット (8ウェル) 使用する場合 = 800μL 必要 (最低量)

(標識抗体濃縮液を30μLとり、標識抗体用溶解液870μLを加え、良く混和し、100μLずつ使用します。)

この操作は、標識抗体添加の直前におこなってください。

標識抗体濃縮液の残りは、蓋をしっかりと閉め、冷蔵保存してください。有効期限内に再度使用できます。

標準物質の希釈方法

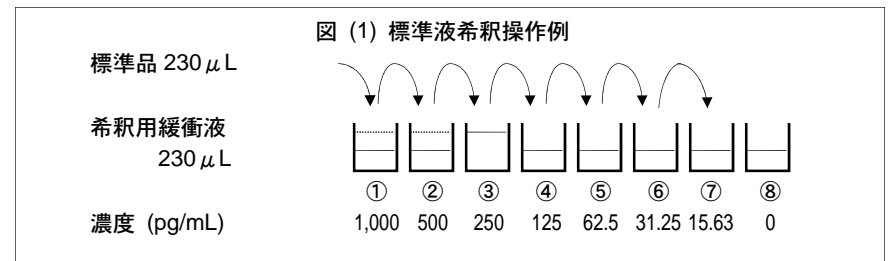
標準物質のバイアル瓶に精製水を0.5mL加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は2,000pg/mLとなります。

溶解後の標準物質は凍結保存することができます。凍結融解の繰り返しはできません。

希釈用テストチューブを8本用意し、希釈用緩衝液を230μLずつ量り取り、各々のテストチューブに

1,000pg/mL, 500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62.5pg/mL, 31.25pg/mL, 15.63pg/mL, 0pg/mLの表示をします。

1,000pg/mLの希釈用テストチューブに2,000pg/mLの標準物質溶液を230μL加え、混和し、その溶液230μLを500pg/mLの希釈用テストチューブに加え、混和します。順次2倍連続希釈をおこない1,000pg/mL~15.63pg/mLまでの7点を希釈標準品とし、0pg/mLを検体ブランクとします。(図(1)参照)



検体の希釈方法

検体は必要に応じて、希釈用緩衝液にて希釈してから測定してください。

(3) 測定操作方法

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し、変化のない事を確かめてください。

検体の測定と同時に希釈標準品を測定し、検量線を設定してください。

1 ブランクの添加 (以降図(2)参照)

試薬ブランクを設定し希釈用緩衝液を100μL入れます。

2 検体、希釈標準品の添加

検体100μL、および、希釈標準品各100μL並びに検体ブランク100μLを入れます。

3 プレートカバーをして37°C60分間または4°C over night 反応

4 ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。

5 標識抗体の添加

検体、標準、検体ブランクに標識抗体を各々100μL添加します。

6 プレートカバーをして4°C30分間反応

7 ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。

8 TMB 基質液の添加

あらかじめ必要量を採取用容器にとり、そこからすべてのウェルにTMB基質液を100μL添加します。TMB基質液添加後、反応液は徐々に青色に変わります。この時の反応は遮光して下さい。また、採取用容器に残ったTMB基質液は、コンタミの原因になりますので、元に戻さないでください。

9 遮光をして常温30分間反応

10 停止液の添加

すべてのウェルに停止液を100μL添加します。プレートの側面を軽くたたいて混和します。反応液は青色から黄色に変化します。

11 吸光度測定

プレート底面のよごれや水滴を拭き取り、液面に気泡がないことを確認した後、30分以内に試薬ブランクを対照として、検体および標準、並びに検体ブランクの波長450nmにおける吸光度を測定してください。

図(2) 測定操作一覧

	検体	標準	検体ブランク	試薬ブランク
試料	検体 100μL	希釈標準品 100μL	希釈用緩衝液 100μL	希釈用緩衝液 100μL
プレートカバーをして37°C60分間または4°C over night 反応				
4回 (洗浄液350μL以上)				
標識抗体	100μL	100μL	100μL	-
プレートカバーをして4°C30分間反応				
5回 (洗浄液350μL以上)				
TMB 基質液	100μL	100μL	100μL	100μL
遮光常温30分間反応				
停止液	100μL	100μL	100μL	100μL
プレートをたたいて反応液を混和し、30分以内に試薬ブランクを対照として450nmにおける検体、標準、検体ブランクの吸光度を測定				

7. 操作上の注意事項

- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温で行い、測定前に十分混和してください。
- 2 検体は必要に応じて希釈用緩衝液にて希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定することをお奨めいたします。
- 4 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 5 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確に行ってください。
- 6 洗浄液は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に除去してください。ペーパータオルをウェルの中に入れる事はしないでください。
- 7 TMB 基質液は光に対して敏感です。遮光保存してください。金属との接触も避けてください。
- 8 吸光度測定は、停止液添加後30分間以内に行ってください。
- 9 検体中にヘパリンが存在する場合、低値を示す傾向があります。

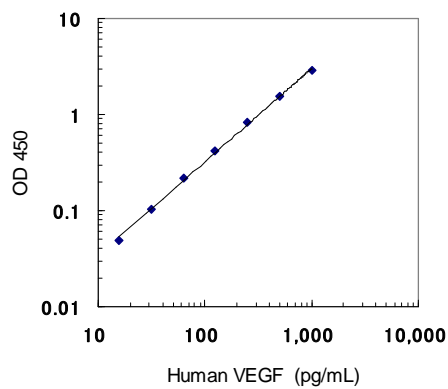
8. 測定結果の算出方法

対数グラフの縦軸に吸光度を、横軸に検体濃度を取り各標準物質濃度の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値を取り、検量線を設定します。

試料検体の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値を検量線に当てはめ、検体濃度を読みとります。

9. 測定値と検量線作成例 (1次反応 37°C60分間の場合)

標準品濃度 (pg/mL)	吸光度 (450nm)
1,000	2.855
500	1.544
250	0.836
125	0.433
62.5	0.236
31.25	0.121
15.63	0.068
0 (検体ブランク)	0.018



*上記検量線は作成例です。測定に当たってはその都度検量線を作成してください。

10. キットの性能

(1) 希釈試験 (標準物質を添加したサンプルを使用しています)

検体	希釈倍率 (x)	測定値 (pg/mL)	理論値 (pg/mL)	%
培地 (10% FBS 添加)	4	256.97	250.93	102.4
	8	113.30	125.00	90.6
	16	59.71	63.43	94.1
	32	30.28	31.85	95.1
EDTA 血漿 (健常人)	8	280.71	251.88	111.4
	16	119.18	125.00	95.3
	32	57.69	62.50	92.3
	64	28.46	31.25	91.1

(2) 添加回収試験

検体	理論値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	%
培地 (10% FBS 添加) (X4)	250.54	264.72	105.7
	125.54	120.31	95.8
	63.04	58.80	93.3
	31.79	30.05	94.5
EDTA 血漿 (健常人) (X16)	252.38	202.64	80.3
	127.38	90.52	71.1
	64.88	46.08	71.0
	33.63	23.27	69.2

(3) 同時再現性

測定値 (pg/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
346.46	19.68	5.7	26
88.22	5.23	5.9	26
22.96	1.30	5.7	26

(4) 測定間再現性

測定値 (pg/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
320.19	19.32	6.0	4
78.10	7.10	9.1	4
22.09	2.32	10.5	4

(5) 特異性

測定物質	交差率
Human VEGF 165	100.0%
Human VEGF 121	39.7%
Human PDGF	< 0.1%

(6) 感度

1.01 pg/mL

本キットの感度は、NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) の評価方法に従い求めました。(National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1, (1989) Villanova, PA : NCCLS 参照)

11. 使用上または取り扱い上の注意

- 1 保存は、2~8 °Cとしてください。使用前に全ての試薬は常温に戻してください。
- 2 標準物質は凍結乾燥品です。開封には十分注意し、ゆっくりと行ってください。
- 3 停止液は強酸性(1N 硫酸)です。衣服 皮膚等への接触、および廃棄には十分注意してください。
- 4 使用後の抗体プレートや試薬は、多量の水で洗い流してから廃棄してください。
- 5 希釈用緩衝液、標識抗体濃縮液および濃縮洗浄液は、まれに析出を認める場合がありますが、性能に問題はありません。
- 6 構成試薬には動物血液成分を含む物があります。取り扱いに注意し、使用後は手洗いなどを行ってください。
- 7 ロットが異なる製品の構成試薬や他のキットの構成試薬を混ぜたり、交換したりして使用することは避けてください。
- 8 有効期限切れの試薬は使用しないでください。
- 9 本キットは研究用試薬です。診断等に用いることはできません。

12. 保存方法および有効期限

2~8°C 保存

使用期限は外箱に記載

13. 包装単位および製品番号

96 Well

製品番号 27171

14. 参考文献

1. Hirata C, Nakano K, Nakamura N, Kitagawa Y, Shigeta H, Hasegawa G, Ogata M, Ikeda T, Sawa H, Nakamura K, Ienaga K, Obayashi H, Kondo M. Advanced glycation End Products Induce Expression of Vascular Endothelial Growth Factor by Retinal Muller Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jul 30;236 (3):712-5.
2. Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Komatsu T, Nanbu K, Sakahara H and Mori T. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br J Cancer.* 1997;76 (9):1221-7.
3. Shishido T, Yasoshima T, Denno R, Mukaiya M, Sato N, Hirata K. Inhibition of liver metastasis of human pancreatic carcinoma by angiogenesis inhibitor TNP-470 in combination with cisplatin. *Jpn J Cancer Res.* 1998 Sep;89 (9):963-9.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

(本キットは、国立がんセンター研究所分子腫瘍学部との共同開発した製品です)

Version 3.

2016年9月更新 *