

## Human HB-EGF Assay Kit - IBL

96 Well

## 1. はじめに

へパリン結合性上皮細胞成長因子(HB-EGF)は、EGFファミリーに属する増殖因子で、EGFレセプターやErbB4といったErbBファミリーのチロシンキナーゼ型受容体のリガンドです。HB-EGFは、膜貫通型(proHB-EGF)、細胞表面でプロテアーゼにより切断された可溶性HB-EGF(sHB-EGF)、切断された後のC末端側断片(HB-EGF-CTF)の3つのフォームが存在し、それぞれ異なる生理活性を有しています。HB-EGFは、表皮細胞、心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージなど、種々の細胞で発現しており、血中に分泌されたHB-EGFは細胞の増殖、分化、炎症反応などに関わっており、生理機能の維持のみならず、発生や疾病において重要な役割を果たしています。近年、腫瘍の転移浸潤に、HB-EGF発現の増加が不可欠であることが報告されており、分子標的薬の創薬ターゲットとして注目を集めています。

本キットは、プロ領域を有するヒトHB-EGFの分子種を測定することができます。

## 2. 原理および測定方法

本製品は、サンドイッチ法によるELISA(Enzyme-linked Immunosorbent 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次反応をおこないます。洗浄後、HRP標識された2次抗体を加え2次反応をおこないます。反応後、過剰の2次抗体を洗浄除去した後、Tetra Methyl Benzidine (TMB)により発色させます。この発色は、ヒトHB-EGFの量に比例します。

## 3. 測定範囲

0.34~22.00nmol/L

## 4. 使用目的

ヒトの血清、EDTA-血漿、尿、CSFおよび細胞培養上清中のヒトHB-EGFを測定できます。

正常のヒト血清およびEDTA-血漿検体の希釈の目安は2倍程度です。

正常のヒト尿検体の希釈の目安は20倍程度です。

正常のヒトCSF検体の希釈の目安は4倍程度です。

## 5. 構成試薬

1 抗体プレート (抗 Human HB-EGF (45F1) Mouse IgG MoAb 固相)	96Well x 1
2 標識抗体濃縮液 (30倍濃度) HRP 標識抗 Human HB-EGF (58B7) Mouse IgG Fab'	0.4mL x 1
3 標準物質 (Recombinant Human HB-EGF)	0.5mL x 2
4 希釈用緩衝液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS)	30mL x 1
5 標識抗体用溶解液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS)	12mL x 1
6 TMB 基質液	15mL x 1
7 停止液 (1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	12mL x 1
8 濃縮洗浄液 (40倍濃度リン酸緩衝液)	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
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	洗浄ピン
冷蔵庫	採取用容器 (清潔な試験管など)

## (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 1950mL 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。

## 標識抗体濃縮液の希釈方法

標識抗体濃縮液は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)を使用する場合=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にて保存してください。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。

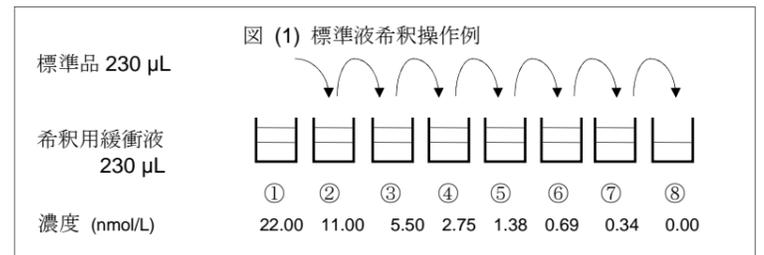
この時標準物質濃度は44.00nmol/Lとなります。

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

22.00nmol/L, 11.00nmol/L, 5.50nmol/L, 2.75nmol/L, 1.38nmol/L, 0.69nmol/L, 0.34nmol/L, 0.00nmol/Lの表示をします。

22.00nmol/Lの希釈用テストチューブに44.00nmol/Lの標準物質溶液を230μL加え混和しその溶液230μLを11.00nmol/L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22.00nmol/L~0.34nmol/Lまでの7点を希釈標準品とし、0.00nmol/L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で適宜希釈し測定してください。正常のヒト血清およびEDTA-血漿検体の希釈の目安は2倍程度です。正常のヒト尿検体の希釈の目安は20倍程度です。正常のヒトCSF検体の希釈の目安は4倍程度です。

## (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こと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作成してください。

抗体プレートで以下の操作をおこないます。

- 1 ブランクの添加 (以降図(2)参照)  
試薬ブランクのウェル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ならびに検体ブランク100μLをそれぞれのウェルに入れます。
- 3 プレートカバーをして2-8°C 1 overnight 反応
- 4 反応液を捨てた後、下記の洗浄4回  
洗浄ピンを用いて洗浄液をウェルに満たし、プレートを逆さまにして振り払い洗浄液を完全に除去します。この洗浄操作を規定回数おこない、ペーパータオル等の上でたたいて完全にウェルの水分を切ってください。操作は、洗浄むらのないよう十分注意して行ってください。
- 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2-8°C 60分間反応
- 7 反応液を捨てた後、洗浄5回  
上記4の洗浄と同様操作  
プレートウォッシャーを使用する場合も、仕上げの1回は上記の方法で手洗いすることを推奨します。
- 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なります。この時の反応は遮光してください。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なら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2-8°C 1 Overnight 反応。				
洗浄4回				
標識抗体	100μL	100μL	100μL	-
プレートカバーをして2-8°C 60分間反応。				
洗浄5回				
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、融解は低温でおこな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で希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめします。
- 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おこなってください。
- 6 洗浄後は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に水分を切ってください。

い。この時ペーパータオルがウェルの中に入らないよう注意してください。

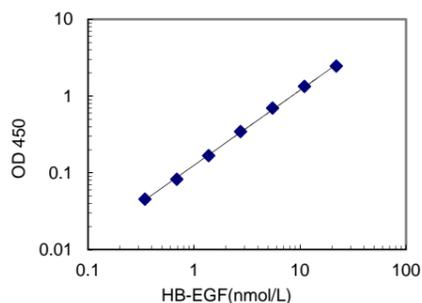
- 7 TMB 基質液は、光に対して敏感です。遮光保存してください。金属との接触も避け
- 8 吸光度測定は、停止液添加後 30 分間以内におこなってください。

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

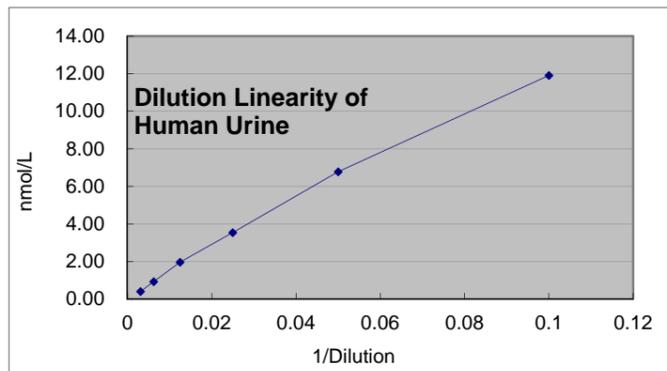
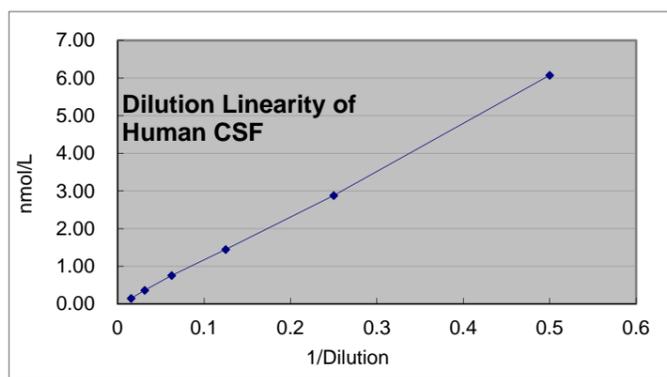
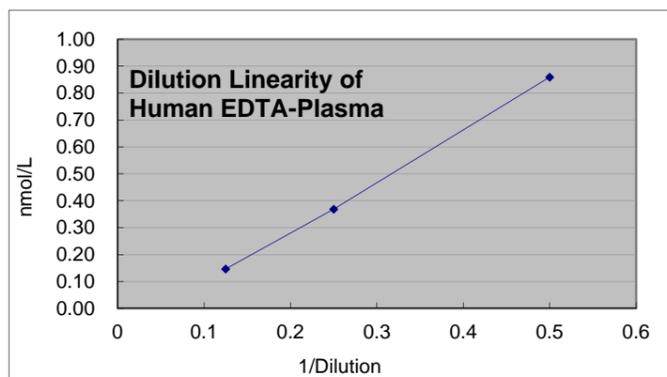
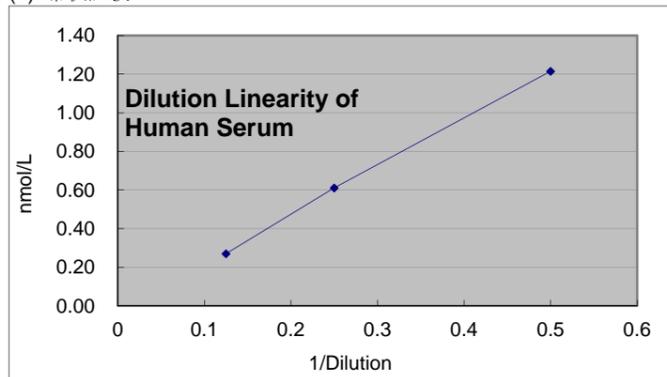
標準品濃度 (nmol/L)	吸光度 (450nm)
22.00	2.462
11.00	1.343
5.50	0.702
2.75	0.350
1.38	0.173
0.69	0.088
0.34	0.051
0.00 (検体ブランク)	0.005



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



(2) 添加回収試験

検体	理論値	測定値	%
----	-----	-----	---

	(nmol/L)	(nmol/L)	
ヒト血清 (2倍)	12.19	11.86	97.3
	3.94	4.44	112.7
	1.88	2.08	111.0
ヒト血漿(EDTA) (2倍)	3.65	3.39	93.0
	1.59	1.72	108.1
	1.07	1.11	103.6
ヒト尿 (20倍)	10.88	10.85	99.7
	6.76	7.91	117.1
	5.72	6.57	114.8
ヒトCSF (4倍)	4.71	4.53	96.1
	2.65	3.10	117.0
	2.13	2.26	106.2
培地 (10% FBS 添加) (2倍)	11.00	10.71	97.4
	2.75	2.93	106.6
	0.69	0.69	100.7

(3) 同時再現性

測定値 (nmol/L)	SD (nmol/L)	CV (%)	n
6.91	0.19	2.8	24
3.48	0.11	3.3	24
1.77	0.05	2.8	24

(4) 測定間再現性

測定値 (nmol/L)	SD (nmol/L)	CV (%)	n
7.13	0.14	2.0	6
3.72	0.11	2.9	6
1.82	0.06	3.3	6

(5) 特異性

測定物質	交差率
Human HB-EGF	100%
Human HB-EGF(63-148)	N.D.

(6) 感度

0.048nmol/L

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。開封は、十分注意しゆっくりとおこなってください。
- 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おこなってください。
- 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しないでください。
- 8 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 27189

14. 参考文献

- 1 Higashiyama S, Lau K, Besner GE, Abraham JA, Klagsbrun M. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. J Biol Chem. 1992 Mar 25;267(9):6205-12.
- 2 Nanba D, Higashiyama S. Dual intracellular signaling by proteolytic cleavage of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. Cytokine Growth Factor Rev. 2004 Feb;15(1):13-9. Review.
- 3 Ota I, Higashiyama S, Masui T, Yane K, Hosoi H, Matsuura N. Heparin-binding EGF-like growth factor enhances the activity of invasion and metastasis in thyroid cancer cells. Oncol Rep. 2013 Oct;30(4):1593-600.
- 4 Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, Kawarabayashi T, Mekada E. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy. Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, Kawarabayashi T, Mekada E. Cancer Sci. 2006 May;97(5):341-7. Review.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所