

Human VEGF-C 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っています。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。このように VEGF は、胚における血管形成や成体組織における血管新生の重要な調節因子として知られています。一方、VEGF 関連分子として見いだされた VEGF-C は、VEGF とは異なり、その特異的なリンパ内皮受容体である VEGFR-3 を介してリンパ管形成を促進する分子として同定されています。

Human VEGF-C は Proteolytic Processing により様々な分子量の VEGF-C の存在が報告されています (文献 1)。本製品は、このうち成熟型の p21 Homo Dimer VEGF-C は測定できません。

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 次反応をおこない洗浄後 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ます。Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この発色は、Human VEGF-C の量に比例します。

3. 測定範囲

93.75 ~ 6,000 pg/mL

4. 使用目的

- 組み換え体、自然体どちらの Human VEGF-C も測定可能。
- 本製品はヒト血清、EDTA 採血血漿、ヘパリン採血血漿および培養上清中の VEGF-C を定量できます。
- ヒト血清、EDTA 採血血漿、ヘパリン採血血漿はあらかじめ希釈用緩衝液で希釈することをおすすめします。希釈の目安は約 10 倍希釈です。
- 培養上清液中の VEGF-C を測定できます。希釈は培養細胞の発現量により異なりますので各施設で決定ください。
- ヒト血清を用いた測定例は、4.09~11.01 ng/mL でした。参考例としてお取り扱いください。
- ヘパリン採血血漿検体を用いた VEGF-C 測定では血清測定より低値を示す傾向があります。

5. 構成試薬

1	抗体プレート (抗 Human VEGF-C(13C1) Mouse IgG MoAb 固相)	96 Well x 1
2	標識抗体濃縮液 (30 倍濃度 HRP 標識抗 Human VEGF-C (408) Rabbit IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3	標準物質 (Recombinant Human VEGF-C)	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
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
恒温器 (37°C ± 1°C)	採取用容器 (清潔な試験管など)
冷蔵庫 (4°C として)	

(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。使用前に室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) 使用する場合=800 μL 必要 (最低量)

(標識抗体濃縮液を 30 μL とり、標識抗体用溶解液 870 μL を加え良く混和し、100 μL 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。

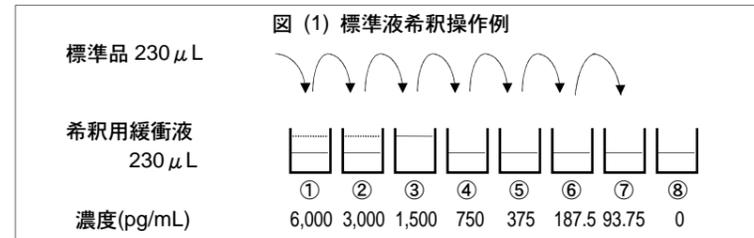
標識抗体濃縮液の残りは、蓋をしっかりと閉め冷蔵にて保存してください。有効期限内に再度使用できます。

標準物質の希釈方法

標準物質のバイアル瓶に精製水を 0.5 mL 加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は 12,000 pg/mL 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 230 μL ずつ量り取ります。各々のテストチューブに、6,000 pg/mL、3,000 pg/mL、1,500 pg/mL、750 pg/mL、375 pg/mL、187.5 pg/mL、93.75 pg/mL の表示をします。

6,000 pg/mL の希釈用テストチューブに 12,000 pg/mL の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 3,000 pg/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 6,000 pg/mL~93.75 pg/mL までの 7 点を希釈標準品と 0 pg/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測定してください。

(3) 測定操作方法

試薬は使用前に室温に戻し、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 100 μL 入れます。
- 2 検体、希釈標準品の添加
検体 100 μL 及び希釈標準品各 100 μL 並びに検体ブランク 100 μL を入れます。
- 3 プレートカバーをして 37°C 60 分反応
- 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 100 μL 添加します。
- 6 プレートカバーをして 4°C 30 分反応
- 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 100 μL 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 遮光をして室温 30 分間反応
- 10 停止液の添加
すべてのウェルに停止液を 100 μL 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及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 100 μL	希釈標準品 100 μL	希釈用緩衝液 100 μL	希釈用緩衝液 100 μL
プレートカバーをして 37°C 60 分反応				
4 回 (洗浄液 350 μL 以上)*				
標識抗体	100 μL	100 μL	100 μL	-
プレートカバーをして 4°C 30 分反応				
5 回 (洗浄液 350 μL 以上)*				
TMB 基質液	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
遮光室温 30 分間反応				
停止液	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
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にて希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、2 重測定することをおすすめいたします。

- 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おこなってください。
- 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。

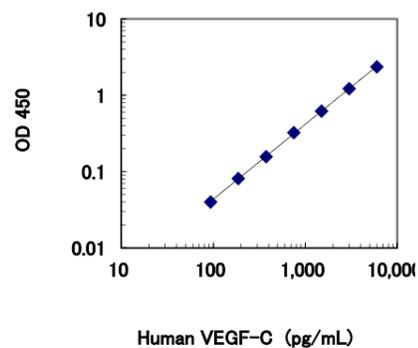
8. 測定結果の算出方法

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 (pg/mL)	吸光度 (450nm)
6,000	2.371
3,000	1.231
1,500	0.627
750	0.332
375	0.164
187.5	0.088
93.75	0.047
0 (検体ブランク)	0.007



* 上記検量線は作成例です。測定にあ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%FCS 添加 RPMI-1640)	4	1,342.62	1,500.00	89.5
	8	675.89	750.00	90.1
	16	365.35	375.00	97.4
血清(健常人)	8	1,607.90	1,661.87	96.8
	16	904.24	903.37	100.1
	32	498.55	469.93	106.1
血漿(EDTA) (健常人)	2	3,608.88	3,930.49	91.8
	4	2,091.66	2,013.88	103.9
	8	1,090.55	1,010.20	108.0

(2) 添加回収試験

検体	理論値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	%
培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640) (x8)	2,019.51	1,893.69	93.8
	1,269.51	1,207.62	95.1
	894.51	872.35	97.5
血清(健常人) (x8)	1,348.05	1,412.44	104.8
	973.05	1,002.63	103.0
	785.55	811.84	103.3
血漿(EDTA) (健常人) (x4)	3,541.09	3,465.88	97.9
	2,041.09	2,045.11	100.2
	1,291.09	1,331.54	103.1

(3) 同時再現性

測定値 (pg/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
2,098.61	80.33	3.8	24
682.75	39.01	5.7	24
324.45	21.49	6.6	24

(4) 測定間再現性

測定値 (pg/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
2,242.89	207.57	9.3	40
705.30	42.92	6.1	40
342.25	30.70	9.0	40

(5) 感度

11.72 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. 使用上又は取り扱い上の注意

- 1 保存は、2~8℃としてください。使用前に全ての試薬は室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 標識抗体濃縮液は、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℃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 27756

14. 参考文献

1. Joukov V., Sorsa T., Kumar V., Jeltsch M., Claesson-Welsh L., Cao Y., Saksela O., Kalkkinen N., and Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J.* **16** (13): 3898-3911, 1997

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version 3.

2016年11月更新*