

## Human VEGFR-3/Flt-4 Assay Kit - IBL

96 Well

## 1. はじめに

VEGFファミリー (VEGF-A, -B, -C, -D, -E)のすべてのメンバーは、細胞表面のチロシンキナーゼ受容体(VEGFR)に結合して、これらを二量体化し、またトランスリン酸化により活性化することで、細胞応答を刺激します。VEGF受容体は、7つの免疫グロブリン様ドメインからなる細胞外部分、一箇所の膜貫通領域、およびチロシンキナーゼドメイン部分を持つ細胞内部分から成ります。

Flt-4 (Fms-like tyrosine kinase 4)としても知られるVEGFR-3は、VEGFの3番目の受容体として発見されました。VEGFR-3/Flt-4はVEGF-CとVEGF-Dに対応して、リンパ管形成を調節していることが知られています。

本製品は、ヒトの血清、EDTA血漿および細胞培養上清中に存在するVEGFR-3/Flt-4を測定するキットです。

## 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 VEGFR-3/Flt-4の量に比例します。

## 3. 測定範囲

0.03 ~ 2 ng/mL

## 4. 使用目的

- ヒトの血清、EDTA 血漿および細胞培養上清中の VEGFR-3/Flt-4 を測定できます。
- 健康人の血清、血漿の希釈の目安は 100 倍以上です。

## 5. 構成試薬

1 抗体プレート (抗 Human Flt-4 (17A1) 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 Flt-4 (32A1) Mouse IgG MoAb Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (Recombinant Human Flt-4)	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
冷蔵庫 (4°C として)	採取用容器 (清潔な試験管など)
恒温器 (37°C±1°C)	

## (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=800μL 必要(最低量)  
(標識抗体濃縮液を 30μL とし、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 0.5 mL 加えて完全に溶解します。

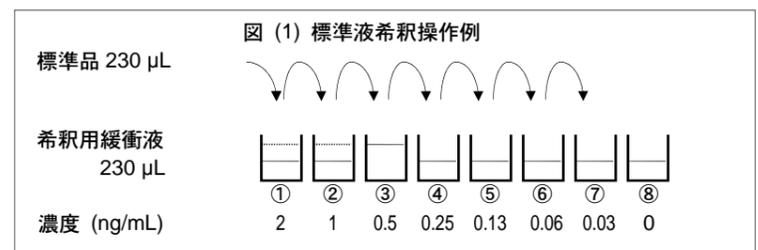
この時標準物質濃度は 4 ng/mL となります。

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

2 ng/mL, 1 ng/mL, 0.5 ng/mL, 0.25 ng/mL, 0.13 ng/mL, 0.06 ng/mL, 0.03 ng/mL, 0 ng/mL の表示をします。

2 ng/mL の希釈用テストチューブに 4 ng/mL の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 1 ng/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 2 ng/mL~0.03 ng/mL までの 7点を希釈標準品とし、0 ng/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で適宜希釈して測定してください。

## (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 および希釈標準品各 100 μL ならびに検体ブランク 100 μL を入れます。
- 3 プレートカバーをして 37°C 60 分間反応
- 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 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 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 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 分間反応				
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 分間反応				
5 回 (洗浄液 350 μL 以上)*				
TMB 基質液	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
遮光常温 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 450 nm 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、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。

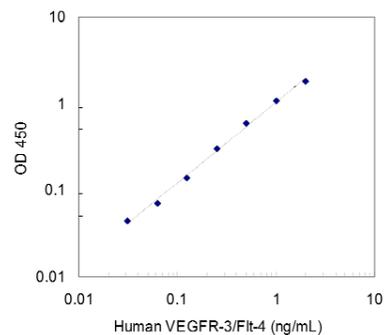
## 8. 測定結果の算出方法

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 (ng/mL)	吸光度 (450nm)
2	2.485
1	1.425
0.5	0.776
0.25	0.422
0.13	0.226
0.06	0.121
0.03	0.072
0 (検体ブランク)	0.015



\* 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 (ng/mL)	理論値 (ng/mL)	%
培地 (10 % FCS 添加 TIL Media I)	2	0.87	1	87.0
	4	0.43	0.5	86.0
	8	0.22	0.25	88.0
	16	0.10	0.13	76.9
血清 (健常人)	100	1.51	1.43	105.6
	200	0.69	0.68	101.5
	400	0.33	0.32	103.1
血漿 (健常人) (EDTA)	100	1.43	1.32	108.3
	200	0.70	0.65	107.7
	400	0.31	0.30	103.3

(TIL Media I: IBL 製品番号 33640)

(2) 添加回収試験

検体	理論値 (ng/mL)	測定値 (ng/mL)	%
培地 (10 % FCS 添加 TIL Media I) (x2)	2	1.93	96.5
	1	0.98	98.0
	0.5	0.49	98.0
	0.25	0.25	100.0
血清 (健常人) (x50)	1.89	1.66	87.8
	1.77	1.51	85.3
	1.71	1.42	83.0
血漿 (健常人) (EDTA) (x50)	1.86	1.59	85.5
	1.73	1.42	82.1
	1.67	1.37	82.0

(TIL Media I: IBL 製品番号 33640)

(3) 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
1.18	0.07	5.9	21
0.42	0.02	4.8	20
0.12	0.01	8.3	21

(4) 測定間再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
1.16	0.06	5.2	6
0.42	0.01	2.4	6
0.13	0.01	7.7	6

(5) 特異性

測定物質	交差率
Human VEGFR-3/Flt-4	100 %
Human c-Kit	≦ 0.1 %
Human KDR	≦ 0.1 %
Human Tie-2	≦ 0.1 %
Human PDGFRα	≦ 0.1 %
Human PDGFRβ	≦ 0.1 %

(6) 感度

0.004 ng/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場合があります。取り扱いに注意し使用後は手洗いな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 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 27779

## 14. 参考文献

1. Rini BI, Michaelson MD, Rosenberg JE, Bukowski RM, Sosman JA, Stadler WM, Hutson TE, Margolin K, Harmon CS, DePrimo SE, Kim ST, Chen I, George DJ. Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab-refractory metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2008 Aug 1;26(22):3743-8.
2. Mouawad R, Spano JP, Comperat E, Capron F, Khayat D. Tumoural expression and circulating level of VEGFR-3 (Flt-4) in metastatic melanoma patients: correlation with clinical parameters and outcome. Eur J Cancer. 2009 May;45(8):1407-14.

## 15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version 2.

2016年11月更新\*