

研究用試薬

\*\*2007年3月改訂

\*2005年12月改訂

EIA 法によるラット HGF 測定用キット

# ラット HGF EIA

96 テスト用

## 添付文書

本試薬は、添付文書をよく読んでから使用してください。

本試薬は研究用試薬であり、診断には使用できません。

 株式会社 特殊免疫研究所

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) は肝再生因子の本体と考えられる増殖因子ですが、肝細胞以外にも様々な上皮系細胞、内皮細胞、一部の間葉系組織の増殖を促進します。また、癌の進行と相関するとの報告もあります。更に細胞運動性亢進作用、形態形成誘導作用、血管新生作用、免疫応答調節作用等を有することが明らかになっており、これらの作用を解明するためにマウスやラットを用いた研究が行われています。\*\*

本製品はラット HGF を測定する研究用試薬です。キットに添付のラット HGF の標準品を基準に定量的にラット HGF 濃度を求めることができます。

本測定系はヒト HGF とも交差反応しますが、交差反応率は約 4% です。

### 【キットの構成】

1. 抗ラット HGF モノクローナル抗体固相プレート(8 ウェル×12)  
(抗ラット HGF マウスモノクローナル抗体) 1 枚
2. ラット HGF 標準液(HGF 標準液) 6 本  
(0, 0.4, 1.0, 3.0, 10, 25 ng/mL: 各 0.5 mL)
3. 検体希釈液 L; 低塩濃度 15 mL×1 本
4. 検体希釈液 H; 高塩濃度 15 mL×1 本
5. 抗ラット HGF ウサギ抗体 10 mL×1 本  
(抗ラット HGF ウサギポリクローナル抗体)
6. 酵素標識抗体 10 mL×1 本  
(ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ免疫グロブリンヤギ抗体)
7. 酵素基質 30 mL×1 本  
(過ほう酸ナトリウム・四水和物)
8. 発色剤 4 錠  
(o-フェニレンジアミン・二塩酸塩)
9. 医薬用外劇物 反応停止液 5 mL×1 本  
(19.6% 硫酸)
10. 洗浄原液(20 倍濃縮液) 25 mL×3 本
11. プレートシール(付属品) 3 枚

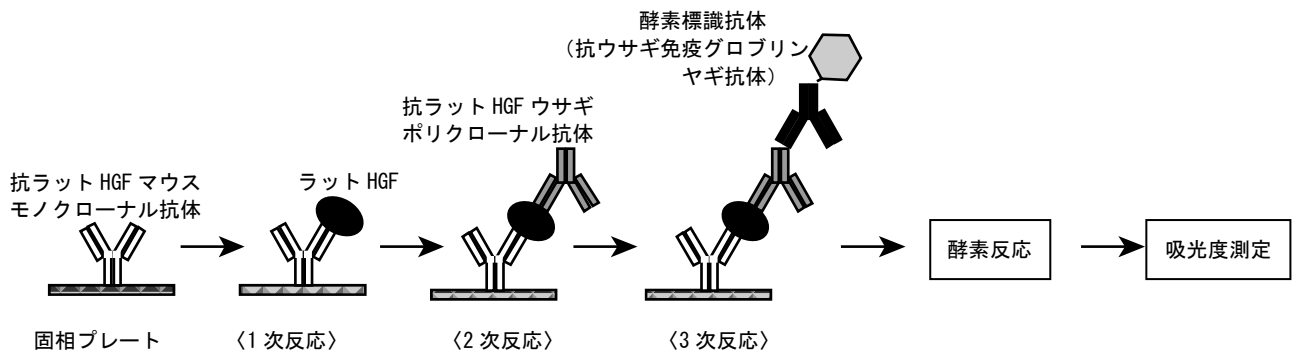
## 【使用目的】

ラット肝細胞増殖因子(ラット HGF)の測定

## 【測定原理】

酵素免疫測定法(EIA)を応用した本測定系は、遺伝子組換えにより産生されたヒト HGF を免疫原として得られた抗体のうち、ラット HGF と強く交差反応するモノクローナル抗体(以下抗ラット HGF マウスモノクローナル抗体と呼びます)と、抗ラット HGF ウサギポリクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ法を応用した3段階の抗原抗体反応と酵素呈色反応とからなります。第1次抗原抗体反応は、プレートに固相された抗ラット HGF マウスモノクローナル抗体と被検検体中のラット HGF との間で起こります。第2次抗原抗体反応は、固相抗体に結合したラット HGF と抗ラット HGF ウサギポリクローナル抗体との間で起こります。さらに第3次抗原抗体反応が酵素標識抗体(ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ免疫グロブリンヤギ抗体)と抗ラット HGF ウサギポリクローナル抗体の間で起こります。その後、酵素反応により、検体中のラット HGF 量に応じて呈色物質が生成され、一定時間で反応を停止させて吸光度を測定します。

ラット HGF 標準液を用いて検量線を作成し、検体のラット HGF 値を求めます。



## 【操作法】

### 1. 必要な器具・機材

- (1) マイクロピペット 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L
- (2) メスピペット 10 mL
- (3) メスシリンダー 1 L
- (4) アスピレーター及びポリ洗浄瓶又はマイクロプレートウォッシャー
- (5) 暗箱(暗い戸棚又は引き出しでも可)
- (6) マイクロプレートリーダー(主波長 492 nm 又は 490 nm、副波長 620 nm 以上)

## 2. 試薬の調製法

### (1) 酵素基質液(発色剤含有)

酵素基質 3 mL に発色剤 1 錠を加えて暗所に静置し、発泡が無くなってからよく混合します。使用するウェルの数に応じて必要量を調製してください。

この調製は使用の約 15 分前に行い、60 分以内に使用してください。

### \* (2) 洗浄液

洗浄原液を精製水で 20 倍希釈します。未使用の洗浄液は 2~10°C に保存してください。

## 3. 測定操作法

被検検体の溶液塩濃度により、下記に示す方法で測定します。

**臓器抽出検体・部分精製検体等の高塩濃度検体:A 法**

**血漿・培養液等の低塩濃度検体:B 法**

- 被検検体はガラス製の容器は避けて、ポリプロピレン製、ポリエチレン製などの樹脂製容器に保存してください。
- 臓器中の HGF の抽出方法については付録1を、さらに精製する場合は付録2を参照してください。
- 検量線の範囲を越える可能性のある検体は、検体希釈液を用いて検体をあらかじめ適当な濃度に希釈してから測定してください。
- ラット HGF は血小板に高濃度に存在します。採血時または、採血した血液を血漿分離する際に、血小板が壊れやすく、血小板由来の HGF が混入する可能性が高くなります。血漿採取までの操作は慎重に行い、血小板の損傷を最小限にする注意が必要です。

(注意)

- \* ○ プレートは着脱式で 12 分割が可能ですから、必要数を使用し未使用のものは乾燥剤とともにアルミ袋に密封し、2~10°C で保存してください。
- \* ○ 測定に使用した試薬は、使用后 2~10°C で保存してください。  
検体は-20°C で凍結保存してください。
- キットの各試薬は使用前に必ず 15~30°C に戻してください。
- 図1,2に示したように、測定毎にラット HGF 標準液用ウェル (2 ウェル×5 濃度=10 ウェル) を設けて測定してください。

(1) 検体の添加

1) 高塩濃度検体の場合(A 法)

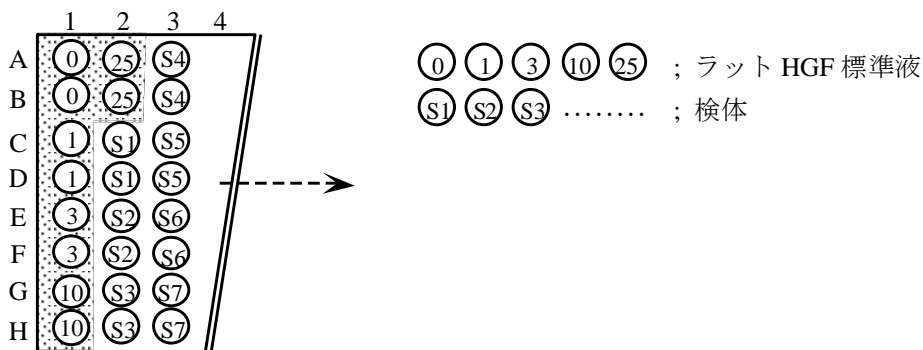
希釈が必要な場合は、検体希釈液 H で適宜希釈して測定用検体とします。

① 検体の添加

測定は通常 2 連で行います。

プレートのラット HGF 標準液用ウェルに検体希釈液 H を 50  $\mu$ L ずつ入れて、更に各標準液 (0, 1.0, 3.0, 10, 25 ng/mL) を 50  $\mu$ L ずつ加えます。検体用ウェルには同じく検体希釈液 L を 50  $\mu$ L ずつ入れ、更に検体 (抽出検体液、体液の部分精製品など) を 50  $\mu$ L ずつ加えます。

図 1 A 法



2) 低塩濃度検体の場合(B 法)

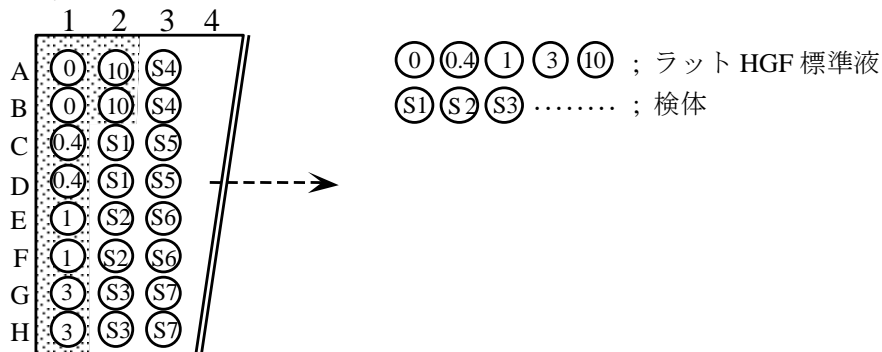
希釈が必要な場合は、検体希釈液 L で適宜希釈して測定用検体とします。

① 検体の添加

測定は通常 2 連で行います。

プレートの使用するウェルに検体希釈液 L を 50  $\mu$ L ずつ入れます。ラット HGF 標準液用ウェルに各標準液 (0, 0.4, 1.0, 3.0, 10 ng/mL) を 50  $\mu$ L ずつ加え、検体用ウェルには同じく検体を 50  $\mu$ L ずつ加えます。

図 2 B 法



(2) 1次反応

プレート上面に添付のプレートシールを貼り、マイクロプレートを 15～30℃で 20 時間 (16～24 時間) 静置します。

(3) 洗浄

プレートシールをはがし、ウェル内容物をアスピレーターで吸引除去します。ポリ洗浄瓶を用いてプレートの各ウェルを「2. 試薬の調製法 (2)」で調製した洗浄液で満たし、プレートを逆さにして洗浄液を振り流します。この洗浄操作を 5 回繰り返します。最後に清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして軽く叩き、ウェルから十分に洗浄液を除きます。

〈注意〉

洗浄操作中、プレートのウェル内面が乾燥しないように注意し、洗浄終了後、迅速に次の操作を行ってください。

(4) 抗ラット HGF ウサギ抗体の添加

全ウェルに抗ラット HGF ウサギ抗体を 100  $\mu$ L ずつ入れます。

(5) 2次反応

プレートシールを貼り、15～30℃で 2 時間静置します。

(6) 洗浄

(3)と同じ手順でプレートを洗浄します。

(7) 酵素標識抗体の添加

全ウェルに酵素標識抗体を 100  $\mu$ L ずつ入れます。

(8) 3次反応

プレートシールを貼り、15～30℃で 2 時間静置します。

(9) 酵素基質液(発色剤含有)の調製

3 次反応終了の約 15 分前に、「2. 試薬の調製法 (1)」の手順に従って酵素基質液 (発色剤含有)を調製します。

(10) 洗浄

(3)と同じ手順でプレートを洗浄します。

(11) 酵素基質液(発色剤含有)の添加

(9)で調製した酵素基質液(発色剤含有)を全ウェルに 100  $\mu$ L ずつ入れます。

(12) 酵素反応

プレートを暗所に入れて、15～30℃で 30 分間静置します。

(13) 反応停止液の添加

全ウェルに反応停止液 50  $\mu$ L を加えてよく混合します。

(14) 吸光度の測定

マイクロプレートリーダー(主波長 492 nm 又は 490 nm、副波長 620 nm 以上)で各ウェルの吸光度を測定します。反応停止後、2 時間以内に測定してください。

**【測定結果の判定法】**

1. ラット HGF 標準液による検量線の作成

- (1) ラット HGF 標準液各濃度の吸光度ーラット HGF 標準液 0 ng/mL の吸光度(平均値)] (Net OD)を算出します。
- (2) 各濃度に対する Net OD の値を両対数グラフにプロットします。図3の様な直線が得られます。

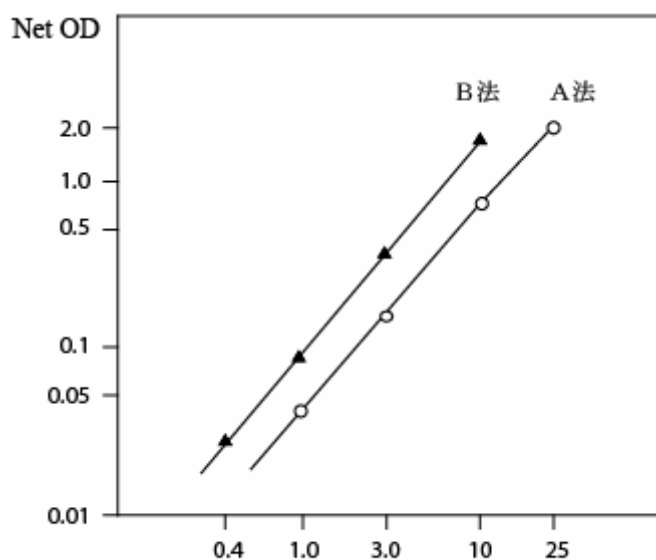


図3 ラットHGF ( ng/mL )

2. 検体のラット HGF 値の求め方

- (1) 検体の吸光度がスケールオーバーした場合は、希釈して再測定を行ってください。
- (2) [検体の吸光度ーラット HGF 標準液 0 ng/mL の吸光度(平均値)] (Net OD)の値を算出します。
- (3) (2)の検体の Net OD の値を検量線にあてはめ、ラット HGF 値を読みとります。

ウェルの割付と手順 -A 法- (高塩濃度検体)

| 手順 |                        | 試薬                                    | 標準液用ウェル<br>(1A~1H, 2A~2B) | 検体用ウェル<br>(2C~12H) |
|----|------------------------|---------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| 1  | ラット HGF 標準液<br>又は検体の添加 | ラット HGF 標準液                           | 50 $\mu$ L                | —                  |
|    |                        | 検体*                                   | —                         | 50 $\mu$ L         |
|    |                        | 検体希釈液 L                               | —                         | 50 $\mu$ L         |
|    |                        | 検体希釈液 H                               | 50 $\mu$ L                | —                  |
| 2  | 1 次反応                  | 15~30°C 20 時間 静置                      |                           |                    |
| 3  | 洗浄                     | 5 回繰り返す                               |                           |                    |
| 4  | 抗ラット HGF ウサギ<br>抗体の添加  | 抗ラット HGF ウサギ抗体                        | 100 $\mu$ L               | 100 $\mu$ L        |
| 5  | 2 次反応                  | 15~30°C 2 時間 静置                       |                           |                    |
| 6  | 洗浄                     | 5 回繰り返す                               |                           |                    |
| 7  | 酵素標識抗体の添加              | 酵素標識抗体                                | 100 $\mu$ L               | 100 $\mu$ L        |
| 8  | 3 次反応                  | 15~30°C 2 時間 静置                       |                           |                    |
| 9  | 洗浄                     | 5 回繰り返す                               |                           |                    |
| 10 | 酵素基質液の添加               | 酵素基質液(発色剤含有)                          | 100 $\mu$ L               | 100 $\mu$ L        |
| 11 | 酵素反応                   | 15~30°C 30 分間 暗所 静置                   |                           |                    |
| 12 | 反応停止液の添加               | 反応停止液                                 | 50 $\mu$ L                | 50 $\mu$ L         |
| 13 | 測定                     | 吸光度主波長 492 nm 又は 490 nm、副波長 620 nm 以上 |                           |                    |
| 14 | 結果の判定                  |                                       |                           |                    |

※) 又は検体希釈液 H で希釈したもの



ウェルの割付と手順 -B 法- (低塩濃度検体)

| 手順 |                        | 試薬                                    | 標準液用ウェル<br>(1A~1H, 2A~2B) | 検体用ウェル<br>(2C~12H) |
|----|------------------------|---------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| 1  | ラット HGF 標準液<br>又は検体の添加 | ラット HGF 標準液                           | 50 $\mu$ L                | —                  |
|    |                        | 検体*                                   | —                         | 50 $\mu$ L         |
|    |                        | 検体希釈液 L                               | 50 $\mu$ L                | 50 $\mu$ L         |
| 2  | 1 次反応                  | 15~30°C 20 時間 静置                      |                           |                    |
| 3  | 洗浄                     | 5 回繰り返す                               |                           |                    |
| 4  | 抗ラット HGF ウサギ<br>抗体の添加  | 抗ラット HGF ウサギ抗体                        | 100 $\mu$ L               | 100 $\mu$ L        |
| 5  | 2 次反応                  | 15~30°C 2 時間 静置                       |                           |                    |
| 6  | 洗浄                     | 5 回繰り返す                               |                           |                    |
| 7  | 酵素標識抗体の添加              | 酵素標識抗体                                | 100 $\mu$ L               | 100 $\mu$ L        |
| 8  | 3 次反応                  | 15~30°C 2 時間 静置                       |                           |                    |
| 9  | 洗浄                     | 5 回繰り返す                               |                           |                    |
| 10 | 酵素基質液の添加               | 酵素基質液(発色剤含有)                          | 100 $\mu$ L               | 100 $\mu$ L        |
| 11 | 酵素反応                   | 15~30°C 30 分間 暗所 静置                   |                           |                    |
| 12 | 反応停止液の添加               | 反応停止液                                 | 50 $\mu$ L                | 50 $\mu$ L         |
| 13 | 測定                     | 吸光度主波長 492 nm 又は 490 nm、副波長 620 nm 以上 |                           |                    |
| 14 | 結果の判定                  |                                       |                           |                    |

※) 又は検体希釈液 L で希釈したもの

## 【使用上又は取扱い上の注意事項】

### 1. 一般的注意

- (1) キットの試薬は使用前に必ず 15～30℃に戻してください。
- (2) 製造番号の異なるキットの試薬を組み合わせず使用しないでください。(ただし、ラット HGF 標準液の製造番号はその他の試薬の製造番号とは異なっています。)
- (3) 操作は手順通り正確に行ってください。
- (4) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- (5) 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。
- (6) 検査に用いる器具は、よく洗浄し、精製水でよく濯いだものを使用してください。
- (7) 検体ごと及び試薬ごとにマイクロピペットのチップを替えてください。

### 2. 操作上の注意

- (1) ラット HGF 標準液用ウェルは、測定ごとに設けてください。
- (2) 操作開始後は定められた時間で速やかに全操作を行い、各検体の反応時間が一定になるように留意してください。
- (3) 各操作は 15～30℃の範囲の温度で行ってください。
- (4) 酵素基質液(発色剤含有)の調製は使用約 15 分前に行い、60 分以内に使用してください。
- (5) 酵素反応の停止後、2 時間以内に吸光度を測定してください。
- (6) 操作中、プレートを強くこすったり、底面に触れたりしないでください。又、ウェル内面が乾燥しないように注意してください。

### 3. 取扱い上の注意

- \*\* (1) 酵素基質、発色剤及び反応停止液は皮膚や粘膜に接触させないでください(毒性、刺激性で火傷のおそれがあります。)。反応停止液は強酸性なので、取り扱い、廃棄には十分注意してください。
- (2) 検体希釈液には 0.1%アジ化ナトリウムが含有されていますので、廃棄の際には水道水を流してください。

## 【貯法及び有効期間】

凍結を避け、2～10℃で遮光保存。

製造後 1 年間有効(包装に表示の使用期限内に使用してください。)

**【包装単位】**

1 キット :96 テスト

CODE :1Z81

**【参考文献】**

- 1) 中山伸朗、柏崎晴彦、小林奈留美、他:LEC ラット劇症肝炎の予後診断. 肝臓 **35**: 363-369, 1994.
- 2) YAMADA A, Matsumoto K, Iwanari H, et al:Rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of HGF in rat and human tissues. Biomedical Research **16** (2):105-114, 1995.

**【問い合わせ先】**

株式会社 特殊免疫研究所 営業部  
〒112-0004  
東京都文京区後楽 1 丁目 1 番 10 号  
日本生命水道橋ビル  
TEL 03-3814-4081 FAX 03-3814-5957