

[LBIS Human VEGF ELISA Kit]

Cat # 631-40831

Please, read this instruction carefully before use.

This kit is manufactured by FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation. Use only the current version of the Instruction Manual enclosed with the kit!

Intended use

The vascular endothelial growth factor (VEGF) family is a cytokine that plays an essential role in angiogenesis and is encoded by different genes in seven members: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PLGF -1 and PLGF-2. VEGF-A is the most potent angiogenic mediator, with subtypes of 121, 165, and 189 amino acid residues generated by alternative splicing. VEGF-A165 is the most abundantly expressed subtype and is known to enhance tumor vascularization by a paracrine mechanism. Further, it is strongly associated with poor prognosis in many types of cancers and has also been reported to correlate with diseases such as rheumatoid arthritis, atherosclerosis, retinopathy, and POEMS syndrome.

This kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of human VEGF (VEGF-A165). It can measure VEGF in human serum (plasma) specifically and with high sensitivity. This product is intended for research use only. Not for use in diagnostics procedures.

Assay principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS Human VEGF ELISA Kit, standards or samples are incubated in polyclonal antibody- coated wells to capture VEGF. After 2 hours' incubation and washing, biotinylated anti-VEGF antibody is added and incubated further for 2 hours' to bind with captured VEGF. After washing, HRP (horse radish peroxidase)-conjugated streptavidin is added, and incubated for 30 minutes. After washing, bound HRP-conjugated streptavidin is reacted with a chromogen (TMB) for 20 minutes, and reaction is stopped by addition of acidic solution, and absorbance of yellow product is measured spectrophotometrically at 450 nm. The absorbance is nearly proportional to VEGF concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard VEGF concentrations. VEGF concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

Reagents supplied

Components	State	Amount
(A) Anti-VEGF antibody coated plate	Use after washing.	96 wells/1 plate
(B) Standard human VEGF	Freeze-dried. Use after reconstitution.	1 vial
(C) Buffer solution	Ready for use.	60 mL/1 bottle
(D) Biotinylated anti-VEGF antibody	Freeze-dried. Use after reconstitution.	1 vial
(E) HRP-conjugated streptavidin	Concentrated. Use after dilution.	100 µL/1 vial
(F) Chromogen (TMB)	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(H) Stop solution Be careful!	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(I) Wash stock solution (10×)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
Plate seal	—	4 sheets
Instruction Manual	—	1 copy

Storage and expiration

When the complete kit is stored at 2 °C - 8 °C (Do not freeze), the kit is stable until the expiration date shown on the label on the container. Opened reagents should be used as soon as possible to avoid less than optimal assay performance caused by storage environment.

Equipments or supplies required but not supplied Use as a check box

Deionized water (or Distilled water) Test tubes for preparation of standard solution series. Glassware for dilution of Wash stock solution (10×) (a graduated cylinder, a bottle) Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 50 µL precisely, and another for 100 µL- 1000 µL. Syringe-type repeating dispenser

LBIS Human VEGF ELISA Kit

like Eppendorf multipipette plus which can dispense 100 μL . □Paper towel to remove washing buffer remaining in wells. □A vortex-type mixer. □A shaker for 96 well-plate (600 rpm -1200 rpm) □An automatic washer for 96 well-plate (if available), or a wash bottle with a jet nozzle. □A 96 well-plate reader (450 nm \pm 10 nm, 620 nm: 600 nm - 650 nm) □Software for data analysis.

Preparation of reagents

- ◆Bring all reagents of the kit to room temperature (20 °C - 25 °C) before use.
- ◆Prepare reagent solutions in appropriate volume for your assay. Do not store the diluted reagents.

[Concentrated reagents]

[(B) Standard human VEGF (Freeze-dried)]

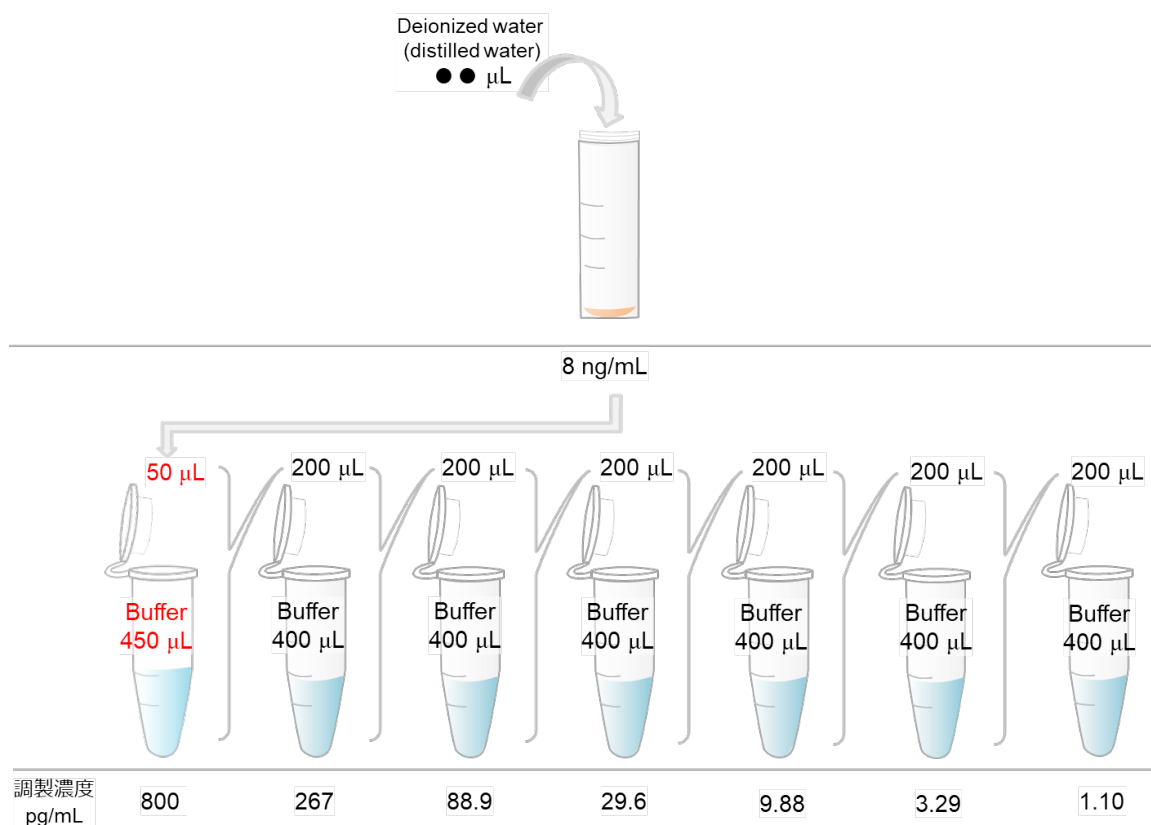
Reconstitute the (B) standard with volume* of deionized water (or distilled water) described in a separate sheet to prepare the Original standard solution (8 ng/mL) . And then prepare dilution series of standard solutions as shown below using the (C) Buffer solution brought to the room temperature.

*Because the volume of deionized water (or distilled water) to be added to the freeze-dried standard differs depending on the lot, see the specified volume in a separate sheet.

Below is an example of preparing each standard solution.

Volume of standard solution	(C) Buffer solution	Concentration
Original standard solution 50 μL	450 μL	800 pg/mL
800 pg/mL solution 200 μL	400 μL	267 pg/mL
267 pg/mL solution 200 μL	400 μL	88.9 pg/mL
88.9 pg/mL solution 200 μL	400 μL	29.6 pg/mL
29.6 pg/mL solution 200 μL	400 μL	9.88 pg/mL
9.88 pg/mL solution 200 μL	400 μL	3.29 pg/mL
3.29 pg/mL solution 200 μL	400 μL	1.10 pg/mL
Blank	400 μL	0

} Standard Curve



[(D) Biotinylated anti-VEGF antibody]

Add 100 μL of deionized water (or distilled water) of room temperature to (D) Biotinylated anti-VEGF antibody

LBIS Human VEGF ELISA Kit

(Freeze-dried) (Original (D) solution). Prepare working solution by dilution of original (D) solution with the (C) Buffer solution to **1:100**. 10 mL of the diluted solution is enough for 96 wells.

[(E) HRP-conjugated streptavidin]

Prepare working solution by dilution of (E) with the (C) Buffer solution to **1:100**. 10 mL of the diluted solution is enough for 96 wells.

[(I) Wash stock solution (10×)]

Dilute 1 volume of the concentrated (I) Wash stock solution (10×) to **10 volume** with deionized water (or distilled water) to prepare working solution. Example: 100 mL of concentrated (I) Washing buffer (10×) and 900 mL of deionized water (or distilled water).

【Storage and stability】

[(A) Anti-VEGF antibody coated plate]

If seal is not removed, put the strip back in a plastic bag with zip lock originally used for well-plate container and store at 2 °C - 8 °C. The strip will be stable until expiration date.

[(B) Standard human VEGF (Freeze-dried)]

The reconstituted standard solution (original standard solution) should be used within 2 weeks if stored in a refrigerator. Dispose the remaining diluted standard solutions after use.

[(C) Buffer solution] & [(F) Chromogen (TMB)]

Use only volume you need for your assay. Remaining reagents should be stored at 2 °C - 8 °C closing the cap tightly. It maintains stability until expiration date. Once opened, we recommend using as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(D) Biotinylated anti-VEGF antibody]

The reconstituted (D) solution should be used within 2 weeks if stored in a refrigerator. Dispose the remaining diluted working solution.

[(E) HRP-conjugated streptavidin]

Remaining working solution (already diluted) should be disposed. The rest of the undiluted solution (unused) : close the cap tightly and store at 2 °C - 8 °C. It is stable until expiration date. Once opened, we recommend using as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(H) Stop solution]

Close the cap tightly and store at 2 °C - 8 °C. It maintains stability until expiration date.

[(I) Wash stock solution (10×)]

The rest of undiluted solution (unused) : close the cap tightly and store at 2 °C -8 °C, it is stable until expiration date. Dispose any remaining diluted buffer.

Preparation of samples

- This kit is intended to measure VEGF in human serum or plasma.
- We recommend to use EDTA-2Na, EDTA-2K or heparin as anticoagulant.
- Samples should be immediately assayed or stored below -35 °C until assay. Before starting assay, shake thawed samples sufficiently. Do not repeat freeze-and-thaw cycles.
- Centrifuge the sample to remove turbidity or insoluble matters where necessary before use for the assay
- If presence of interfering substance is suspected, examine by dilution test at more than 2 points.
- Dilution of a sample should be made in a PP or PE test tube using buffer solution prior to adding them to wells

Assay procedure

Remove the cover sheet of the antibody-coated plate after bringing up to room temperature.

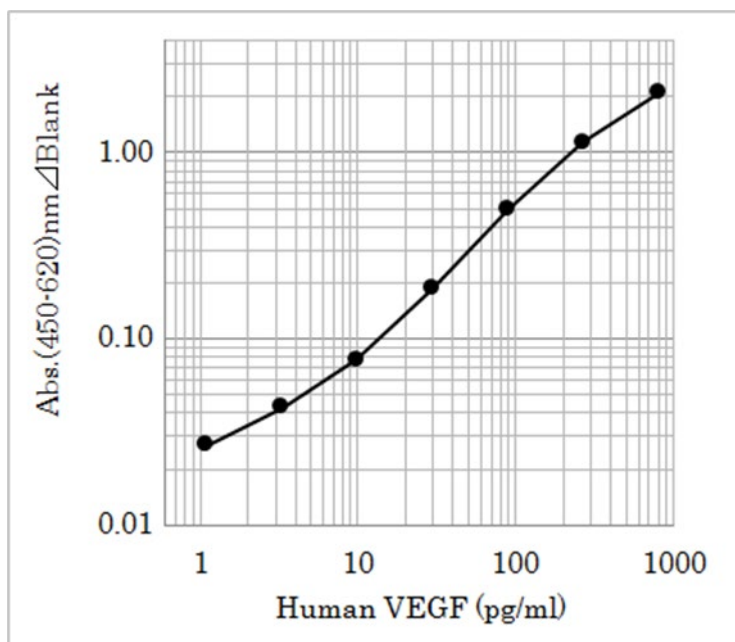
- (1) Wash the anti-VEGF antibody coated plate (A) by filling the wells with washing buffer and discard 4 times (*①), then strike the plate upside-down onto folded several sheets of paper towel to remove residual buffer in the wells. (*⑤)
- (2) Pipette 100 µL of standard solution to the wells designated for standards.
- (3) Pipette 100 µL of each sample to the wells designated for samples.
- (4) Shake the plate gently on a plate shaker (*②).
- (5) Stick a plate seal (*③) on the plate and incubate for 2 hours at 20 °C - 25 °C.
- (6) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (7) Pipette 100 µL of biotinylated anti-VEGF antibody to all wells, and shake as step (4).
- (8) Stick a plate seal (*③) on the plate and incubate the plate for 2 hour at 20 °C - 25 °C.
- (9) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (10) Pipette 100 µL of HRP-conjugated streptavidin to all wells, and shake as step (4).

LBIS Human VEGF ELISA Kit

- (11) Stick a plate seal (*③) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at 20 °C - 25 °C.
 - (12) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
 - (13) Pipette 100 µL of Chromogen (TMB) to wells, and shake as step (4).
 - (14) Stick a plate seal (*③) on the plate and incubate the plate for 20 minutes at 20 °C - 25 °C.
 - (15) Add 100 µL of the stop solution to all wells and shake as step (4).
 - (16) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm (*④)) immediately using a plate reader.
- *Refer to the page 7-8 for notes of *①, *②, *③, *④, and *⑤.

Calculations

- (1) Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating 3rd order regression curve, or 4 or 5 parameters. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the human VEGF concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data.
- (2) Using the standard curve, read the VEGF concentration of samples at its absorbance, and multiply the assay value by dilution factor if the sample has been diluted.



Calibration

The measured value obtained by this kit can be converted to the unit concentration based on NIBSC/WHO standard VEGF165 (Code: 02/286) by multiplying by the conversion factor specified in a separate sheet according to the following calculation formula.

NIBSC/WHO (02/286) unit concentration (U/mL) = conversion factor (*1) × measured VEGF value (pg/mL) (*2)

(*1) The exchange rate is different depending on the lot. Please see the specified conversion factor in the annex document.

(*2) Use the assay value that multiplied by dilution rate.

● Precision of assay (Within assay variation)

2 serum samples, 5 replicates assay

n / ID	Sample1 (pg/mL)	Sample2 (pg/mL)
1	29.7	37.8
2	28.3	36.5
3	27.7	35.0
4	29.3	35.4
5	28.8	35.4

● Reproducibility (Between assay variation)

3 serum samples, 4 days, 3 replicates assay

Day /ID	Sample1 (pg/mL)	Sample2 (pg/mL)	Sample3 (pg/mL)
0	279	86.1	11.9
1	271	84.5	12.5
2	268	88.5	11.2
3	269	88.1	11.5
mean	272	86.8	11.8

LBIS Human VEGF ELISA Kit

mean	28.8	36.0
SD	0.79	1.1
CV(%)	2.8	3.2

Mean CV was within 15 %.

SD	5.0	1.9	0.56
CV(%)	1.8	2.1	4.8

Mean CV was within 15 %.

- Recovery test (Standard human VEGF was added in 3 concentrations to serum or plasma sample and assayed.) The recoveries were 94.3 % – 106 %

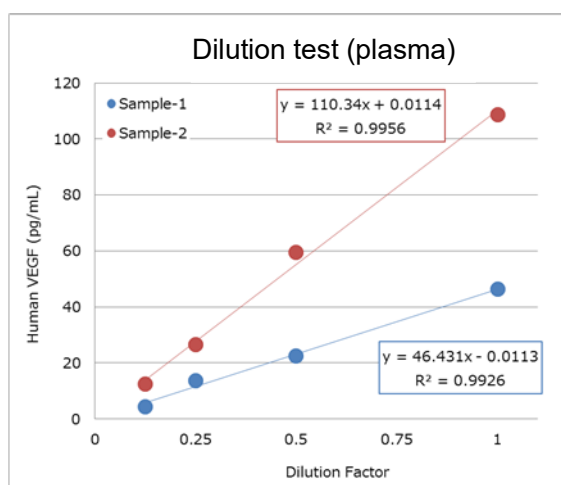
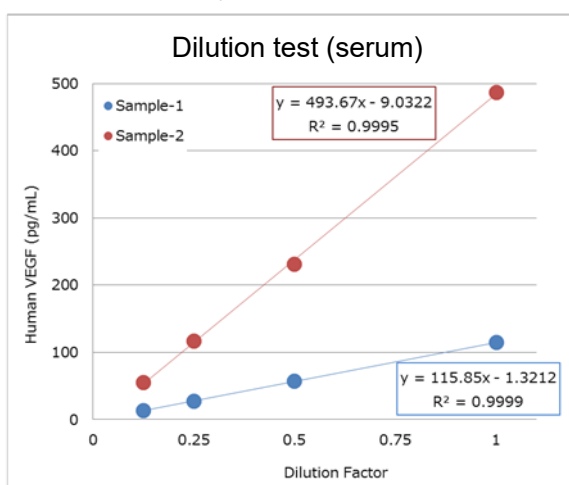
Serum sample

Added (pg/mL)	Found (pg/mL)	Recovered (pg/mL)	Recovery (%)
0	50.6		
89.0	145	94.4	106
189	237	186	98.4
388	456	405	104

Plasma sample (EDTA)

Added (pg/mL)	Found (pg/mL)	Recovered (pg/mL)	Recovery (%)
0	42.1		
97.5	134	91.9	94.3
197	240	198	100
396	420	378	95.5

- Dilution test (Serum sample and plasma sample were serially diluted by 3 steps.) The dilution curves showed linearity with $R^2=0.9926 - 0.9999$



Trouble shooting

- Low absorbance in all wells

Possible explanations:

- 1) The standard or samples might not be added.
- 2) Reagents necessary for coloration such as Biotinylated anti-VEGF antibody, HRP-conjugated streptavidin, or chromogen (TMB) might not be added.
- 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of biotinylated anti-VEGF antibody or HRP-conjugated streptavidin.
- 4) Contamination of enzyme inhibitor(s).
- 5) Influence of the temperature under which the kits had been stored.
- 6) Excessive hard washing of the well plate.
- 7) Addition of chromogenic substrate reagent soon after taking out from a refrigerator might cause poor coloration owing to low temperature.

- Blank OD was higher than that of the lowest standard concentration (1.10 pg/mL).

Possible explanations:

Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 4 times to 5 - 8 times at the constant stroke after the reaction with HRP-conjugated streptavidin.)

- High coefficient of variation (CV)

Possible explanation:

- 1) Improper or inadequate washing.
- 2) Improper mixing of standard or samples.
- 3) Pipetting at irregular intervals.

- Q-1: Can I divide the plate to use it for the other testing?

A-1: Yes, cut off the clear seal on the plate with cutter along strip. Put the residual plate, which is still the seal on, in a refrigerator soon.

LBIS Human VEGF ELISA Kit

- Q-2: I found 96 well-plate is empty when I opened the box.
A-2: As this kit is dried type, not preservation stabilizer is added.

Technical tips / Precautions

- ELISA can be affected by assay environment. Ensure that room temperature at places for assay operation and incubation is strictly controlled at 20 °C to 25 °C. Avoid performing assay under the airstream velocity over 0.4 m/sec. and the humidity less than 30 %, seal the well plate with a plate seal and place the well plate in an incubator or a styrofoam box in each step of incubation.
- To avoid denaturation of the coated antibody, do not let the plate go dry.
- In order to avoid dryness of wells, contamination of foreign substances and evaporation of dispensed reagents, never forget to cover the well plate with a plate seal supplied, during incubation.
- Be careful to avoid any contamination of assay samples and reagents. We recommend the use of disposal pipette tips, and 1 tip for 1 well.
- As the antibody-coated plate is module type of 8 wells × 12 strips, each strip can be separated by cutting the cover sheet with a knife and used independently.
- The chromogen (TMB) should be almost clear pale yellow before use. It turns blue during reaction, and gives yellowish color after addition of stop solution. Greenish color means incomplete mixing.
- Time the reaction from the pipetting of the reagent to the first well.
- Prepare a standard curve for each assay.
- For professional use only, beginners are advised to use this kit under the guidance of experienced person. In manual operation, proficiency in pipetting technique is recommended.
- Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection.
- Avoid contact of skin and mucous membranes with kit reagents or specimens. If any reagents come in contact with eyes, skin, or mucous membranes, wash with copious amounts of water and contact a physician.
- Do not drink, eat, or smoke in a place where this kit is used.
- The materials must not be pipetted by mouth.
- Do not use reagents with different lot numbers together.
- The reagents are prepared to give accurate results only when used in combination within the same box. Therefore, do not combine the reagents from kits with different lot numbers. Even if the lot number is the same, it is best not to mix the reagents with those that have been preserved for some period.
- Handle the sample with proper care, being aware that the sample may have an infection risk. This kit contains animal-derived ingredients.
- Residual samples and used tips should be sterilized before disposal.
- Dispose consumable materials and unused contents in accordance with applicable regional/national regulatory requirements.

Summary of assay procedure □ : Use as a check box

*First, read this instruction manual carefully and start your assay after confirmation of details.

- Bring the well-plate and all reagents back to **20 °C - 25 °C for 2 hours**.
- Concentrated washing buffer must be diluted to **10 times** by deionized water (or distilled water) that returned to 20 °C - 25 °C.
- Standard solution dilution example
 Reconstitute the (B) standard with volume* of deionized water (or distilled water) described in a separate sheet to prepare the Original standard solution (8 ng/mL) . And then prepare dilution series of standard solutions as shown below using the (C) Buffer solution brought to the room temperature.
 *Because the volume of deionized water (or distilled water) to be added to the freeze-dried standard differs depending on the lot, see the specified volume in a separate sheet.

Preparation of diluted VEGF standard solutions:

Conc.(pg/mL)	800	267	88.9	29.6	9.88	3.29	1.10	0
Std. sol.(μL)	50	200*	200*	200*	200*	200*	200	—
Buffer(μL)	450	400	400	400	400	400	400	400

*One rank higher standard.

□ Anti-VEGF antibody coated plate	
□ ↓Washing 4 times (*①) , (*⑤)	
□ (Diluted) samples, or Standards	100 μL
□ ↓Shaking (*②), Incubation for 2 hours at 20 °C - 25 °C. (Standing (*③)) Add deionized water (or distilled water) of room temperature to (D) Biotinylated anti-VEGF antibody (Freeze-dried) (Original (D) solution). Prepare working solution by dilution of original (D) solution to 1:100 with the (C) Buffer solution returned to 20 °C - 25 °C. (This should be prepared during incubation.)	
□ ↓Washing 4 times (*①) , (*⑤)	
□ Biotinylated anti-VEGF antibody	100 μL
□ ↓Shaking (*②), Incubation for 2 hour at 20 °C - 25 °C. (Standing (*③)) Dilute HRP-conjugated streptavidin to 1:100 with the (C) Buffer solution returned to 20 °C - 25 °C. (This should be prepared during incubation.)	
□ ↓Washing 4 times(*①) , (*⑤)	
□ HRP-conjugated streptavidin	100 μL
□ ↓Shaking (*②), Incubation for 30 minutes at 20 °C - 25 °C. (Standing (*③))	
□ ↓Washing 4 times(*①) , (*⑤)	
□ Chromogen (TMB) After dispense, the color turns to blue depending on the concentration.	100 μL
□ ↓Shaking (*②), Incubation for 20 minutes at 20 °C - 25 °C. (Standing (*③))	
□ Stop solution After dispense, the color turns to yellow depending on the concentration.	100 μL
□ ↓Shaking (*②) Immediately shake.	
□ Measurement of absorbance (450 nm, Ref 620 nm (*④)) immediately. Ref. wave cancels the dirt in the back of plate.	

*①After dispensing wash buffer to wells, lightly shake the plate on your palm for 10 sec and remove the buffer. Guideline of washing volume: 300 μL/well for an automatic washer and for a pipette if the washing buffer is added by pipette. In case of washing by using 8 channel pipette, sometimes the back ground tends to be high. If so, change washing frequency from 4 times to 5 - 8 times at the constant stroke after the reaction

LBIS Human VEGF ELISA Kit

with HRP-conjugated streptavidin.

Standard of plate-washing pressure: 5 - 25 mL/min. (Adjust it depending on the nozzle's diameter.)

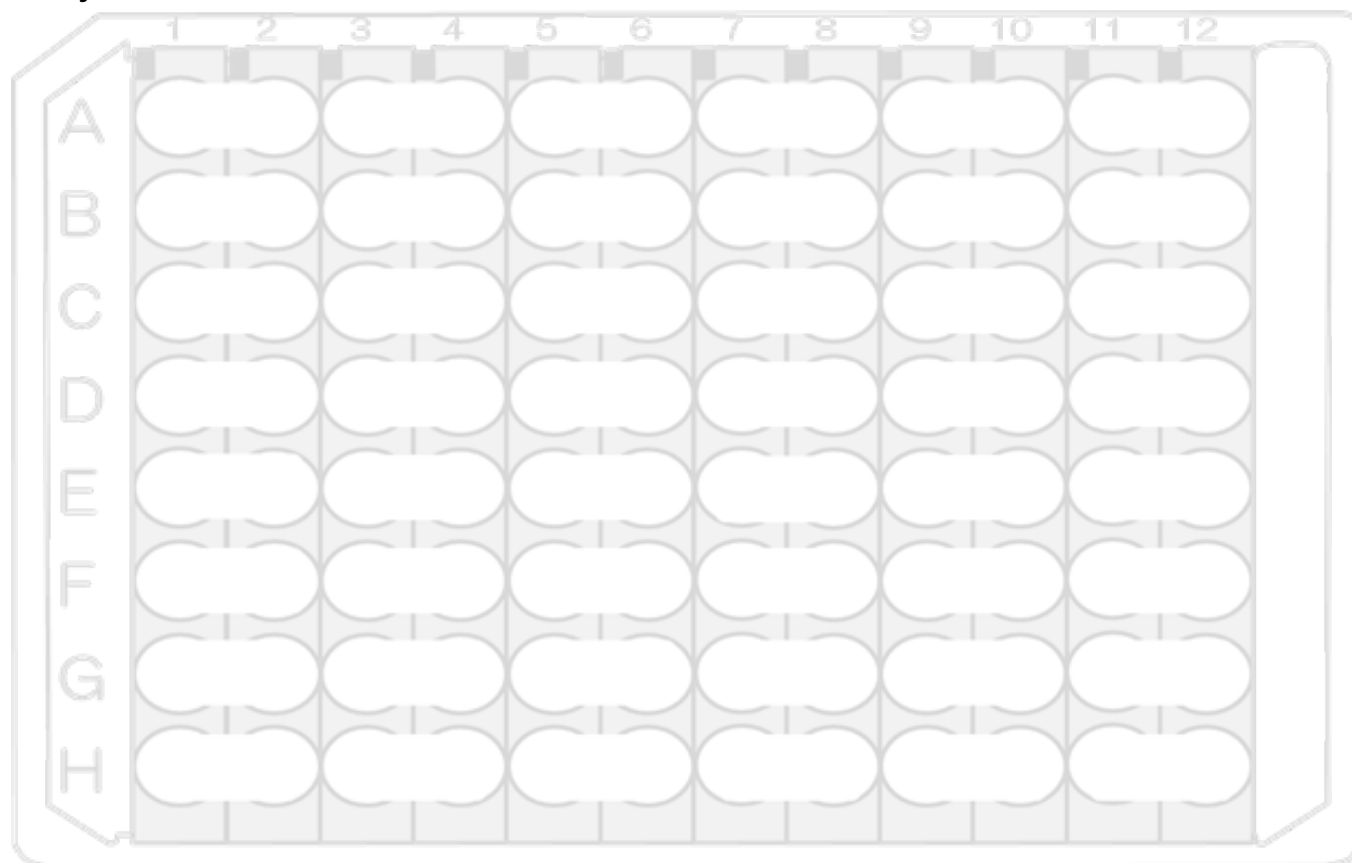
*② Guideline of shaking: 600 rpm - 1,200 rpm for 10 seconds×3 times.

*③ Seal the plate during the reaction after shaking. Peel off the protective paper from the seal and stick the seal on the plate. Do not reuse the plate seal used once.

*④ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.

*⑤ After removal of wash buffer, immediately dispense the next reagent.

Assay worksheet



LBIS Human VEGF ELISA Kit

[Storage condition] Store the kit at 2 °C - 8 °C (Do not freeze)

[Term of validity] Expiration date is indicated on the container

[Cat #] 631-40831

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan

Telephone : +81-6-6203-3741

Facsimile : +81-6-6201-5964

<https://www.fujifilm.com/ffwk/en>

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書に従って測定を実施してください。本キットを初めてご使用になられる場合は後述の「◆ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項」をご確認の上ご使用ください。

『 レビス® Human VEGF ELISA Kit 』 取扱説明書

1. イントロダクション

VEGF ファミリーは血管新生において重要な役割を担うサイトカインで、異なる遺伝子にコードされる VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PLGF-1 及び PLGF-2 の7種類が知られています。なかでも、VEGF-A は最も強力な作用を示し、選択的スプライシングにより 121,165,189 アミノ酸タイプのサブタイプが存在することが知られています。VEGF-A₁₆₅ はサブタイプの中で、最も多く存在し、腫瘍血管を誘導する効率も高いことが知られており、種々の癌において、予後の悪化と強く関係することが示されています。また、関節リウマチ、動脈硬化、網膜症、POEMS 症候群などの疾患との相関も報告されています。

本キットはヒト VEGF(VEGF-A₁₆₅)を定量的に測定するためのサンドイッチ酵素免疫測定法試薬で、ヒト血清(血漿)中の VEGF を特異的かつ高感度に測定することができます。また、本キットに含まれる標準品は大腸菌リコンビナントタンパク質であり、カルタヘナ法非該当品です。本キットは研究目的にのみご使用ください。

◆製品の特長

- ヒト血清(血漿)中 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-A₁₆₅)を特異的かつ高感度に測定できます。
- 全反応時間は4時間50分です。
- 標準品は大腸菌リコンビナントで、カルタヘナ法非該当です。

2. 測定原理

本キットは標準品、検体を抗 VEGF 抗体固相化マイクロプレートウェル中でインキュベートします。2時間のインキュベーションと洗浄後、ビオチン結合抗 VEGF 抗体を加え2時間インキュベートします。再度の洗浄後、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を加え、30分インキュベートします。洗浄後、ウェルに残ったペルオキシダーゼを発色液(TMB)と反応させます。反応は酸性の溶液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物が450 nm (副波長620 nm) で比色測定されます。吸光度は VEGF 濃度にほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットすることで検量線が作られ、この検量線を使って未知検体中の濃度が決定されます。

3. 構成

構成品	状態	容量
(A) Anti-VEGF antibody coated plate 抗体固相化 96 ウェルプレート	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1枚
(B) Standard human VEGF ヒト VEGF 標準品	凍結乾燥品・溶解後使用	1本
(C) Buffer solution 緩衝液	そのまま使用	60 mL/1本
(D) Biotinylated anti-VEGF antibody ビオチン結合抗 VEGF 抗体	凍結乾燥品・溶解後使用	1本
(E) HRP-conjugated streptavidin ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	希釈後使用	100 µL/1本
(F) Chromogen (TMB) 発色液(TMB)	そのまま使用	12 mL/1本
(H) Stop solution 反応停止液	Be careful! 取扱注意 そのまま使用	12 mL/1本
(I) Wash stock solution (10×) 濃縮洗浄液(10×)	希釈後使用	100 mL/1本
プレートシール		4枚
取扱説明書		1部

4.キットの保存と使用期限

キットは 2 °C~8 °C で保存してください (凍結厳禁)。この保存条件下でキットは外箱のラベルに記載された有効期限内安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないでください。開封した各試薬につきましては、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

5.キット以外に測定に必要な器具 □チェックリスト

- 精製水 (蒸留水)
- 試験管
- 洗浄液希釈用器具
- チップ交換型ピペット (50 μL 及び 100 μL~1000 μL を正確に採取できるもの)
- 連続分注ピペット
- ペーパータオル等 (洗浄時に使用)
- 攪拌器 (Vortex タイプ)
- プレート振とう器 (約 600 rpm~1200 rpm)
- プレート用洗浄機 (あれば好ましい) または噴射ビン
- プレートリーダー (450 ± 10 nm/600 nm~650 nm)
- データ計算用ソフトウェア

6.試薬の調製

- * キットの試薬は使用前に必ず室温 (20 °C~25 °C) に戻してください (2 時間位が目安です)。
- * 3.で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「溶解後使用」、「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製してください。
- * 測定に必要な分だけ試薬を調製してください。

【濃縮された試薬類の希釈】

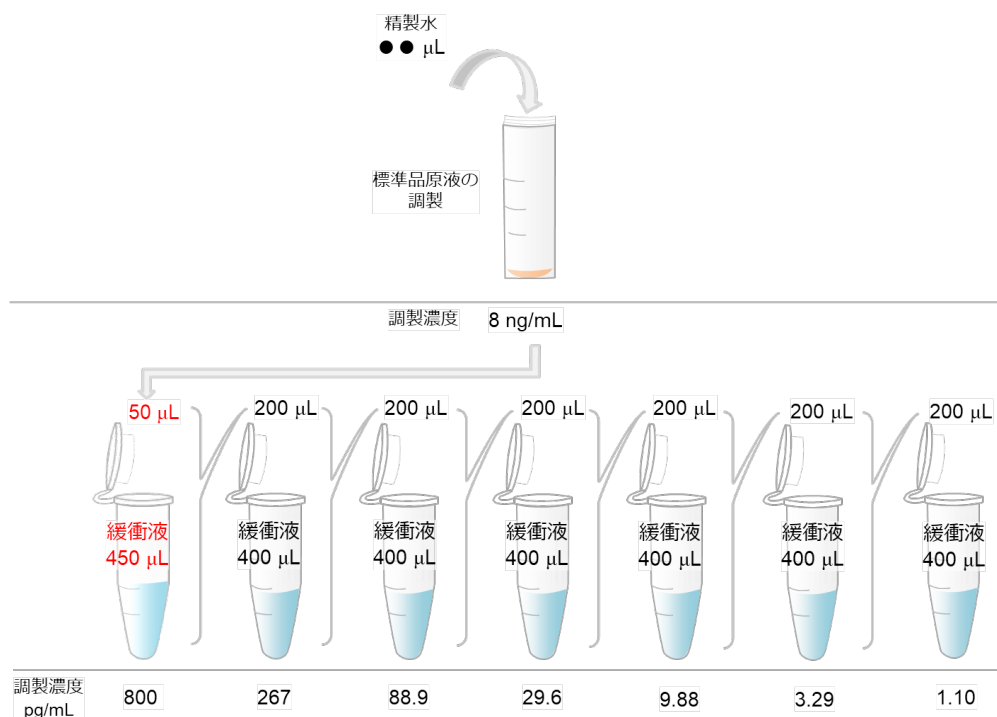
(B) Standard human VEGF ; 検量線作成用

(B) Standard human VEGF に精製水を別紙に記載の指定量 * 加え溶解し、標準品原液 (8 ng/mL) を調製してください。その後室温化されたキット添付 (C) Buffer solution で調製してください。加える精製水の量は別紙ご参照ください。* ロットにより精製水を添加する量が異なるため、別紙に記載の指定量をご確認ください。

標準溶液の容量	(C) Buffer solution	濃度 (pg/mL)
標準品原液 : 50 μL	450 μL	800
800 pg/mL 溶液 : 200 μL	400 μL	267
267 pg/mL 溶液 : 200 μL	400 μL	88.9
88.9 pg/mL 溶液 : 200 μL	400 μL	29.6
29.6 pg/mL 溶液 : 200 μL	400 μL	9.88
9.88 pg/mL 溶液 : 200 μL	400 μL	3.29
3.29 pg/mL 溶液 : 200 μL	400 μL	1.10
0 (Blank)	400 μL	0.00

左記は一例です。

検量線作成



(D) Biotinylated anti-VEGF antibody

精製水 100 µL を加え溶解し、(C) Buffer solution で **100 倍** に希釈してください。

(E) HRP-conjugated streptavidin

(C) Buffer solution で **100 倍** に希釈してください。

(I) Wash stock solution (10×)

濃縮洗浄液(10×)を室温化された精製水（蒸留水）で **10 倍** に希釈してください。

例：100 mL の濃縮洗浄液(10×)+900 mL の精製水（蒸留水）（96 ウェル全てを使用する場合）

【各試薬の安定性と保存方法】

(A) Anti-VEGF antibody coated plate

未使用抗体固相化ストリップはジップシールパックに戻し、そのまま 2 °C~8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(B) Standard human VEGF

凍結乾燥状態で有効期限内安定性を保ちます。標準品原液は 2 °C~8 °C で保存し、2 週間以内に使用してください。希釈調製した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないでください。

(C) Buffer solution 及び(F) Chromogen (TMB)

一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2 °C~8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(D) Biotinylated anti-VEGF antibody

凍結乾燥状態で有効期限内安定性を保ちます。精製水を加え溶液化したビオチン結合抗体原液は 2 °C~8 °C で保存し、2 週間以内に使用してください。緩衝液で希釈調製した溶液は直ちに使用し、保存はしないでください。

(E) HRP-conjugated streptavidin

キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2 °C~8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄してください。

(H) Stop solution

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2 °C~8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(I) Wash stock solution (10×)

Wash stock solution (10x) を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2 °C~8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄してください。

7.検体の調製

- 検体を長期に保管する場合は、-35 °C 以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けてください。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌してください。また、検体を希釈する場合は用時調製としてください。
- 検体は定法に従い採血、分離したヒト血清及び血漿を使用してください。
- 血漿採血時の抗凝固剤には、EDTA（またはヘパリン）を使用してください。
- 血清分離促進剤等を使用する際は事前確認をしてください。
- 溶血した検体や高脂質検体は使わないでください。
- 濁り及び不溶物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いてください。
- 妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、異なる 2 ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認してください。
- 検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管(PP、PE)等を用いて緩衝液で希釈し測定ウェルに分注してください。

8.測定操作法

洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意してください。

- (1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし、4 回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
- (2) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 100 µL ずつ分注します。
- (3) 検体測定ウェルに検体を 100 µL ずつ分注します。
- (4) マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
- (5) プレートシールを貼り(*③)、室温(20~25 °C)で 2 時間静置します。
- (6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、4 回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
- (7) 各ウェルにビオチン結合抗 VEGF 抗体を 100 µL ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
- (8) プレートシールを貼り(*③)、室温(20 °C~25 °C)で 2 時間静置します。
- (9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 4 回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオル

ルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。

- (10) 各ウェルにペルオキシダーゼ・アビジン結合物を 100 μ L ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (11) プレートシールを貼り(*③)、室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)で 30 分間静置します。
 - (12) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 4 回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (13) 各ウェルに発色液を 100 μ L ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (14) プレートシールを貼り(*③)、室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)で 20 分間静置します。
 - (15) 各ウェルに反応停止液を 100 μ L ずつ分注し、発色反応を停止します。
 - (16) 攪拌(*②)後、直ちにマイクロプレート用分光光度計で 450 nm (副波長 620 nm) での吸光度を測定します。副波長は 600 nm~650 nm の範囲で使用できます。
- (*①)、(*②)、(*③) 測定手順概要 (15、16 ページ) をご参照ください。

9.計算

- (1)測定毎に検量線を作成します。X 軸を標準溶液濃度(pg/mL)、Y 軸を吸光度の検量線グラフを作成してください。
 - (2)検量線より、(希釈) 検体の吸光度に対応する濃度(pg/mL)を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。
- * 検体の吸光度が検量線吸光度より外れた場合は(C) Buffer solution にて適当倍率に調製し再度測定を実施してください。
- * 演算処理では、3 次多項式または 4 または 5 パラメーターの使用をお勧め致します。

10.キャリブレーション

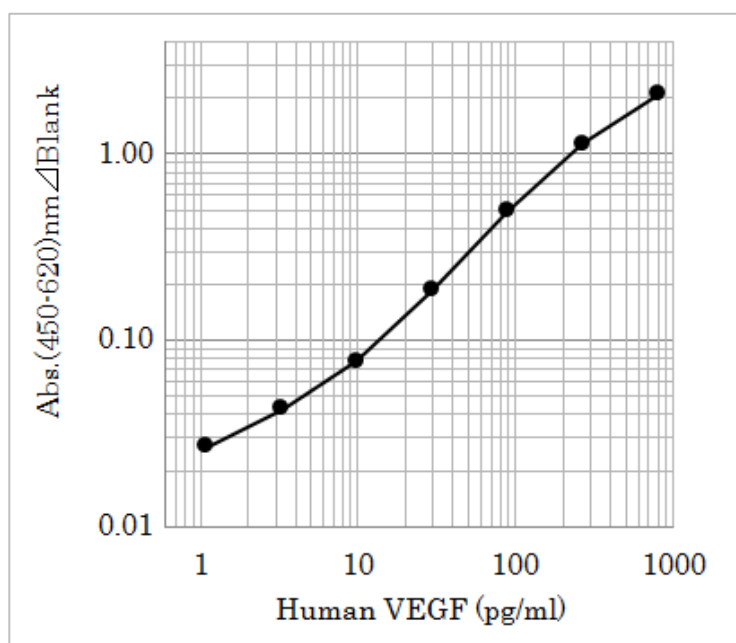
本キットによって得られた測定値は、下記計算式に従ってキット添付の別紙に定められた換算係数を乗じることによって NIBSC/WHO 標準品 VEGF165(Code:02/286)を基準にしたユニット濃度に換算することができます。

$\text{NIBSC/WHO}(02/286)\text{ユニット濃度}(U/mL) = \text{換算係数} \times \text{本キット測定値}(pg/mL)$

* 換算係数は製品ロットごとに変動する場合がありますので、製品ロットごとに定められた換算係数を確認してから計算してください。

11.キットの性能

- 測定範囲：1.10 pg/mL~800 pg/mL



●精度試験（アッセイ内変動）

正常血清に異なる濃度の VEGF を添加した 2 検体を 5 重測定

n / ID	Sample1 (pg/mL)	Sample2 (pg/mL)
1	29.7	37.8
2	28.3	36.5
3	27.7	35.0
4	29.3	35.4
5	28.8	35.4
mean	28.8	36.0
SD	0.79	1.1
CV(%)	2.8	3.2

平均 C.V.値は 15 %未満

●再現性試験（アッセイ間変動）

正常血清に異なる濃度の VEGF を添加した 3 検体を 4 日間、3 重測定

Day /ID	Sample1 (pg/mL)	Sample2 (pg/mL)	Sample3 (pg/mL)
0 日目	279	86.1	11.9
1 日目	271	84.5	12.5
2 日目	268	88.5	11.2
3 日目	269	88.1	11.5
mean	272	86.8	11.8
SD	5.0	1.9	0.56
CV(%)	1.8	2.1	4.8

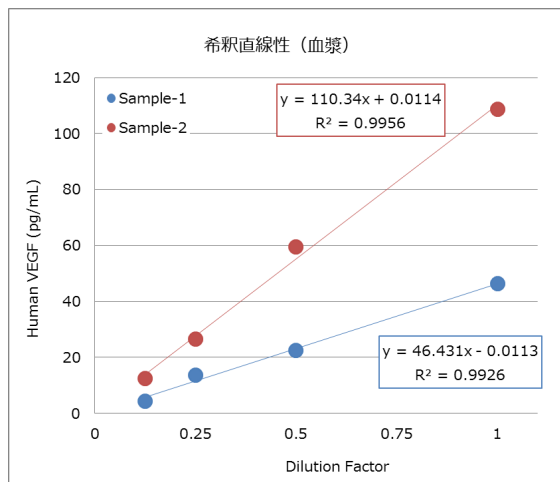
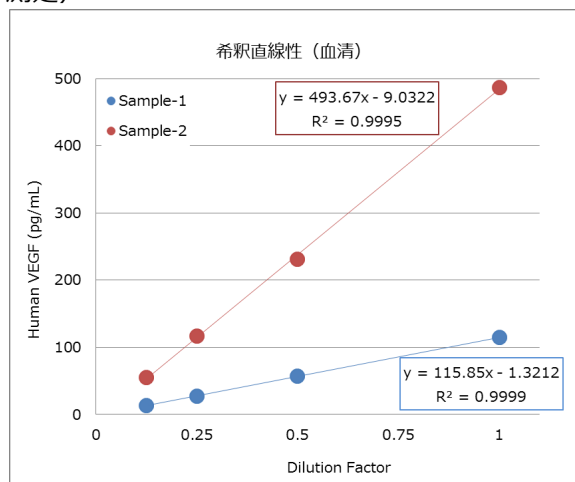
平均 C.V.値は 15 %未満

●添加回収試験（正常血清または血漿検体に異なる 3 濃度の VEGF を添加し測定）回収率は 94.3 %～106 %

添加量 (pg/mL)	実測値 (pg/mL)	回収量 (pg/mL)	回収率 (%)
0	50.6		
89.0	145	94.4	106
189	237	186	98.4
388	456	405	104

添加量 (pg/mL)	実測値 (pg/mL)	回収量 (pg/mL)	回収率 (%)
0	42.1		
97.5	134	91.9	94.3
197	240	198	100
396	420	378	95.5

●希釈直線性（正常血清または血漿に異なる濃度の VEGF を添加した 2 検体を連続的に緩衝液で 3 段階希釈し測定）



直線回帰の r² は 0.99 以上

12.トラブルシューティングと Q&A

●すべてのウェルでの反応が弱い

原因として考えられること

- 1)標準品や検体の入れ忘れ。
- 2)発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
- 3)発色に関連する試薬溶液の取り違いや希釈調製不良。
- 4)酵素阻害剤の混入。
- 5)キット保管温度の影響（凍結した場合）。
- 6)プレートの過剰な洗浄。
- 7)発色液の温度が低かった。

●最小標準溶液濃度(1.10 pg/mL)の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。

原因として考えられること

洗浄が不適当、不完全であった。

●変動係数(CV)が大きい

原因として考えられること

- 1)洗浄が不適當、不完全であった。
- 2)標準品や管理血清、検体の攪拌が不充分であった（凍結検体の攪拌は充分に行ってください）。
- 3)ピペティング操作が一定ではなかった。

- Q-1：キットは分割して使用することができますか？
A-1：できます。使用しないプレートはジップシールパックに戻し、冷蔵庫に保管してください。
- Q-2：プレートを取り出したらウェルの中に保存液が入っていませんでしたが問題ありませんか？
A-2：問題ありません。このキットは乾燥プレートタイプとなっております。
- Q-3：検体を融かしたらモヤモヤした不溶解物がありましたが測定に影響がありますか？
A-3：影響が出る可能性があります。測定値が低く出たり、測定下限以下になる場合があります。
- Q-4：血漿でも測定できますか？
A-4：血漿でも測定できますが、社内においては血漿での測定は血清に比べ低く出る傾向が見られました。採血条件は統一されることをお勧めします。

ワークシート（例）

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	Std. 800 pg/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	Std. 267 pg/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	Std. 88.9 pg/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	Std. 29.6 pg/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	Std. 9.88 pg/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	Std. 3.29 pg/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	Std. 1.10 pg/mL	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
H	0 (Blank)	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40

◆ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項

- ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温：20℃～25℃（実験台上またはインキュベータ内温度）を厳守してください。また、風速（エアコン風も含む）：0.4 m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下での測定は避けてください。
- 各ステップでの静置反応時には、ウェルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼ってください。
- 検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけてください。1 ウェル/1 チップのご使用をお勧めします。
- 発色液は使用するまでは薄い黄色澄明です。光を避けて保存してください。
- 反応停止液には硫酸を使用しています。取り扱いに注意してください。使用するまでは無色です。
- 本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の方のご使用ください。用手法操作で測定する際にはピペティング操作の再現性が安定した方がご使用ください。
- 準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけてください。
- 試薬類を皮膚に付けないでください。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けてください。
- 本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないでください。
- 試薬類は口でピペティングしないでください。
- ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないでください。
- 検体は感染の危険性があるものとして充分注意して取り扱ってください。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
- 使用済みの検体、使用した消耗品等は、定法に従い滅菌処理してください。処理した検体や消耗品、未使用の薬品類は所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄してください。

【測定手順概要とチェックリスト】

必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後測定操作を行ってください。

- プレート、試薬類を十分に室温(20℃～25℃)に戻してください。室温化には2時間位必要です。
- 濃縮洗浄液の希釈：室温化された精製水で、**10倍**に希釈してください。

標準溶液の希釈(例)：

- (B) ヒト VEGF 標準品に精製水を別紙に記載の指定量 * 加え溶解し、標準品原液(8 ng/mL)を調製してください。その後室温化されたキット添付(C) Buffer solution で調製してください。加える精製水の量は別紙ご参照ください。* ロットにより精製水を添加する量が異なるため、別紙に記載の指定量をご確認ください。

濃度(pg/mL)	800	267	88.9	29.6	9.88	3.29	1.10	0
標準溶液(μL)	50	200*	200*	200*	200*	200*	200	—
緩衝液(μL)	450	400	400	400	400	400	400	400

*：ひとつ高濃度の標準溶液

各操作注意事項

<input type="checkbox"/> 抗体固相化 96 ウェルプレート		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> 検体または標準溶液	100 μL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、2時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> (D)ビオチン結合抗 VEGF 抗体の希釈。精製水で溶解後、室温化した(C) Buffer solution で 100倍 に希釈してください。希釈溶液の調製は第一反応中に行う。		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> ビオチン結合抗 VEGF 抗体	100 μL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、2時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> (E)ペルオキシダーゼ・アビジン結合物の希釈。室温化した(C) Buffer solution で 100倍 に希釈してください。希釈溶液の調製は第二反応中に行う。		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	100 μL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、30分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに発色液分注)		* ①
<input type="checkbox"/> 発色液(TMB) 分注後、濃度により青色に呈色	TMB が室温化されていることを確認 100 μL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、20分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> 反応停止液 分注後、濃度により黄褐色に変色	強酸性につき取扱注意 100 μL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌 (直ちに攪拌)		* ②
<input type="checkbox"/> 直ちに吸光度測定 (主波長 450 nm、副波長 620 nm:600 nm～650 nm) 副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします		

(* ①) 洗浄毎に洗浄液をウェルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。4 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300 μL/ウェルです。万一、最小標準溶液濃度(1.10 pg/mL)の OD 値よりブランク OD 値が高くなる場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ結合物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回～6 回に増やしてください。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5 mL/分～25 mL/分 (ノズルの径により異なります) です。第一反応後の初回の洗浄のみウェル間のコンタミに注意してください。

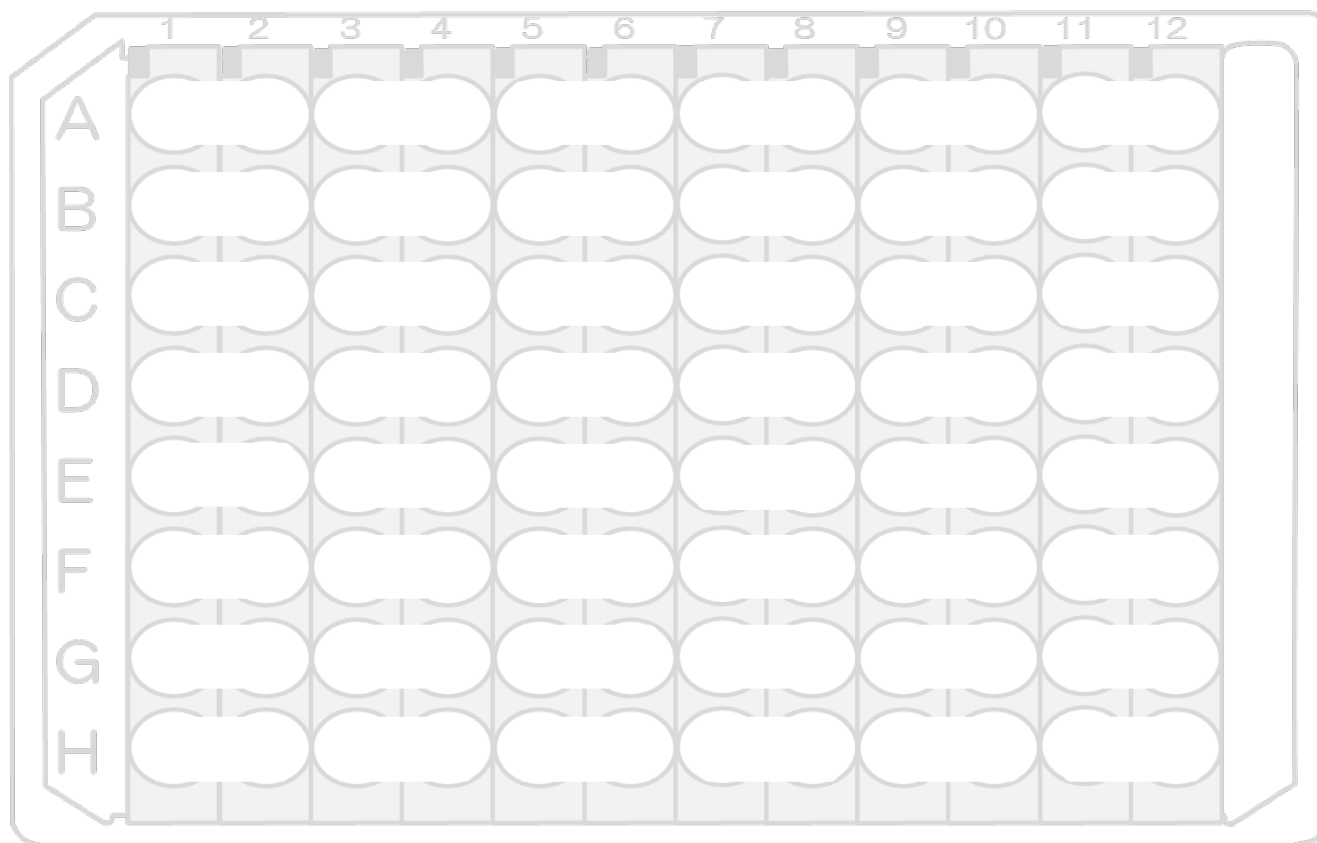
(* ②) 攪拌の目安は 600 rpm～1200 rpm-10 秒間、3 回。

(* ③) 攪拌終了後プレートシールを貼り静置してください。

LBIS Human VEGF ELISA Kit

プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けてください。一度使用したプレートシールは再使用しないでください。

ワークシート



【測定名】

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【有効期限】

【備考】

【製品名】 レビス® Human VEGF ELISA Kit

【和光コード】 631-40831

【英語表記】 LBIS Human VEGF ELISA Kit

【お問い合わせ先】

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号

Tel : 06-6203-3741

Fax : 06-6201-5964

<https://www.fujifilm.com/ffwk/ja>