

ヒト HGF 臓器抽出試薬

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、臨床診断には使用できません。

【試薬の構成】

- 抽出液 30 mL × 5 本
- 検体希釈液 H 15 mL × 1 本
- HGF 標準液 1 (0 ng/mL) 0.5 mL × 1 本
HGF 標準液 2 (0.3 ng/mL) 0.5 mL × 1 本
HGF 標準液 3 (1 ng/mL) 0.5 mL × 1 本
HGF 標準液 4 (3 ng/mL) 0.5 mL × 1 本
HGF 標準液 5 (6 ng/mL) 0.5 mL × 1 本
- 洗浄原液 (20 倍濃縮液) 25 mL × 1 本
- プレートシール (付属品) 1 枚

【使用目的】

本品はヒト肝細胞増殖因子 (HGF) のヒト臓器からの抽出、および抽出検体を測定するための試薬です。

測定には本品の他にイムニス®HGF EIA キットが必要です。

【必要な試薬】

1. イムニス®HGF EIA で必要な試薬

HGF 標準液以外の全ての試薬

2. その他準備が必要な試薬

- Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)
例) SIGMA 社 Phenylmethanesulfonyl fluoride (P7626)
- インプロパノール (PMSF 溶解用)

【臓器抽出用試薬の調製法】

1. 100 mM PMSF の調製

PMSF 17.4 mg を量り取り、1 mL のインプロパノールに溶解します。

2. PMSF の添加

- 抽出液 30 mL に 100 mM PMSF を 0.3 mL 加えてよく混合します。
(PMSF の最終濃度 1 mM)
- 検体希釈液 H 15 mL に 100 mM PMSF を 0.15 mL 加えてよく混合します。
(PMSF の最終濃度 1 mM)

※試薬は必要量を使用時に調製してください。

【臓器抽出検体の調製法】

1. 臓器検体の重量測定

- 臓器片はアルミホイル等、吸湿しないものに載せて秤量してください。
このとき、臓器片が小さく mg 単位の場合は微量天秤を使用してください。
- 臓器片をポリプロピレン製又は、ポリエチレン製容器に移します。
〈注意〉HGF はガラスに吸着しやすいのでガラス製容器は使用しないでください。
- 重量 20 mg 以上の大きさの臓器片は、できるだけ小片化します。
(ハサミで小片化します。ハサミに付着した臓器片や臓器の滲出液は、抽出液添加時に洗い込んでください。)

2. 抽出液の添加

- 臓器重量に対して 5~100 容の抽出液を添加します。
(1 容とは臓器 1 mg につき抽出液 1 μ L の割合です。)
- 臓器重量によって 5~100 容の範囲で適宜抽出液の添加量を工夫してください。
5~100 容抽出で、ほぼ同等の抽出が可能です。
「抽出例」をご参照ください。

3. 抽出操作

- 抽出液を添加した臓器をホモジナイザー等で破碎します。
抽出方法は臓器重量によって適宜工夫してください。

《抽出方法の例》

- 臓器重量が 5 mg 未満の場合:ホモジナイザーで抽出できます。
(注意)ガラス製ホモジナイザーは使用しないでください。
(例えば、エッペンドルフ社のマイクロテストチューブとマイクロ乳棒を組み合わせて使用できます。)
 - 臓器重量が 5 mg 以上の場合:超音波破碎(マイクロチップ、氷冷下)
 - 臓器重量が g 単位の場合:ポリロン抽出(氷冷下)もできます。
(注意)HGF は熱に不安定なので、超音波破碎、ポリロン抽出は必ず氷冷下で行なってください。
- 15,000 rpm で 30 分間遠心します。(卓上遠心機も可)
遠心は 4°C 条件下が望ましいですが、室温でも可能です。
臓器重量が 10 mg 以下の場合には臓器残渣が少ないので、15,000 rpm、5 分間でも可能です。

4. 粗抽出液の回収

最上層の lipid 層、最下層の臓器残渣を混ぜないように中間層のみをきれいに回収します。

〈注意〉回収にはガラス製容器は使用せず、ポリプロピレン製又は、ポリエチレン製容器を使用してください。

《抽出例》

臓器重量	抽出液量	例		抽出方法
		臓器重量	抽出液量	
1~5 mg (生検レベル)	100~200 容	1 mg 5 mg	200 μ L 500 μ L	ホモジナイザー又は超音波破碎 (マイクロチップ、氷冷)
5~50 mg	10~100 容	5 mg 50 mg	500 μ L 500 μ L	超音波破碎 (マイクロチップ、氷冷)
50~100 mg	5~10 容	50 mg 100 mg	500 μ L 500 μ L	超音波破碎 (マイクロチップ、氷冷)
100 mg 以上	5 容	100 mg 1 g	500 μ L 5 mL	超音波破碎(氷冷) ポリロン(氷冷)など

- 粗抽出液原液で測定する場合、HGF 値の測定には 50 μ L (n=1 測定) 又は 100 μ L (n=2 測定) の粗抽出液原液が必要です。
- ホモジナイザーや超音波破碎(マイクロチップ使用)で抽出する場合には 500 μ L 程度の液量で行うと容易に操作できます。
- 粗抽出液の HGF 濃度(目安)は、臓器 1 mg に抽出液 100 μ L の割合で抽出した場合 正常肝:1 ng/mL 前後、疾患肝:正常肝と同レベル~数十倍の濃度となります。
- 以上のことを考慮して、抽出液添加量を決定します。

【操作方法】

1. 試薬の調製方法(イムニス®HGF EIA キット試薬)

- 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、錠剤が完全に溶解したのを確認後、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 倍に希釈します。未使用の洗浄液は 2~10°C で保存してください。

2. 必要な器具・器材

- マイクロピペット 50 μ L, 100 μ L
- メスピペット 10 mL
- メスシリンダー 1 L
- マイクロプレート振盪器
- 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
- 暗箱(暗い戸棚又は引き出しでも可)
- 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)

3. 臓器抽出検体の測定操作法

測定にはイムニス®HGF EIA キットを用います。

測定は原則として二重以上で行うことをお奨めします。

キットの各試薬は使用前に必ず 20~30°C に戻してください。

図 1 に示すように、測定ごとに HGF 標準液用ウェル(2 ウェル × 5 種 = 10 ウェル)を設けて測定してください。

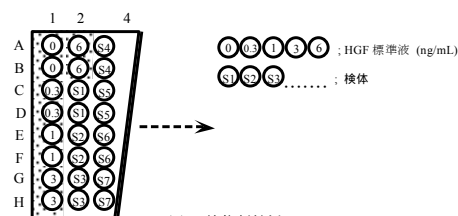


図 1 検体割付例

- 検体の予備希釈
臓器抽出検体は適宜、抽出液で予備希釈します。
《粗抽出液の HGF 濃度の目安》
臓器 1 mg に対して 100 μ L の抽出液で抽出した場合
正常肝 : 1 ng/mL 前後
疾患肝 : 正常肝と同レベル~数十倍の濃度
- 抗 HGF 抗体固相プレートの前処理
プレートの各ウェルに抽出液を 200 μ L ずつ分注し、プレート上面に添付のプレートシールを貼り、マイクロプレート振盪器に固定して 20~30°C で 10 分間振盪します。
- 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「1. 試薬の調製方法 (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 回繰り返して行います。マイクロプレートウォッシャーを用いて洗浄する場合も 5 回洗浄してください。
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、洗浄終了後は、迅速に次の操作を行ってください。
- 検体の添加方法
以下のとおり、HGF 標準液、臓器抽出検体、検体希釈液を各ウェルに加ええます。

測定法	HGF 標準液 (ヒト HGF 臓器抽出試薬)	臓器抽出検体	検体希釈液	
			検体希釈液 (イムニス HGF EIA)	検体希釈液 H (ヒト HGF 臓器抽出試薬)
標準液測定	50 μ L	—	—	50 μ L
検体測定	—	50 μ L	50 μ L	—

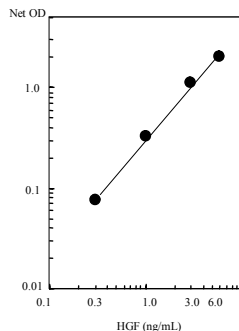
HGF 標準液 (ヒト HGF 臓器抽出試薬) : 0, 0.3, 1, 3, 6 ng/mL の 5 濃度を使用し、第 1 次反応以降はイムニス® HGF EIA と同じ方法で行います。

- 第 1 次反応
プレート上面に添付のプレートシールを貼り、マイクロプレート振盪器に固定して、20~30°C で 1 時間振盪します。(200~700 rpm)
- 洗浄
「(3) 洗浄」と同じ手順で洗浄します。
- 酵素標識モノクローナル抗体の添加
全ウェルに酵素標識モノクローナル抗体を 100 μ L ずつ加えます。
- 第 2 次反応
プレートシールを貼り、マイクロプレート振盪器に固定して、20~30°C で 1 時間振盪します。
- 酵素基質液 (発色剤含有) の調製
第 2 次反応終了の約 15 分前に、「1. 試薬の調製方法 (1)」の手順に従って酵素基質液 (発色剤含有) を調製します。
- 洗浄
「(3) 洗浄」と同じ手順でプレートと洗浄します。
- 酵素基質液 (発色剤含有) の添加
「(9) 酵素基質液 (発色剤含有) の調製」で調製した酵素基質液 (発色剤含有) を全ウェルに 100 μ L ずつ加えます。
- 酵素反応
プレートを暗所に入れて、20~30°C で 30 分間静置します。
- 反応停止液の添加
全ウェルに反応停止液 50 μ L を加えてよく混合します。
- 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) で各ウェルの吸光度を測定します。2 波長測定の場合の副波長は 620 nm 以上とします。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. 測定系の確認と特異的吸光度 (Net OD) の算出

- HGF 標準液 1 (0 ng/mL) の吸光度が 0.050 未満であることを確認します。
- HGF 標準液 1 の吸光度の 2 ウェルの平均値を算出します。もし 2 ウェルのうち、いずれか一方が 0.050 以上となった場合には、平均せずに 0.050 未満の方を吸光度とします。2 ウェル共に吸光度が 0.050 以上となった場合には、再測定してください。
- 各ウェルの吸光度から「HGF 標準液 1」の吸光度の平均値を差し引いて、各ウェルの Net OD を算出します。



2. HGF 標準液による検量線の作成

- 両対数グラフの X 軸に標準液の濃度を、Y 軸に Net OD をプロットし、検量線を作成します。

3. HGF 濃度の算出

- 検体の Net OD を検量線に当てはめ、HGF 濃度を読みとります。
- 検体の吸光度が HGF 値 6 ng/mL (標準液の上限) を超えた場合は検体を抽出液で希釈して再測定してください。

4. 臓器重量当たりの HGF 量の算出

下式に基づいて臓器重量当たりの HGF 量を算出します。

$$\text{臓器重量当たりの HGF 量 (ng/mg)} =$$

$$\frac{\text{HGF 濃度 (ng/mL)} \times \text{検体予備希釈率} \times \text{抽出液添加量 (mL)}}{\text{臓器重量 (mg)}}$$

【使用上又は取扱い上の注意事項】

本添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用目的及び操作方法以外での使用につきましては測定結果の信頼性を保証しかねます。

1. 一般的注意

- 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 製造番号の異なるキットの試薬を組み合わせ使用しないでください。
- 抽出液、検体希釈液 H は、マウス・ラット HGF 臓器抽出液及びラット HGF EIA とは異なるので、共用しないでください。
- キット中の容器、付属品は他の目的に転用しないでください。

2. 操作上の注意

- 測定器具の精度を確認し、各器具の操作法に従い測定してください。
- 有機溶剤を含む発色剤、テトラメチルベンチジン (TMB) を使用した他の ELISA 測定系と同じ場所で酵素反応を行うと、発色剤 (OPD) の反応が阻害され、測定に影響を与えることがあります。

3. 取扱い上の注意

- 検体は HBV、HCV、及び HIV などによる感染の危険性があるものとして取り扱い、検体に使用した器具類は 0.1% 次亜塩素酸等の液に浸漬してください。
- 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ように注意してください。もし皮膚にかかったときは、多量の水で洗い流してください。(毒性、刺激性で火傷のおそれがあります。) 必要があれば、医師の手当て等を受けてください。
- 検体希釈液、HGF 標準液にはアジ化ナトリウムが添加されているので、廃棄の際には爆発性の金属アジドが生成しないよう十分注意して多量の水を流しながら行ってください。
- 試薬及び器具等を廃棄する際や、検体や廃液が飛散した場合には、イムニス® HGF EIA の添付文書に従って処理してください。

【貯法及び有効期間】

凍結を避け、2~10°C で保存。
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 (抽出液 1 mL / 1 検体として使用した場合)
CODE: IZ72
大型の臓器から抽出する場合には、別途ご相談ください。

【参考文献】

- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* **122**: 1450-1459, 1984.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, et al: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**: 440-443, 1989.
- Nakamura T: Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res* **3**: 67-85, 1991.
- Yamada A, Matsumoto K, Iwanari H, et al: Rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of HGF in rat and human tissues. *Biomed Res* **16**: 105-114, 1995.
- 武藤泰敏、河合忠、佐藤俊一、他: 肝疾患患者における血清ヒト肝細胞増殖因子 (hHGF) レベル測定の実臨床的意義 (全国 19 施設による検討)。*肝胆膵* **25**: 541-549, 1992.
- 松田康伸、中村敏一: 肝細胞増殖因子 (HGF) の分子生物学。日本臨床 **51**: 435-445, 1993.

【問い合わせ先】

株式会社 特殊免疫研究所 営業部
〒112-0004 東京都文京区後楽一丁目 1 番 10 号
日本生命水道橋ビル
TEL 03-3814-4081 FAX 03-3814-5957

ウェルの割付と手順

手順	試薬	HGF 標準液 1~5 (ヒト HGF 臓器抽出試薬) (1A~1H, 2A~2B)	臓器抽出検体 (2C~12H)
1 検体予備希釈	抽出液	—	粗抽出液の HGF 濃度の目安 (臓器 1mg につき抽出液 100 μ L の割合で抽出した場合) 正常肝: 1 ng/mL 前後 疾患肝: 正常レベル~数十倍
2 抗 HGF 抗体固相プレートの前処理	抽出液	200 μ L	20~30°C 10 分間 振盪
3 洗浄		5 回繰り返す	
4 標準液 又は検体の添加	HGF 標準液 検体 検体希釈液 (イムニス) 検体希釈液 H	50 μ L — — 50 μ L	— 50 μ L 50 μ L —
5 第 1 次反応		20~30°C 1 時間 振盪	
6 洗浄		5 回繰り返す	
7 酵素標識モノクローナル抗体の添加	酵素標識モノクローナル抗体	100 μ L	100 μ L
8 第 2 次反応		20~30°C 1 時間 振盪	
9 酵素基質液の調製		(第 2 次反応終了 約 15 分前)	
10 洗浄		5 回繰り返す	
11 酵素基質液の添加	酵素基質液 (発色剤含有)	100 μ L	100 μ L
12 酵素反応		20~30°C 30 分間 暗所 静置	
13 反応停止液の添加	反応停止液	50 μ L	50 μ L
14 測定		吸光度主波長 492 nm 又は 490 nm (副波長 620 nm 以上)	
15 結果の判定			

Instruction Manual

HGF Extraction Reagent for use with IMMUNIS® HGF EIA

- Thoroughly read this instruction manual before use of this kit.
- This kit is intended for research use only.

I. General description

This kit is developed for extraction of human hepatocyte growth factor (hHGF) from the human tissues for determination with IMMUNIS® HGF EIA available as a separate kit. This kit is for research purpose only and should not be used for diagnostic applications.

II. Components

1. Extraction buffer 30 mL x 5 vials
2. Sample diluent H..... 15 mL x 1 vial
3. HGF standard solution 1 (0 ng/mL)0.5 mL x 1 vial
HGF standard solution 2 (0.3 ng/mL)0.5 mL x 1 vial
HGF standard solution 3 (1 ng/mL)0.5 mL x 1 vial
HGF standard solution 4 (3 ng/mL)0.5 mL x 1 vial
HGF standard solution 5 (6 ng/mL)0.5 mL x 1 vial
4. 20x concentrated washing solution25 mL x 1 vial
5. Plate seal..... 1 sheet

III. Components of IMMUNIS® HGF EIA required for determination of samples extracted from human tissues

1. Anti-HGF monoclonal antibody coated microplate (8 wells/strip x 12) .. 1 plate
2. Sample diluent 15 mL x 1 vial
3. Enzyme labeled monoclonal antibody..... 10 mL x 1 vial
4. Enzyme substrate30 mL x 1 vial
5. Color developer..... 4 tablets
6. Reaction stopper 6 mL x 1 vial
7. 20x concentrated washing solution 25 mL x 2 vials
8. Plate seal..... 3 sheets

IV. Reagents not provided but needed

1. Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)
2. Isopropyl alcohol

V. Preparation of extraction reagents

1. Preparation of 100 mM PMSF solution

- 1) Dissolve 17.4 mg of PMSF in 1 mL of isopropyl alcohol.

2. Addition of 100mM PMSF solution

- 1) Add 0.3mL of 100 mM PMSF into 30 mL of Extraction buffer and mix. (final concentration of PMSF should be 1 mM)
- 2) Add 0.15 mL of 100 mM PMSF into 15 mL of Sample diluent H and mix. (final concentration of PMSF should be 1 mM)

Note: Prepare a sufficient volume of those reagents shown above before use.

VI. Preparation of a tissue sample for extraction of hHGF

1. Sample weight measurement

- 1) Place a sample tissue section on a sheet of non-absorbent material such as aluminum foil and weigh. Use a micro balance when the sample is small in size and weighs several milligrams only.
- 2) Transfer the sample to a polypropylene or polyethylene vessel.
Note: Do not use a glass vessel as HGF adsorbs easily on the glass surface.
- 3) Cut tissue samples into as much small pieces as possible when they weigh more than 20 mg. (Use scissors to cut samples. Wash tissue samples and tissue exudates adhered to the scissors into Extraction buffer, when the buffer is added to the sample.)

2. Addition of Extraction buffer

- 1) Add to samples 5 ~ 100 volumes of Extraction buffer per tissue sample weight.
(1 volume: 1 μ L of Extraction buffer / 1 mg of a tissue sample.)
- 2) Adjust the volume of Extraction buffer in the range of 5 to 100 volumes depending on the size of tissue samples. 5 to 100 volumes assure the same extraction efficiency.
Refer to the table [Examples of extraction] below.

3. Extraction.

- 1) Homogenize by a homogenizer the mixture of a tissue sample and Extraction buffer prepared above. Select the optimum extraction method for the size of a sample.

[Examples of the extraction method]

- Tissue samples weighing less than 5 mg: Homogenizer
Note: Do not use a homogenizer made of glass. (Combination of an Eppendorf micro test tube and a micro pestle will serve the purpose.)
- Tissue samples weighing 5 mg or over: Sonicator (with a micro tip and on ice).
- Tissue samples weighing 1 g or over: Polytron (on ice).

Note: HGF is thermally unstable. When a Sonicator or Polytron is used, homogenize on ice.

- 2) Centrifuge the extracted mixture at 15,000 rpm for 30 min. (A table top centrifuge will do.)
It is desirable to centrifuge the sample at 4°C. If this is not possible, centrifuge it at the room temperature. (When the tissue sample weighs less than 10 mg, it can be centrifuged at 15,000 rpm for 5 min as the volume of the residual tissue is small.)

4. Recovering of hHGF

- 1) Recover the intermediate layer without mixing it with the top lipid layer or the bottom tissue layer.

Note: Do not use a glass vessel for recovery of the sample. Use a polypropylene or polyethylene vessel.

[Examples of extraction]

Tissue weight	Extraction buffer vol.	Examples		
		Tissue weight	Extraction buffer vol.	
1 ~ 5 mg (Biopsy sample weight)	100 ~ 200 volume	1 mg 5 mg	200 μ L 500 μ L	Homogenizer or Sonicator (with micro tip and on ice)
5 ~ 50 mg	10 ~ 100 volume	5 mg 50 mg	500 μ L 500 μ L	Sonicator (with micro tip and on ice)
50 ~ 100 mg	5 ~ 10 volume	50 mg 100 mg	500 μ L 500 μ L	Sonicator (with micro tip and on ice)
100 mg or over	5 volume	100 mg 1 g	500 μ L 5 mL	Sonicator (on ice) Polytron (on ice)

- (1) For determination of HGF in crude extract solution, 50 μ L (for n=1 determination) or 100 μ L (for n=2 determination) is required.
- (2) 500 μ L is the optimum volume for extraction by a homogenizer or sonicator (with a micro tip).
- (3) The HGF concentration of 1 mg of a tissue sample extracted in 100 μ L of Extraction buffer is roughly 1 ng/mL for a normal liver and the same to several ten times higher than a normal liver level for livers with disorder.
- (4) Taking into consideration the above factors, select the volume of Extraction buffer to be added.

Note: When HGF is extracted from a large tissue sample, contact us for our recommendation.

VII. Operation

1. Preparation of reagents (for the component of IMMUNIS® HGF EIA)

- 1) Enzyme substrate solution (containing the color developer)
Add one tablet of Color developer into 3 mL of Enzyme substrate and leave the solution in a dark place. Thoroughly mix the solution after the Color developer is dissolved completely. Prepare a sufficient volume of this solution to cover all wells to be used for the test. This solution must be prepared 15 minutes before use and used up within 60 min.
- 2) Washing solution
Dilute 20x concentrated washing solution 20 times with purified water. Keep this solution at 2 ~ 10°C.

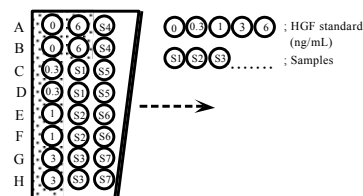
2. Materials required but not provided

- 1) Micropipettes, 50 μ L and 100 μ L
- 2) A measuring pipette, 10 mL
- 3) A measuring cylinder, 1 L
- 4) A microplate shaker
- 5) An aspirator and a polypropylene washing bottle, or a microplate washer
- 6) A dark box (A light tight cupboard or drawer will do.)
- 7) A microplate reader (main wavelength 492 nm or 490 nm, sub wavelength 620 nm or longer)

3. Assay procedure (Use IMMUNIS® HGF EIA)

It is desirable to test the same sample twice. Bring all kit reagents to 20 ~ 30°C before use.

For each test, determine the HGF standard solution (2 wells x 5 concentrations) as illustrated.



- 1) Preliminary dilution of samples
Dilute as required the extracted samples with Extraction buffer. When HGF in 1 mg of a tissue sample is extracted in 100 μ L of Extraction buffer, HGF concentration is roughly as follows.
- Normal liver: 1 ng/mL
- Liver with disorder: Same as a normal liver to several ten times higher than a normal liver.
- 2) Pre-treatment of the anti-HGF coated microplate
Pipette 200 μ L each of Extraction buffer in the wells for determination of the HGF standard solution and samples and cover them with the plate seal provided. Set the microplate on a microplate shaker and shake it for 10 min at 20 ~ 30°C.

- 3) Washing
Remove the plate seal and suck out the well contents by an aspirator. Wash all wells 5 times with the washing solution prepared under "2) Washing solution" in "1. Preparation of reagents", using polyethylene washing bottle, or a microplate washer. Then tap the microplate upside down on a clean paper towel. Then tap the microplate upside down on a clean paper towel.

Note: Exert extreme care not to dry inside the wells. Follow the next step immediately after washing is completed.

- 4) Dispensation of samples and the HGF standard solutions

	HGF standard solution (of HGF Extraction Reagent)	Extracted samples	Diluent	
			Sample diluent (of IMMUNIS® HGF EIA)	Sample diluent H (of HGF Extraction Reagent)
Determination of the standard solution	50 µL	--	--	50 µL
Determination of samples	--	50 µL	50 µL	--

HGF Standard solution: Use 5 standard concentrations of 0, 0.3, 1, 3 and 6 ng/mL in this reagent.

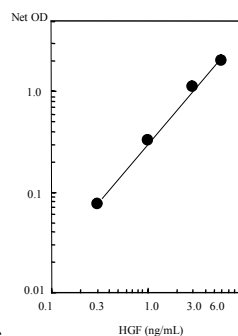
After the primary reaction, follow the instructions described in the instruction manual of the IMMUNIS® HGF EIA.

- 5) Primary reaction
Cover the microplate with the plate seal provided and shake the microplate on a microplate shaker at 200 ~ 700 rpm for 1 hr at 20 ~ 30°C.
- 6) Washing
Repeat the procedure 3) above to wash the microplate wells.
- 7) Addition of Enzyme labeled monoclonal antibody.
Pipette 100 µL of Enzyme labeled monoclonal antibody to each well.
- 8) Secondary reaction
Cover the microplate with the plate seal and shake the microplate on a microplate shaker for 1 hr at 20 ~ 30°C.
- 9) Preparation of Enzyme substrate solution
Approximately 15 min before the end of the secondary reaction, prepare the enzyme substrate solution (containing the color developer) according to the instructions given in 1) under "1. Preparation of reagents".
- 10) Washing
Repeat the procedure 3) above to wash the microplate wells.
- 11) Addition of the enzyme substrate solution
Pipette 100 µL of the enzyme substrate solution (containing the color developer) prepared in 9) above to each well.
- 12) Enzyme reaction
Cover the microplate with new plate seal and leave the microplate at 20 ~ 30°C in the dark for 30 min.
- 13) Addition of Reaction stopper
Remove the plate seal and stop color development by adding 50 µL of Reaction stopper in all wells, and mix sufficiently.
- 14) Absorbance measurement
Measure absorbance of each well at 492 nm or 490 nm. When a dual wavelength microplate reader is used, set the reference wavelength at 620 nm or longer. Absorbance must be measured within 2 hrs after stopping the enzyme reaction.

VIII. Determination

1. Validation of assay and calculation of the specific absorbance (Net OD).

- Make sure that absorbance of the HGF standard solution 1 (0 ng/mL) is less than 0.050.
- Calculate the mean value of the 2 absorbance readings of the HGF standard solution 1. If either of the reading is 0.050 or more, disregard that reading and use the other reading. When both readings are 0.050 or more, assay is void and should be repeated again.
- Subtract the mean absorbance reading (or one reading) of the HGF standard solution 1 from the reading of each well to calculate the Net OD.



2. Preparation of the calibration curve by HGF standard solution

- Using the logarithmic scales, prepare a calibration curve by plotting concentration of the standard solution on the X axis and Net OD on the Y axis.

3. Calculation of HGF concentration

- Apply the Net OD of each sample to the calibration curve and read HGF concentration.
- When absorbance of samples exceeds 6 ng/mL (the highest concentration of the HGF standard solution), dilute samples and determine again.

4. Calculation of the amount of HGF per tissue weight

$$\text{Amount of HGF/organ weight (ng/mg)} = \frac{\text{HGF concentration (ng/mL)} \times \text{Preliminary sample dilution folds} \times \text{Amount of added Extraction buffer (mL)}}{\text{Organ weight (mg)}}$$

IX. Warnings and precautions

This kit must be used according to the instructions and for the purpose described in this manual. No result is guaranteed in any use or for any purpose other than those described in this manual.

1. General precautions

- Do not use expired reagents.
- Do not use reagents of different production lots.
- Extraction buffer and Sample diluent H of this kit are not identical to those of **HGF Extraction buffer for Mouse & Rat HGF** or **Rat HGF EIA**, and should not be used with those reagents.
- Vials and tools provided should not be used for other purposes.

2. Operational precautions

- Check accuracy of tools and properly use them according to their instructions.
- Do not make react with any other enzyme immuno assay system using color developers contain organic sorbent, such as Tetramethylbenzidine. The reaction of OPD may be inhibited and it may affect the results.

3. Handling precautions

- All samples should be handled as if they were capable of transmitting HBV, HCV and/or HIV and all tools must be immersed in and sterilized with 0.1% sodium hypochlorite.
- Avoid contact of reagents. If they contact skin, wash with plenty of water. Get medical care if necessary.
- Sample diluent H and HGF standard solution contain sodium azide and should be washed down with a sufficient volume of water to prevent formation of explosive metal azide.
- When reagents or tools are discarded, it should be handled and disposed according to the instruction manual of IMMUNIS® HGF EIA. Spills of samples or reagents should be handled as same.

X. Storage and shelf life

Store the kit at 2 ~ 10°C and avoid freezing. This kit is stable for 1 year after the date of manufacture. Validity of kit is shown in the package.

XI. Package

1 kit for 96 tests Code No. 1Z72

XII. Reference

- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A : Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* **122** : 1450-1459, 1984.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, et al : Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342** : 440-443, 1989.
- Nakamura T : Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res* **3** : 67-85, 1991.
- Yamada A, Matsumoto K, Iwanari H, et al : Rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of HGF in rat and human tissues. *Biomed Res* **16** : 105-114, 1995.

Assay procedure and well arrangement

Well Arrangement		Reagents	HGF standard 1A - 1H, 2A - 2B	Samples 2C - 12H
1	Preliminary dilution of samples	Extraction buffer	--	Rough HGF concentration in extracted samples Normal : 1 ng/mL Disorder : 1 ng/mL to ten times
2	Pre-treatment of the anti-HGF coated microplate	Extraction buffer	200 µL for 10 min at 20 ~ 30°C, shaking	
3	Washing	5 times		
4	Addition of HGF standard solution and samples	HGF standard Sample Sample diluent of IMMUNIS® Sample diluent H	50 µL -- -- 50 µL	-- 50 µL 50 µL --
5	Primary reaction	for 1 hr at 20 ~ 30°C, shaking		
6	Washing	5 times		
7	Addition of Enzyme labeled antibody	Enzyme labeled monoclonal antibody	100 µL	100 µL
8	Secondary reaction	for 1 hr at 20 ~ 30°C, shaking		
10	Washing	5 times		
11	Addition of Enzyme substrate solution	Enzyme substrate solution (containing the color developer)	100 µL	100 µL
12	Enzyme reaction	for 30 min at 20 ~ 30°C in the dark		
13	Addition of Reaction stopper	Reaction stopper	50 µL	50 µL
14	Absorbance measurement	492 nm or 490 nm		

Manufactured and sold by;

Institute of Immunology Co., Ltd.

1-1-10, Koraku, Bunkyo-Ku,
Tokyo 112-0004, JAPAN
Tel : +81-3-3814-4081
Fax : +81-3-3814-5957

June, 2012