

マウス HGF EIA

96 テスト用

EIA 法によるマウス HGF 測定用キット

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。

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を用いた研究が行われています。

本製品はマウス HGF を測定する研究用試薬です。キットに添付のマウス HGF の標準品を基準に定量的にマウス 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 HGF モノクローナル抗体固相プレート (8 ウェル×12)1 枚
(抗 HGF マウスモノクローナル抗体)
- * 2. マウス HGF 標準液 (HGF 標準液)5 本
(0, 1, 3, 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 HGF ウサギ抗体10 mL×1 本
(抗 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10 mL×1 本
(TMB)
- * 8. 反応停止液10 mL×1 本
9. 洗浄原液 (20 倍濃縮液)25 mL×3 本
- * 10. プレートシール (付属品)4 枚

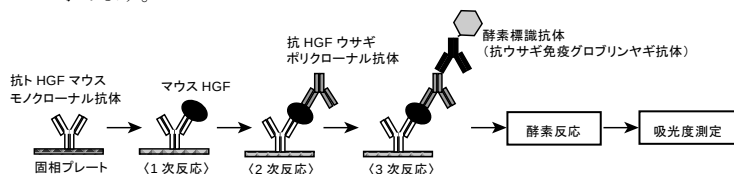
【使用目的】

マウス肝細胞増殖因子 (マウス 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、マウス HGF と強く交差反応するモノクローナル抗体 (以下抗 HGF マウスモノクローナル抗体と呼びます) と、抗 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 HGF マウスモノクローナル抗体と被検検体中のマウス 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マウス HGF と抗 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 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、検体中のマウス 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。

マウス HGF 標準液を用いて検量線を作成し、検体のマウス HGF 値を求めます。



【操作方法】

* 1. 試薬の調製方法

(1) 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℃で保存してください。

* 2. 必要な器具・器材

- (1) マイクロピペット 50 μL, 100 μL
- (2) メスシリンダー 1 L
- (3) アスピレーター及びびり洗浄瓶又はマイクロプレートウォッシャー
- (4) 暗箱 (暗い戸棚又は引き出しでも可)
- * (5) マイクロプレートリーダー (主波長 450 nm、副波長 620 nm 以上)

3. 測定操作方法

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。

臓器抽出検体等の高塩濃度検体: A 法

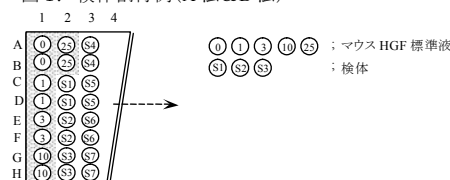
血漿等の低塩濃度検体: B 法

- 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。
- マウス HGF は血小板に高濃度に存在します。採血時又は、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℃で保存してください。
- 測定に使用した試薬は、使用后 2~10℃で保存してください。検体は-20℃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℃に戻してください。
- 図 1, 2 に示したように、測定ごとにマウス 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。

** 図 1. 検体割付例 (A 法 & B 法)



(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。

測定は通常 2 連で行います。

プレートのマウス HGF 標準液用ウェルに 検体希釈液 H を 50 μL ずつ入れて、更に各標準液 (0, 1, 3, 10, 25 ng/mL) を 50 μL 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 μL ずつ入れ、更に検体を 50 μL ずつ加えます。

* 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。

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 μL ずつ入れます。マウス HGF 標準液用ウェルに各標準液 (0, 1, 3, 10, 25 ng/mL) を 50 μL ずつ加え、検体用ウェルには同じく検体を 50 μL ずつ加えます。

(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「1. 試薬の調製方法 (1)」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 HGF ウサギ抗体の添加

全ウェルに抗 HGF ウサギ抗体を 100 μL 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 μL 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) 洗浄

(3)と同じ手順でプレート洗浄します。

* (10) 酵素基質の添加

酵素基質を全ウェルに 100 μ L ずつ入れます。

* (11) 酵素反応

プレートシールを貼り、プレートを暗所に入れて、15~30℃で 30 分間静置します。

* (12) 反応停止液の添加

プレートシールをはがし、全ウェルに反応停止液 100 μ L を加えてよく混合します。

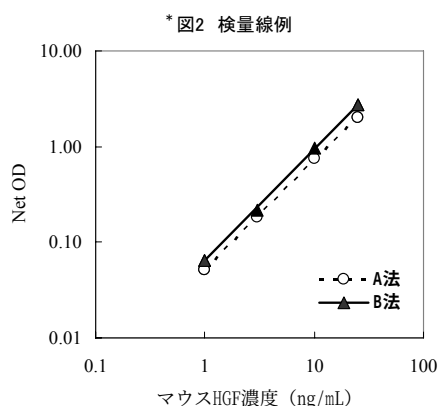
* (13) 吸光度の測定

マイクロプレートリーダー(主波長 450 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、30 分以内に測定してください。

【測定結果の判定法】

1. マウス HGF 標準液による検量線の作成

- (1) マウス HGF 標準液各濃度の吸光度—マウス 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 2 の様な直線が得られます。



2. 検体のマウス 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—マウス 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、マウス HGF 値を読みとります。

**【使用上又は取扱上の注意事項】

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

- (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使用しないでください。(ただし、マウス 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) マウス 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) 酵素反応の停止後、30 分以内に吸光度を測定してください。
- (5) 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) 試薬は皮膚や粘膜に接触させないでください。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。必要があれば医師の手当等を受けてください。
- (2) 検体希釈液には 0.1%アジ化ナトリウムが含有されており、反応停止液は酸性なので、廃棄の際には十分注意して多量の水道水を流しながら行ってください。
- (3) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規制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℃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 テスト用 CODE:1Z85

【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 —A 法— (高塩濃度検体)

手順		試薬	標準液用ウェル (1A~1H, 2A~2B)	検体用ウェル (2C~12H)
1	マウス HGF 標準液 又は検体の添加	マウス HGF 標準液	50 μ L	—
		検体希釈液 L	—	50 μ L
		検体希釈液 H	50 μ L	—
2	1 次反応	15~30℃ 20 時間 静置		
3	洗浄	5 回繰り返し		
4	抗 HGF ウサギ 抗体の添加	抗 HGF ウサギ抗体	100 μ L	100 μ L
5	2 次反応	15~30℃ 2 時間 静置		
6	洗浄	5 回繰り返し		
7	酵素標識抗体の添加	酵素標識抗体	100 μ L	100 μ L
8	3 次反応	15~30℃ 2 時間 静置		
9	洗浄	5 回繰り返し		
10	酵素基質の添加	*酵素基質	100 μ L	100 μ L
11	酵素反応	15~30℃ 30 分間 暗所 静置		
12	反応停止液の添加	反応停止液	*100 μ L	*100 μ L
13	測定	*吸光度 主波長 450 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 (1A~1H, 2A~2B)	検体用ウェル (2C~12H)
1	マウス HGF 標準液 又は検体の添加	マウス HGF 標準液	50 μ L	—
		検体希釈液 L	—	50 μ L
		検体希釈液 H	50 μ L	—
2	1 次反応	15~30℃ 20 時間 静置		
3	洗浄	5 回繰り返し		
4	抗 HGF ウサギ 抗体の添加	抗 HGF ウサギ抗体	100 μ L	100 μ L
5	2 次反応	15~30℃ 2 時間 静置		
6	洗浄	5 回繰り返し		
7	酵素標識抗体の添加	酵素標識抗体	100 μ L	100 μ L
8	3 次反応	15~30℃ 2 時間 静置		
9	洗浄	5 回繰り返し		
10	酵素基質の添加	*酵素基質	100 μ L	100 μ L
11	酵素反応	15~30℃ 30 分間 暗所 静置		
12	反応停止液の添加	反応停止液	*100 μ L	*100 μ L
13	測定	*吸光度 主波長 450 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

Instruction Manual

Mouse HGF EIA

Mouse HGF determination kit by EIA

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

I. General Description

Hepatocyte growth factor (HGF), which is a potent growth factor as a trigger for liver regeneration, act as accelerator for growth of various cells not only hepatocyte but also epithelial cells, endothelial cells, and some of mesenchymal tissue. Several studies have reported that HGF had correlation with tumor progression. It also established that HGF enhanced the motility of various types of cells, induced morphogenesis and tubule formation, and controlled the immune response, and many researchers have studied using mice or rats.

This kit is developed for determination of mouse hepatocyte growth factor (mouse HGF) for research purposes. Mouse HGF can be determined quantitatively using the mouse HGF standard solution provided with this kit.

This kit also cross reacts with human HGF but its cross reactivity is about 4%.

II. Kit components

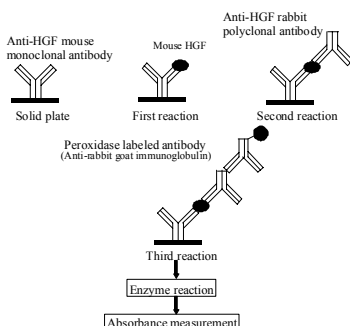
1. Solid phase microplate (8 wells/strip x 12) 1 plate
(Coated with anti-HGF monoclonal antibody)
2. Mouse HGF standard solution 5 vials
(1 vial each of 0, 1, 3, 10 and 25 ng/mL standard concentration: 0.5 mL/vial)
3. Sample diluent L, low salt concentration 15 mL x 1 vial
4. Sample diluent H, high salt concentration 15 mL x 1 vial
5. Anti-HGF rabbit antibody 10 mL x 1 vial
(Anti-HGF rabbit polyclonal antibody)
6. Enzyme labeled antibody 10 mL x 1 vial
(Peroxidase labeled anti-rabbit goat immunoglobulin)
7. Enzyme substrate 10 mL x 1 vial
(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine)
8. Reaction stopper 10 mL x 1 vial
9. 20x concentrated washing solution 25 mL x 3 vials
10. Plate seal 4 sheets

III. Application

Determination of mouse hepatocyte growth factor (mouse HGF)

IV. Assay principle

The detection system of this kit is of a sandwich configuration based on enzyme immuno assay consisting of three steps of antigen-antibody reaction between a monoclonal antibody raised against genetically engineered human HGF and most cross-reactive with mouse HGF (anti-HGF mouse monoclonal antibody), mouse HGF in samples, anti-HGF rabbit antibody and anti-rabbit goat immunoglobulin, followed by color development by enzyme reaction. The 1st reaction takes place between the anti-HGF mouse monoclonal antibody immobilized on a solid phase microplate and mouse HGF in samples; the 2nd reaction between mouse HGF in samples bound to the solid plate antibody and anti-HGF rabbit polyclonal antibody, and the third reaction between the enzyme labeled antibody (peroxidase labeled anti-rabbit goat immunoglobulin) and the anti-HGF rabbit polyclonal antibody. After the third reaction, color proportional to the mouse HGF concentration is developed by enzyme reaction and its absorbance is measured for the determination of mouse HGF on a calibration curve prepared using the mouse HGF standard solution.

**V. Operation****1. Preparation of reagent**

- 1) Washing solution
Dilute 20x concentrated washing solution 20 times with purified water. Keep this solution at 2 ~ 10°C after preparation.

2. Materials required but not provided

- 1) One each of micro pipettes, 50 µL and 100 µL
- 2) A measuring cylinder, 1 L
- 3) An aspirator and a polyethylene washing bottle, or a microplate washer
- 4) A dark box (A light tight cupboard or a drawer will do.)
- 5) A microplate reader capable of reading wavelength at 450 nm (reference wavelength at 620 nm or longer)

3. Assay procedure

For the determination of samples^{*1} in high salt concentration buffer, for example, extraction from organs, follow the instruction for high salt concentration samples (**Method A**), and for samples in low salt concentration buffer, for example, plasma^{*2}, follow the instruction for low salt concentration samples (**Method B**). Refer to **Appendix 1** for extraction HGF in the tissue sample, or and **Appendix 2** for purification of it.

Samples which may show absorbance beyond the calibration curve should be diluted with the sample diluent before assay.

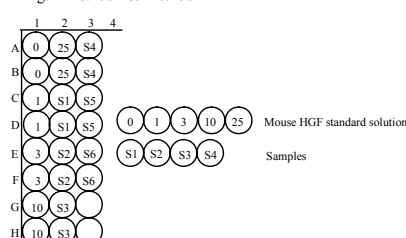
*1: Keep samples in plastic vials such as polyethylene and polypropylene. Do not use glass vials.

*2: Platelet is rich with mouse HGF and can be easily damaged during isolation of plasma. To prevent mixture with platelet derived HGF, isolate plasma with absolute care to minimize damage of platelet.

Note:

- Solid phase microplate consists of 12 detachable 8-well strips. Repack in the aluminum pouch unused strips together with desiccant and seal it for storage at 2 ~ 10°C.
- While in use, Mouse HGF standard solution should be maintained at the ice cold water temperature and all reagents should be stored at 2 ~ 10°C after use. Samples should be stored frozen (-20°C or below).
- Return the kit to 15 ~ 30°C before use.
- As illustrated in **Fig.1**, using 2 wells for each standard concentration, measure absorbance of Mouse HGF standard solutions in each assay (2 wells x 5 different standard concentration).

Fig.1 Method A & Method B

**1) Adding samples****(1) High salt concentration samples (Method A)**

If sample dilution is required, dilute with Sample diluent H before assay.

Add 50 µL each of Sample diluent H in the wells for the standard solution (10 wells) and add 50 µL of each Mouse HGF standard solution (concentration 0, 1, 3, 10, and 25 ng/mL), 2 wells for each concentration.

Add 50 µL each of Sample diluent L in sample wells and add 50 µL each of samples, 2 wells for each sample.

(2) Low salt concentration samples (Method B)

If sample dilution is required, dilute with Sample diluent L before assay.

Add 50 µL each of Sample diluent L in all standard solution and sample wells. Add 50 µL of each Mouse HGF standard solutions (concentration 0, 1, 3, 10, and 25 ng/mL) and samples in respective wells, 2 wells for each standard solution and sample.

2) 1st reaction

Cover the microplate with the plate seal provided and leave the microplate to stand at 15 ~ 30°C for 20 hrs (16 ~ 24 hrs).

3) Washing

Remove the plate seal and suck out the well content with an aspirator.

Using a polyethylene washing bottle, fill wells with the washing solution prepared in **1) Washing solution of "1. Preparation of reagent"**. Hold the microplate upside down and vigorously shake out the washing solution. After repeating this washing 5 times, gently tap the plate surface on paper towel to remove the washing solution.

Note: While washing the microplate wells, do not dry the inner wall of wells.

As soon as washing is over, immediately follow the next steps.

4) Addition of Anti-HGF rabbit antibody

Add 100 µL each of Anti-HGF rabbit antibody in all wells.

5) 2nd reaction

Cover the microplate with the plate seal provided. Leave the microplate to stand at 15 ~ 30°C for 2 hrs.

6) Washing

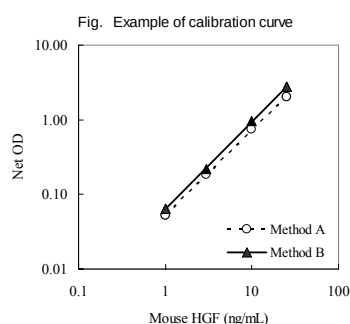
Repeat the procedure **3)** above to wash the microplate wells.

- 7) Addition of Enzyme labeled antibody
Add 100 μ L each of Enzyme labeled antibody in all wells.
- 8) 3rd reaction
Cover the microplate with the plate seal provided. Leave it to stand at 15 ~ 30°C for 2 hrs.
- 9) Washing
Repeat the procedure 3) above to wash the microplate wells.
- 10) Addition of Enzyme substrate
Add 100 μ L each of Enzyme substrate in all wells.
- 11) Enzyme reaction
Cover the microplate with the plate seal provided. Leave the microplate to stand at 15 ~ 30°C in the dark for 30 min.
- 12) Addition of the Reaction stopper
Remove the plate seal and add 100 μ L each of Reaction stopper in all wells and thoroughly mix.
- 13) Absorbance measurement
Measure absorbance of each well by a microplate reader (wavelength 450 nm). When a dual wavelength microplate reader is used, set the reference wavelength at 620 nm or longer. Absorbance must be measured within 30 min after stopping the enzyme reaction.

VI. Determination

1. Preparation of the calibration curve by Mouse HGF standard solution

- 1) Calculate (mean absorbance of the respective concentration of Mouse HGF standard solution - mean absorbance of 0 ng/mL of Mouse HGF standard solution) (Net OD).
- 2) Plot on logarithmic scales Net OD of the respective concentration.



2. Calculation of the mouse HGF in samples

- 1) When absorbance of samples exceeds that of maximum concentration of Mouse HGF standard solution, dilute samples and repeat the assay again.
- 2) Calculate (mean absorbance of samples - mean absorbance of 0 ng/mL concentration of Mouse HGF standard solution) (Net OD).
- 3) Apply the values calculated in 2) above to the calibration curve and determine mouse HGF concentration of samples.

VII. 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

- 1) Make sure to return the kit to the 15 ~ 30°C before use.
- 2) Do not mix up kit components of different production lots. (Mouse HGF standard solution carries a different lot number from other components in the kit.)
- 3) Assay strictly as instructed.
- 4) Do not use expired reagents.
- 5) Avoid contamination of the kit reagents with microorganisms.
- 6) Thoroughly wash equipment used for the assay and rinse them with purified water.
- 7) Replace micropipette tips for each sample and reagent.

2. Operational precautions

- 1) Measure absorbance of Mouse HGF standard solution for each assay.
- 2) Once assay is started, complete it within the prescribed time and allow the same length of reaction time for Mouse HGF standard solution and samples.
- 3) Make sure that all reactions take place at 15 ~ 30°C.
- 4) Measure absorbance within 30 min after stopping the enzyme reaction.
- 5) Do not scrape the microplate or touch the bottom of wells. Do not dry the surface of the wells during assay.

3. Handling precautions

- 1) Avoid contact of reagents. If they contact skin, wash with plenty of water. Get medical care if need.
- 2) When discarding Sample diluent and Reaction stopper, run sufficient volume of tap water, as Sample diluent contains 0.1% sodium azide and Reaction stopper is acidic.

- 3) Dispose of container and unused contents in accordance with federal, state and local requirements.

VIII. Storage and shelf life

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

IX. Package

1 kit for 96 tests Code No. 1Z85

Assay Procedures and Well Arrangement

Method A - High salt concentration samples

Well Arrangement		Reagents	HGF standard 1A - 1H, 2A - 2B	Samples 2C ~ 12H
1	Addition of the HGF standard solutions and samples	Mouse HGF standard solution Sample* Sample diluent L Sample diluent H	50 μ L -- -- 50 μ L	-- 50 μ L 50 μ L --
2	1st reaction	20 hrs at 15 ~ 30°C		
3	Washing	5 times		
4	Addition of Anti-HGF rabbit antibody	Anti-HGF rabbit antibody	100 μ L	100 μ L
5	2nd reaction	2 hrs at 15 ~ 30°C		
6	Washing	5 times		
7	Addition of Enzyme labeled antibody	Enzyme labeled antibody	100 μ L	100 μ L
8	Third reaction	2 hrs at 15 ~ 30°C		
9	Washing	5 times		
10	Addition of Enzyme substrate	Enzyme substrate	100 μ L	100 μ L
11	Enzyme reaction	30 min in the dark at 15 ~ 30°C		
12	Addition of Reaction stopper	Reaction stopper	100 μ L	100 μ L
13	Absorbance measurement	450 nm		
14	Determination			

*Sample or sample diluted with Sample diluent H.

Method B - Low salt concentration samples

Well Arrangement		Reagents	HGF standard 1A - 1H, 2A - 2B	Samples 2C ~ 12H
1	Addition of the HGF standard solutions and samples	Mouse HGF standard solution Sample* Sample diluent L	50 μ L -- 50 μ L	-- 50 μ L 50 μ L
2	1st reaction	20 hrs at 15 ~ 30°C		
3	Washing	5 times		
4	Addition of Anti-HGF rabbit antibody	Anti-HGF rabbit antibody	100 μ L	100 μ L
5	2nd reaction	2 hrs at 15 ~ 30°C		
6	Washing	5 times		
7	Addition of Enzyme labeled antibody	Enzyme labeled antibody	100 μ L	100 μ L
8	Third reaction	2 hrs at 15 ~ 30°C		
9	Washing	5 times		
10	Addition of Enzyme substrate	Enzyme substrate	100 μ L	100 μ L
11	Enzyme reaction	30 min in the dark at 15 ~ 30°C		
12	Addition of Reaction stopper	Reaction stopper	100 μ L	100 μ L
13	Absorbance measurement	450 nm		
14	Determination			

*Sample or sample diluted with Sample diluent L.

Manufacturer 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