

**FUJIFILM****Wako**

Code No. 292-85501

## Human Chromogranin A ELISA Kit Wako

«For Research Use Only»

### [1. Introduction]

Chromogranin A (CgA) is an acidic glycoprotein originally isolated from the chromaffin granules of the adrenal medulla. Human CgA consists of 439 amino acids. CgA is widely distributed in the endocrine and nervous systems, with particularly high levels in the adrenal medulla and pituitary gland. CgA coexists and is co-released with catecholamines and correlates with the secretion of catecholamines in the blood. Thus, CgA can be used as a biomarker of the activity of the sympathetic-adrenal system, making immunodetection of CgA in the blood extremely important. Blood CgA levels in patients with neuroendocrine tumors, especially pheochromocytomas and pituitary tumors, are markedly higher than in healthy individuals. CgA is also present in the submandibular duct and is released into saliva upon stimulation of the autonomic nervous system, making salivary CgA a new biomarker of mental stress. Thus, plasma CgA can be used as a biomarker of tumor, and salivary CgA as a biomarker of mental stress.

This ELISA kit is designed for the measurement of CgA in human plasma and saliva.

### [2. Kit Performance]

Calibration curve range	0.14-33.33 pmol/mL
Sample	Human plasma, human saliva
Sample amount required	50 $\mu$ L (n=2)
Assay time	O/N + 2.5 hours
Intra-assay CV (%)	CV < 14%
Inter-assay CV (%)	CV < 16%

### [3. Materials supplied]

Components	State	Amount
Antibody-coated Plate	Use after washing	96 wells (8 $\times$ 12)/plate
Chromogranin A Standard	Lyophilized product, use after reconstitution	1 vial
Biotin-conjugated Chromogranin A	Lyophilized product, use after reconstitution	1 vial
Anti-Human Chromogranin A Antibody	Lyophilized product, use after reconstitution	1 vial
Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Ready-to-use	12 mL $\times$ 1 vial
Substrate Buffer	Use after preparation	25 mL $\times$ 1 vial
OPD tablet	Use after preparation	2 tablets
Stop Solution	Ready-to-use	12 mL $\times$ 1 vial
Buffer (5 $\times$ )	Use after preparation	12 mL $\times$ 1 vial

— 1/12 —

Components	State	Amount
Wash Solution (20 $\times$ )	Use after preparation	50 mL $\times$ 1 vial
Plate Seal	Ready-to-use	3 sheets
Instruction Manual	—	1 copy

### [4. Assay Principle]

Goat anti-rabbit IgG antibody is immobilized in each well of the assay plate. The standard solutions or samples, labeled antigen (Biotin-conjugated Chromogranin A), and Anti-Human Chromogranin A Antibody are sequentially added in the wells to allow for competitive binding. Next, Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution is added. Finally, the concentrations of CgA in the samples can be determined by measuring the peroxidase activity in the wells.

Human CgA\* synthetic peptide is used as the antigen.

\*Human CgA (344-374) :

E-E-E-D-N-R-D-S-S-M-K-L-S-F-R-A-R-A-Y-G-F-R-G-P-G-P-Q-L-R-R

### [5. Supplies and Equipment]

- Micropipettes and disposable tips (25 to 1,000  $\mu$ L) (8- or 12-channel pipettes are recommended.)
- Microplate reader which can read extinction 2.5 at 490 nm
- Microplate shaker or conventional shaker
- Test tubes for dilution of standard solutions and samples (glass or polypropylene)
- Microplate washer (For manual operation, a continuous dispenser, needle dispenser, and an aspirator, or vacuum pump are recommended)
- Graduated cylinder (1,000 mL)
- Distilled or deionized water

### [6. Reagent preparation]

The reagents in the kit must be brought to room temperature (20-30°C) before use (about 2 hours).

#### 6.1 Preparation of Standard Solution

Add 1 mL of the Buffer to the vial containing the standard and dissolve.

Take 0.1 mL of the standard stock solution and dilute with 0.2 mL of the Buffer to make a 33.33 pmol/mL standard solution. Repeat the same dilution procedure to prepare standard solutions of 11.11, 3.70, 1.23, 0.41, and 0.14 pmol/mL. For 0 pmol/mL standard solution, use the Buffer.

Concentration (pmol/mL)	Volume of standard solution	Buffer
33.33	Standard stock solution : 0.1 mL	0.2 mL
11.11	33.33 pmol/mL standard solution : 0.1 mL	0.2 mL
3.70	11.11 pmol/mL standard solution : 0.1 mL	0.2 mL
1.23	3.70 pmol/mL standard solution : 0.1 mL	0.2 mL
0.41	1.23 pmol/mL standard solution : 0.1 mL	0.2 mL
0.14	0.41 pmol/mL standard solution : 0.1 mL	0.2 mL
0 (Blank)	—	0.2 mL

— 2/12 —

#### 6.2 Biotin-conjugated Chromogranin A

Add 6 mL of distilled water to the vial containing Biotin-conjugated Chromogranin A and dissolve.

#### 6.3 Anti-Human Chromogranin A Antibody

Add 12 mL of distilled water to the vial containing Anti-Human Chromogranin A Antibody and dissolve.

#### 6.4 Substrate Solution

Add one OPD tablet to 12 mL of the Substrate Buffer and dissolve.

Note : Prepare immediately before the end of the 2-hour incubation after the addition of the Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution.

#### 6.5 Buffer (5×)

Dilute 10 mL of the Buffer (5×) with 40 mL of distilled water.

#### 6.6 Wash Solution (20×)

Dilute 50 mL (the whole amount) of the Wash Solution (20×) with 950 mL of distilled water.

○ Other reagents are ready to use.

### **[7. Assay Procedure]**

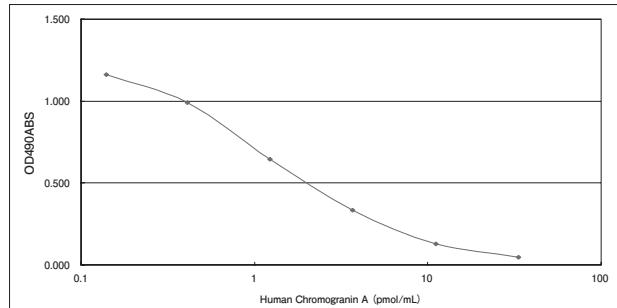
1. Bring the kit components to room temperature (20-30°C). Prepare Standard Solutions, Biotin-conjugated Chromogranin A, Anti-Human Chromogranin A Antibody, Buffer (5×) and Wash Solution (20×) as described above.
2. Add 350  $\mu$ L of the Wash Solution into each well and aspirate the solution. Alternatively, invert the plate, discard the buffer, and then remove the remaining buffer by blotting on a paper towel. Repeat this washing procedure further twice (total 3 times).
3. Add 50  $\mu$ L of the Buffer into each well, and add 25  $\mu$ L of standard solutions (0, 0.14, 0.41, 1.23, 3.70, 11.11, 33.33 pmol/mL) or samples. Add 50  $\mu$ L of Biotin-conjugated Chromogranin A and 100  $\mu$ L of Anti-Human Chromogranin A Antibody.
4. Cover with the plate seal and incubate overnight (16-20 hours) at room temperature with shaking (approximately 100 rpm).
5. After the reaction is complete, discard the solution from each well and wash as in step 2, 3 times in total.
6. Add 100  $\mu$ L of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution into each well.
7. Cover with the plate seal and incubate for 2 hours at room temperature with shaking (approximately 100 rpm).
8. Immediately before the end of the incubation in step 7, dissolve an OPD tablet in the Substrate Buffer to prepare the Substrate Solution.
9. Discard the solution from each well and wash as in step 2, 4 times in total.
10. Add 100  $\mu$ L of the Substrate Solution into each well and allow to stand in dark place for 30 minutes at room temperature.
11. Add 100  $\mu$ L of the Stop Solution to each well.

12. Measure the absorbance at 490 nm using a microplate reader.

13. Using commercially available software, create a standard curve from the measured values of each CgA standard solution using a 4 (or 5)-parameter or Log-Logit regression equation and determine CgA concentrations of the samples.

When using semi-log graph paper, plot the concentration of the standard solution on the x axis (log scale) and the absorbance of the standard solution at each concentration on the y axis (linear scale) to create a standard curve. Determine the CgA concentration that corresponds to the absorbance of each sample using the standard curve.

### **[8. Typical Standard Curve]**



### **[9. Precautions]**

1. Plasma and saliva samples should be assayed immediately. If samples cannot be assayed immediately after collection, they should be divided into small portions and stored frozen at -30°C or below. Avoid repeated freezing and thawing of samples.
2. In general, reagents should be freshly prepared. In particular, the standards, Biotin-conjugated Chromogranin A, and Anti-Human Chromogranin A Antibody should be used immediately after preparation. If the kit is used in portions, the prepared standards, Biotin-conjugated Chromogranin A, and Anti-Human Chromogranin A Antibody should be divided into small portions and stored frozen at -30°C or below.
3. Precipitates may form in the Wash Solution (20×) during storage. The precipitates will dissolve with dilution, and the quality will not be affected.
4. When diluting standard solution, be sure to use a new tip for each dilution step. Dispensing to each well should be performed accurately, as it affects the accuracy of the assay. When adding samples into wells, use a new tip for each sample and take care to avoid cross-contamination.
5. If the concentration of a sample exceeds 33.33 pmol/mL, dilute the sample with the Buffer in the kit and use for the assay.
6. Since the reaction efficiency of each reaction step will decrease if the assay plate is left standing, be sure to use a microplate shaker to shake the plate during the incubation (except for the chromogenic reaction). Shaking should be done slowly (about 100 rpm) to prevent splashing of the reaction solution on the plate seal.

7. All measurements should be performed in duplicate.
8. Absorbance should be measured immediately after the reaction is stopped.
9. The coloration level of the substrate may be slightly affected by the reaction temperature, time, degree of shaking of the assay plate, etc. Therefore, a standard curve must be prepared for each assay.
10. Avoid exposure to strong light during storage or use of each reagent.
11. Do not combine kits from different lots.

#### 【10. Measurement Examples】

##### Spiked Recovery Test

Plasma	Spiked CgA (pmol/mL)	Assay value (pmol/mL)	Recovery (%)
	0	0.54	—
	0.25	0.86	108.86
	1	1.93	125.32
	4	6.58	144.93

Saliva	Spiked CgA (pmol/mL)	Assay value (pmol/mL)	Recovery (%)
	0	0.47	—
	0.25	0.81	112.50
	1	1.40	95.24
	4	3.66	81.88

#### 【11. Assay Procedure Summary】

Ensure that you read the instruction manual and check the sample conditions, assay conditions, and assay procedure before beginning the assay.

<input type="checkbox"/>	Thoroughly equilibrate the plates and reagents to room temperature (20°C to 30°C) before use (approx. 2 hours)																								
<input type="checkbox"/>	Preparation of the reagents : Biotin-conjugated Chromogranin A : Add 6 mL of distilled water to dissolve the content. Anti-Human Chromogranin A Antibody : Add 12 mL of distilled water to dissolve the content. Buffer (5×) : Dilute 10 mL of the Buffer (5×) with 40 mL of distilled water. Wash Solution (20×) : Dilute 50 mL (the whole amount) of the Wash Solution (20×) with 950 mL of distilled water.																								
<input type="checkbox"/>	Preparation of standard solutions (example) : Add 1 mL of the Buffer to the vial containing CgA standard to dissolve the content. Dilute with the Buffer as below to prepare standard solutions of 33.33, 11.11, 3.70, 1.23, 0.41, and 0.14 pmol/mL.																								
Dilution example	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Concentration (pmol/mL)</th> <th>33.33</th> <th>11.11</th> <th>3.70</th> <th>1.23</th> <th>0.41</th> <th>0.14</th> <th>0</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Standard solution (mL)</td> <td>Original : 0.1</td> <td>0.1*</td> <td>0.1*</td> <td>0.1*</td> <td>0.1*</td> <td>0.1*</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>Buffer (mL)</td> <td>0.2</td> <td>0.2</td> <td>0.2</td> <td>0.2</td> <td>0.2</td> <td>0.2</td> <td>0.2</td> </tr> </tbody> </table> <p>* : Standard solution from preceding step</p>	Concentration (pmol/mL)	33.33	11.11	3.70	1.23	0.41	0.14	0	Standard solution (mL)	Original : 0.1	0.1*	0.1*	0.1*	0.1*	0.1*	—	Buffer (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Concentration (pmol/mL)	33.33	11.11	3.70	1.23	0.41	0.14	0																		
Standard solution (mL)	Original : 0.1	0.1*	0.1*	0.1*	0.1*	0.1*	—																		
Buffer (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2																		

<input type="checkbox"/>	<b>Assay plate with immobilized antibody</b>
<input type="checkbox"/>	↓ Wash 3 times.
<input type="checkbox"/>	<b>Buffer</b> 50 $\mu$ L
<input type="checkbox"/>	<b>Sample or Standard Solutions</b> 25 $\mu$ L
<input type="checkbox"/>	<b>Biotin-conjugated Chromogranin A Solution</b> 50 $\mu$ L
<input type="checkbox"/>	<b>Anti-Human Chromogranin A Antibody Solution</b> 100 $\mu$ L
<input type="checkbox"/>	↓ Cover with the plate seal and incubate overnight with shaking (16-20 hours, approximately 100 rpm) at room temperature.
<input type="checkbox"/>	↓ Wash 3 times.
<input type="checkbox"/>	<b>Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution</b> 100 $\mu$ L
<input type="checkbox"/>	↓ Cover with the plate seal and incubate for 2 hours at room temperature with shaking (approximately 100 rpm).
<input type="checkbox"/>	Immediately before the end of incubation, prepare Substrate Solution (dissolve one OPD tablet in 12 mL of the solvent for substrate).
<input type="checkbox"/>	↓ Wash 4 times.
<input type="checkbox"/>	<b>Substrate Solution</b> 100 $\mu$ L
<input type="checkbox"/>	↓ Allowed to stand for 30 minutes at room temperature.
<input type="checkbox"/>	<b>Stop Solution</b> 100 $\mu$ L
<input type="checkbox"/>	<b>Absorbance measurement (primary wavelength at 490 nm)</b>

#### 【Storage】

Store at 2-10°C

#### 【Expiration date】

Indicated on the label

#### 【Package】

96 reactions

#### FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshonachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan  
Telephone : +81-6-6203-3741  
Facsimile : +81-6-6201-5964  
<http://fk.fujifilm.co.jp>

<b>FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation</b>	<b>FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH</b>
1600 Bellwood Road Richmond, VA 23237 U.S.A. Telephone : +1-804-271-7677 Facsimile : +1-804-271-7791 <a href="http://www.wakousa.com">http://www.wakousa.com</a>	Fuggerstrasse 12 D-41468 Neuss Germany Telephone : +49-2131-311-0 Facsimile : +49-2131-311100 <a href="http://www.wako-chemicals.de">http://www.wako-chemicals.de</a>

## ヒトクロモグラニンA ELISA キットワコー

### 【1.はじめに】

クロモグラニンA (CgA) は、もともと副腎髓質のクロマフィン顆粒内から分離された酸性の糖たんぱく質であり、ヒトCgAは439アミノ酸からなります。CgAは内分泌・神経系に広く分布し、特に副腎髓質と下垂体に高濃度検出されます。CgAはカテコラミン類と共に共存・共放出され、血中のカテコラミン類の分泌を反映することから、交感神経-副腎系の活動を示す指標とすることができます、血中CgA免疫活性の測定が極めて重要になっています。神経・内分泌腫瘍、特に褐色細胞腫や下垂体腫瘍患者の血中CgA濃度は、正常人と比べて顕著に高値であることがわかっています。

また、CgAは頸下腺導管部にも存在し、自律神経刺激により唾液中に放出されることから、唾液CgAは精神的ストレスの新しい指標としても注目されています。

したがって、血漿CgAは腫瘍マーカーとして、唾液CgAは精神的ストレスマーカーとして使用できます。

本品は、ヒト血漿、唾液検体中のCgAを測定できるELISAキットです。

### 【2.キット性能】

検量線範囲	0.14 ~ 33.33pmol/mL
測定対象検体	ヒト血漿、ヒト唾液
必要検体量	50 μL (n=2の場合)
測定時間	O/N + 2.5 時間
同時再現性	CV < 14%
日差再現性	CV < 16%

### 【3.キット内容】

構成品	状態	容量
Antibody-coated Plate/ 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12)/1プレート
Chromogranin A Standard/ クロモグラニンA 標準品	凍結乾燥品・溶解後使用	1本
Biotin-conjugated Chromogranin A/ ビオチン結合クロモグラニンA	凍結乾燥品・溶解後使用	1本
Anti-Human Chromogranin A Antibody/ 抗ヒトクロモグラニンA 抗体	凍結乾燥品・溶解後使用	1本
Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution/ ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液	そのまま使用	12mL×1本
Substrate Buffer/ 基質溶解液	調製後使用	25mL×1本
OPD tablet/OPD錠	調製後使用	2錠
Stop Solution/ 反応停止液	そのまま使用	12mL×1本
Buffer (5×)/濃縮緩衝液 (5×)	調製後使用	12mL×1本
Wash Solution (20×)/ 濃縮洗浄液 (20×)	調製後使用	50mL×1本
プレートシール	そのまま使用	3枚
取扱説明書	-	1部

- 7/12 -

### 【4.測定原理】

測定プレート (96 ウエル) の各ウエルには、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固相化されています。このウエルに標準溶液または検体、標識抗原 (ビオチン結合クロモグラニン A) および抗ヒトクロモグラニン A 抗体を順次加え、競合反応させます。その後ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を反応させます。最後にウエル中のペルオキシダーゼ活性を測定することにより、検体中のクロモグラニン A 濃度を求めることができます。抗原にはヒト CgA\*合成ペプチドを用いています。

※ヒト CgA (344-374) :

E-E-E-D-N-R-D-S-S-M-K-L-S-F-R-A-R-A-Y-G-F-R-G-P-G-P-Q-L-R-R

### 【5.使用器具および装置】

- マイクロピペットおよびチップ (25 ~ 1,000 μL) (8連または12連のマルチチャンネルピペット推奨)
- マイクロプレートリーダー (測定波長 490nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置)
- マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
- 標準溶液 / 検体希釈用試験管 (ガラス製またはポリプロピレン製)
- マイクロプレート用洗浄装置 (用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプ推奨)
- メスシリンダー (1,000mL)
- 蒸留水または脱イオン水

### 【6.試薬類の調製法】

キットの試薬は使用前に必ず室温 (20 ~ 30°C) に戻して下さい (2 時間程度)。

#### 6.1 標準溶液

標準品の容器に緩衝液 1mL を加え、内容物を溶解します。

この標準溶液から 0.1mL をとり、これを緩衝液 0.2mL で希釈し、33.33pmol/mL の標準溶液を調製します。以下同様の希釈操作を繰り返し、11.11、3.70、1.23、0.41、0.14pmol/mL の各標準溶液を調製します。0pmol/mL の標準溶液は、緩衝液をそのまま使用します。

濃度 (pmol/mL)	標準溶液の容量	緩衝液
33.33	標準品原液 : 0.1mL	0.2mL
11.11	33.33pmol/mL 溶液 : 0.1mL	0.2mL
3.70	11.11pmol/mL 溶液 : 0.1mL	0.2mL
1.23	3.70pmol/mL 溶液 : 0.1mL	0.2mL
0.41	1.23pmol/mL 溶液 : 0.1mL	0.2mL
0.14	0.41pmol/mL 溶液 : 0.1mL	0.2mL
0 (Blank)	-	0.2mL

#### 6.2 ビオチン結合クロモグラニンA

ビオチン結合クロモグラニンAの容器に蒸留水 6mL を加え、内容物を溶解させ使用します。

- 8/12 -

### 6.3 抗ヒトクロモグラニン A 抗体

抗ヒトクロモグラニン A 抗体の容器に蒸留水 12mL を加え、内容物を溶解させ使用します。

### 6.4 発色剤溶液

使用時に基質溶解液 12mL に OPD 錠剤 1 錠を加え、溶解させ使用します。

※ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を加えた後の、2 時間の振とうの終了直前に調製して下さい。

### 6.5 緩衝液

濃縮緩衝液 (5×) 10mL を蒸留水 40mL にて希釈して使用します。

### 6.6 洗浄液

濃縮洗浄液 (20×) 50mL (全量) を蒸留水 950mL にて希釈して使用します。

○その他の試薬はそのまま使用します。

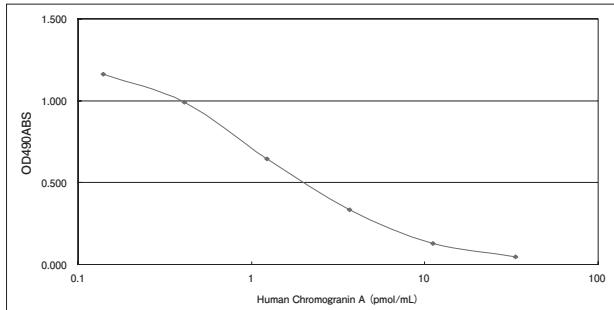
## 【7. 測定操作】

1. キットの部材を室温 (20 ~ 30°C) において、室温平衡します。標準溶液、ビオチン結合クロモグラニン A、抗ヒトクロモグラニン A 抗体、緩衝液および洗浄液を上記の方法に従って調製します。
2. 各ウエルに、洗浄液 350 μL を分注し、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除きます。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行います。
3. 各ウエルに緩衝液 50 μL を分注し、ついで標準溶液 (0, 0.14, 0.41, 1.23, 3.70, 11.11, 33.33pmol/mL) または検体 25 μL を加えます。さらにビオチン結合クロモグラニン A 溶液 50 μL および抗ヒトクロモグラニン A 抗体溶液 100 μL を加えます。
4. 測定プレートをプレートシールでシールし、室温で一晩 (16 ~ 20 時間) 振とうします (約 100rpm)。
5. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 3 回行います。
6. 各ウエルにペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液 100 μL を分注します。
7. 測定プレートをプレートシールでシールし、室温で 2 時間振とうします (約 100rpm)。
8. 7. の反応終了直前に OPD 錠を基質溶解液で溶解し、発色剤溶液を調製します。
9. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 4 回行います。
10. 各ウエルに発色剤溶液 100 μL を分注し、遮光状態で静置し、室温で 30 分間反応させます。
11. 各ウエルに反応停止液 100 μL を加えます。
12. マイクロプレートリーダーにて 490nm の吸光度を測定します。
13. 市販のソフトウェアを用いて、4 (or 5)-Parameter もしくは Log-Logit の回帰式を使用し、クロモグラニン A 標準溶液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体のヒトクロモグラニン A 濃度を求めます。

片対数方眼紙を用いる場合は、横軸 (Log 側) に標準液の濃

度を、縦軸 (Linear 側) に標準液各濃度の吸光度をプロットして標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、ヒトクロモグラニン A の濃度を読み取ります。

## 【8. 標準曲線例】



## 【9. 使用上の注意】

1. 被検血漿および唾液はただちに測定して下さい。採取後ただちに測定できない場合は小分けして、-30°C 以下で凍結保存して下さい。検体の凍結融解を繰り返さないようにして下さい。
2. 試薬は用時調製を原則として下さい。特に、標準品、ビオチン結合クロモグラニン A および抗ヒトクロモグラニン A 抗体は調製後、直ちに使用して下さい。なお、キットを分割使用する場合、調製後の標準品、ビオチン結合クロモグラニン A および抗ヒトクロモグラニン A 抗体は適宜小分けして、-30°C 以下で凍結保存して下さい。
3. 濃縮洗浄液 (20×) は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解しますので、品質には問題ございません。
4. 標準溶液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使用して下さい。また、各ウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行って下さい。検体をウエルに注入する場合は、検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意して下さい。
5. 検体が 33.33pmol/mL を超える高値検体の場合は、キット添付の緩衝液にて希釈して測定して下さい。
6. 反応液を静置したままでは各反応ステップの反応効率が低下しますので、反応中は必ずマイクロプレート用振とう器を用いて振とうしてください (星色反応の場合を除く)。なお、振とうはプレートシールに反応液がはねないようゆっくりと行って下さい (約 100rpm)。
7. 測定はすべて 2 重測定で行って下さい。
8. 反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行って下さい。
9. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成して下さい。
10. 各試薬の保存中もしくは使用中に強い光が当たらないように注意して下さい。
11. 異なるロットのキットを組み合わせて使用しないで下さい。

**【10. 測定例】**

添加回収試験

血漿	添加 (pmol/mL)	測定値 (pmol/mL)	回収率 (%)
	0	0.54	—
	0.25	0.86	108.86
	1	1.93	125.32
	4	6.58	144.93

唾液	添加 (pmol/mL)	測定値 (pmol/mL)	回収率 (%)
	0	0.47	—
	0.25	0.81	112.50
	1	1.40	95.24
	4	3.66	81.88

**【11. 操作手順概要】**

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、測定操作を行って下さい。

<input type="checkbox"/>	ウエルプレート、試薬類を充分に室温 (20 ~ 30°C) に戻して下さい。
<input type="checkbox"/>	各種試薬類の調整： ビオチン結合クロモグラニン A：蒸留水 6mL を加えて内容物を溶解して下さい。 抗ヒトクロモグラニン A 抗体：蒸留水 12mL を加えて内容物を溶解して下さい。 緩衝液：濃縮緩衝液 (5×) 10mL を蒸留水 40mL にて希釈して使用して下さい。 洗浄液：濃縮洗浄液 (20×) 50mL (全量) を蒸留水 950mL にて希釈して使用して下さい。
<input type="checkbox"/>	標準溶液の調製 (例)：クロモグラニン A 標準品の容器に緩衝液 1mL を入れて内容物を溶解します。その後下記のように緩衝液で希釈して 33.33, 11.11, 3.70, 1.23, 0.41, 0.14pmol/mL の標準溶液を作製して下さい。
調製例	濃度 (pmol/mL) 33.33 11.11 3.70 1.23 0.41 0.14 0 標準溶液 (mL) 原液: 0.1 ] * 0.1 ] * 0.1 ] * 0.1 ] * 0.1 ] * 0.1 ] * 緩衝液 (mL) 0.2 ] 0.2 ] 0.2 ] 0.2 ] 0.2 ] 0.2 ] 0.2 ] * : ひとつ高濃度の標準溶液

<input type="checkbox"/>	抗体固相化プレート
<input type="checkbox"/>	↓ 洗浄 3 回
<input type="checkbox"/>	緩衝液 50 μL
<input type="checkbox"/>	検体または標準溶液 25 μL
<input type="checkbox"/>	ビオチン結合クロモグラニン A 溶液 50 μL
<input type="checkbox"/>	抗ヒトクロモグラニン A 抗体溶液 100 μL
<input type="checkbox"/>	↓ プレートをプレートシールで覆って室温で一晩振とう (16 ~ 20 時間、約 100rpm)
<input type="checkbox"/>	↓ 洗浄 3 回
<input type="checkbox"/>	ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液 100 μL

<input type="checkbox"/>	↓ プレートをプレートシールで覆って室温で 2 時間振とう (約 100rpm)
<input type="checkbox"/>	反応終了直前に発色剤溶液を調製 (OPD 錠 1 錠を基質溶解液 12mL で溶解)
<input type="checkbox"/>	↓ 洗浄 4 回
<input type="checkbox"/>	発色剤溶液 100 μL
<input type="checkbox"/>	↓ 室温で 30 分間静置
<input type="checkbox"/>	反応停止液 100 μL
<input type="checkbox"/>	吸光度測定 (主波長 490nm)

**【貯 法】**

2 ~ 10°C 保存

**【使用期限】**

ラベルに記載

**【包 裝】**

96 回用

製造発売元

富士フィルム 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