研究用試薬

YK070 Human Chromogranin A EIA
取 扱 説 明 書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社　矢内原研究所
〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 2480-1
FAX: 0544-22-2770　TEL: 0544-22-2771
Website: www.yanaihara.co.jp　E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目　　次

Ⅰ.	はじめに	2
Ⅱ.	特　　徴	3
Ⅲ.	キットの構成	4
Ⅳ.	操作法	5-6
Ⅴ.	操作上の注意	7
Ⅵ.	基本性能	8
Ⅶ.	検体の採取方法	9
Ⅷ.	貯蔵法および有効期間	9
Ⅸ.	文献	10

YK070: Human Chromogranin A EIA キット

Ⅰ． はじめに

クロモグラニンA(CgA)は、もともと副腎髄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アミノ酸残基からなることが知られています。CgAは内分泌・神経系に広く分布し、特に副腎髄質と下垂体に高濃度検出されます。注目すべきことは、CgAはカテコラミン類と共存し、共放出されることであり、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、血中CgA免疫活性の測定が極めて重要になっています。O'ConnerとBernateinは、天然CgAのラジオイムノアッセイをはじめて確立し、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濃度が正常人に比し顕著に高値であることを示しました。

また、CgAは顎下腺導管部に存在し、自律神経刺激により唾液中に放出されることが明らかになり、唾液CgAは精神的ストレスの新しい指標として注目されるにいたりました。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。CgAの構造上の特徴として、分子内に９～１０個のプロセッシングを受けやすい部位（Arg-Lysなどの塩基対）があり、そのプロセッシングによってパンクレアスタチン、β－グラニン、パラスタチンなどの活性をもつペプチドの生成が報告されていますが、最も高濃度のCgAが存在する副腎髄質でのプロセッシングの進行はわずかであり、血中ではCgAは比較的安定な状態で存在することが知られています。

こうした背景に基づき、矢内原研究所では、合成ペプチドを抗原として用い、CgA分子を特異的に認識する抗体を作製し、安定でしかも簡便なエンザイムイムノアッセイ(EIA)系を世界で初めて確立するにいたりました。本 EIA 系は、抗ヒト CgA (344-374)血清、標準品としてヒトCgA(344-374)、標識抗原としてビオチン化ヒト CgA(344-374)[N^{α}-biotinylglycylglycyl human CgA(344-374)]を用いており、ヒト血漿および唾液中CgA免疫活性(CgA-like IR)の測定に使用できます。

ヒトCgA(344-374)：

E-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

YK070 Human Chromogranin A EIAキット

- 0.14 ～ 33.33 pmol/mL の範囲で測定できます。
- 測定は約 2 日間で終了します。
- 41 検体を duplicate でアッセイできます。
- プレートは１列（８ウエル）毎に取り外しできますので
  キットの分割使用が可能です。

保存と安定性　2～8℃で保存してください。12 ヶ月は安定です。

Ⅱ. 特　　徴

本キットはヒト血漿および唾液中に含まれるヒト・クロモグラニンＡ免疫活性（CgA－like IR)を定量的に測定するためのキットです。本キットによるヒトCgA－like IR の測定は簡便であり、しかも特異性、定量性に優れ、共存する他の生理活性物質や体液成分の影響を受けにくいなどの多くの利点があります。
なお､添付の標準ヒト CgA(344-374)は高純度の合成品(純度 98％以上)であり、表示の重量は絶対量を示しています。
またビオチン化ペプチドとして N^{α}-biotinylglycylglycyl human CgA(344-374)を使用していますのできわめて安定です。

＜特異性＞
本キットはクロモグラニン A に特異的であり､ラット･クロモグラニン A とは 70％の交差反応が認められます。クロモグラニン A のフラグメントとして単離されたパラスタチンの合成N端フラグメント[ヒト CgA(356-374)]とは100％の交差反応を示しますので、ヒト CgA(344-374)のほぼ中央部を認識するものと考えられます。なお、パンクレアスタチンやβ－グラニンとは全く交差反応しません。

＜２日法＞
測定は２日間で終了します。

＜測定原理＞
本 EIA は特異性の高い抗ヒト CgA(344-374)抗体を用い、競合反応を応用したものであり、ビオチンとストレプトアビジンの高い親和性を応用した発色を組合せた測定法です。
96 ウエルプレートの各ウエルにはヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固定化されています。この各ウエルに標準ヒト CgA(344-374)（または検体)、ビオチン化ヒト CgA(344-374)及び上記ポリクローナル抗体を順次加えて競合反応させます。これに HRP 結合ストレプトアビジンを加えると、ウエル上に HRP 結合ストレプトアビジン-ビオチン化抗原-抗体複合体が形成されます。最後にこの複合体中の酵素 (HRP) 活性を測定することにより、検体中のヒト CgA 濃度を求めることができます。
HRP：horseradish peroxidase

Ⅲ. キットの構成

以下の 11 種類の試薬が含まれており、96 テスト用です。標準曲線作成用試薬を含んでおり、duplicate（２重測定）にて測定した場合、41 サンプルの測定ができます。

試薬・器具	形状	規格		内容物
1. Antibody coated plate （測定プレート）		96 ウエルプレート 1 枚		ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 固定化プレート
2. CgA Standard （標準品）	凍結乾燥品	100 pmol	1 本	合成ヒト CgA(344-374)
3. Labeled antigen （標識抗原）	凍結乾燥品	30ng	1 本	ビオチン化ヒト CgA (344-374)
4. Specific antibody （特異抗体）	凍結乾燥品		1 本	ウサギ抗ヒト CgA (344-374)
5. SA-HRP solution （SA-HRP 溶液）	液状	12 mL	1 本	HRP 結合ストレプトアビジン
6. Substrate buffer （基質溶解液）	液状	25 mL	1 本	0.015% 過酸化水素を含む 0.1 M リン酸-クエン酸緩衝液
7. OPD tablet （OPD 錠）	錠剤		2 錠	o-フェニレンジアミン
8. Stopping solution （酵素反応停止液）	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸溶液
9. Buffer solution (Concentrated) （濃縮緩衝液）	液状	12 mL	1 本	非特異的反応除去剤を含む リン酸緩衝液
10. Washing solution (Concentrated) （濃縮洗浄液）	液状	50 mL	1 本	1% Tween 20 を含む 濃縮生理食塩液

11. Adhesive foil　　3 枚
(プレート密閉用シール)

Ⅳ. 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。
(注意:キットに含まれるすべての試薬は室温に戻してから測定を始めてください。)

＜使用器具および装置＞

1. マイクロピペットおよびチップ(25μL～1 mL);8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットの使用を薦めます
2. マイクロプレート用吸光度計(波長 490nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置)
3. マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
4. 標準液の調製に使用するポリプロピレン製の試験管またはガラス試験管
5. 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の使用を薦めます
6. メスシリンダー(1000 mL)
7. 蒸留水または脱イオン水

＜試薬の調製＞

1. 緩衝液の調製法:濃縮緩衝液 10 mL を蒸留水 40 mL にて希釈し使用する。
2. 標準液の調製法:標準品の容器に緩衝液 1 mL を加え内容物を溶解する。この標準液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 33.33 pmol/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、11.11、3.70、1.23、0.41、0.14 pmol/mL の各標準液を調製する。0 pmol/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
3. 標識抗原溶液の調製法:標識抗原の容器に蒸留水 6 mL を加え内容物を溶解させ使用する。
4. 特異抗体溶液の調製法:特異抗体の容器に蒸留水 12 mL を加え内容物を溶解させ使用する。
5. 発色剤溶液の調製法:使用時に基質溶解液 12 mL に OPD 錠剤 1 錠を加え溶解させ使用する。

6. 洗浄液の調製法：50 mL（全量）を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。
7. その他の試薬は、そのまま測定操作に従って使用する。

＜測定操作＞

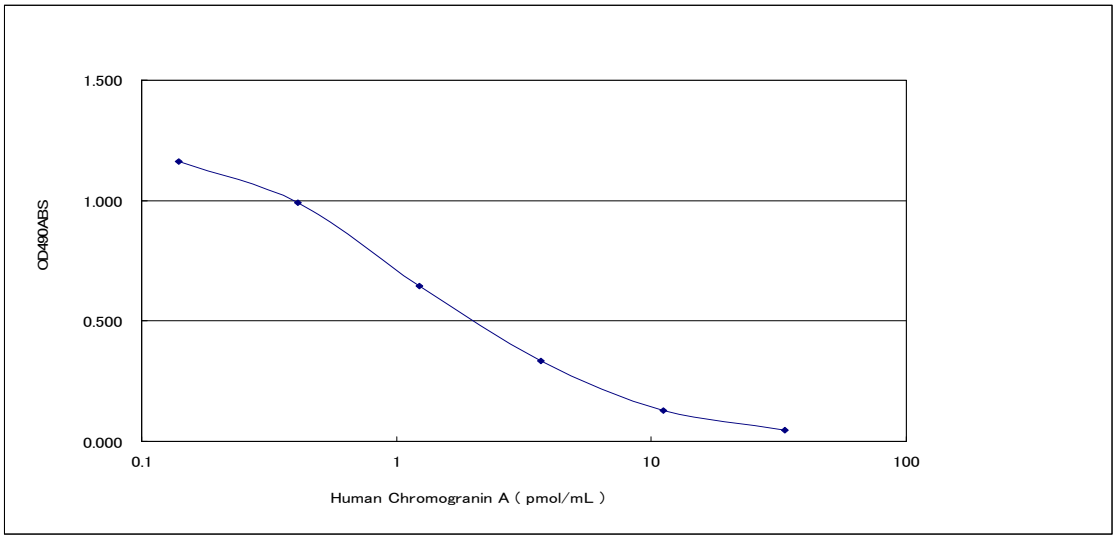
1. キット内容を室温（20℃～30℃）にもどす。
   緩衝液、標準液、標識抗原溶液、特異抗体溶液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 測定プレートの各ウエルに洗浄液 350 μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレート反転し、液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして完全に液を除く。この操作を 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行う。
3. 各ウエルに緩衝液 50 μL を入れ、ついで標準液(33.33～0 pmol/mL)または検体 25 μL を加える。さらに標識抗原溶液 50 μL および特異抗体溶液 100μL を加える。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温(20～30℃)で一晩（16～20 時間）反応を行う。反応中はマイクロプレート振とう機を用いて振とうする（約 100 rpm)。
5. 各ウエル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計 3 回行う。
6. 各ウエルに SA-HRP 溶液 100 μL を加える。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし､室温で 2 時間振とうする（約 100 rpm)。
8. 7.の反応終了直前に OPD 錠を基質溶解液で溶解し、発色剤溶液を調製する。
9. 各ウエル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
10. 各ウエルに発色剤溶液 100 μL を入れ、室温(20～30℃)で静置し、30 分間反応させる。
11. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μL を加える。
12. マイクロプレート用吸光度計にて 490 nm の吸光度を測定する。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、ヒト CgA 標準液の各濃度(6 ﾎﾟｲﾝﾄ)の測定値から標準曲線を作成し、検体のヒト CgA 濃度を求める。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、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 CgA の濃度を読み取る。

Ⅴ． 操作上の注意

1. 被検血漿および唾液はただちに測定してください。採取後ただちに測定できない場合は小分けして、－30℃以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品、標識抗原および特異抗体は調製後、直ちに使用してください。なお、キットを分割使用する場合、調製後の標準品、標識抗原および特異抗体は適宜小分けして、－30℃以下で凍結保存してください。
3. 濃縮洗浄液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。
4. 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、正確に行ってください。また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ください。標準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ってください。
5. 33.33 pmol/mL を超える高値検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液にて希釈して測定してください。
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振とうしてください(呈色反応は除く)。なお、振とうはプレート密閉用シールに反応液がはねないようゆっくりと行ってください（約 100 rpm)。
7. 測定はすべて２重測定で行ってください。
8. 酵素－基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
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ください。
10. 各試薬の保存もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意してください。
11. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせて使用しないでください。

VI. 基本性能

＜標準曲線の一例＞



＜添加回収試験＞

（ 血漿検体 ）

Human CgA added (pmol/mL)	Observed (pmol/mL)	Expected (pmol/mL)	Recovery (%)
0	0.54		
0.25	0.86	0.79	108.86
1	1.93	1.54	125.32
4	6.58	4.54	144.93

（ 唾液検体 ）

Human CgA added (pmol/mL)	Observed (pmol/mL)	Expected (pmol/mL)	Recovery (%)
0	0.47		
0.25	0.81	0.72	112.50
1	1.40	1.47	95.24
4	3.66	4.47	81.88

＜再現性試験＞

検体	同時再現性 CV (%)	日差再現性 CV (%)
血漿検体	10.13-13.26	11.57-15.33
唾液検体	8.15-12.84	12.42-14.22

Ⅶ. 検体の採取方法

検体量は 250μL あれば十分です。

＜唾液サンプル＞

唾液サンプルの採取には通常、サリベット管（唾液採取容器、例えば、ザルスタット㈱製造・販売）を使用します。このサリベット管内に入っている綿を口の中で約１分間噛んで唾液を綿に浸み込ませた後、この綿をサリベット管内上部のホルダー部分に入れてふたをし、遠心分離（3000 rpm）してください。遠心分離後、回収された唾液を小ポリプロピレンチューブ（エッペンドルフ）などに移し、－30℃以下にて保存してください。尚、蛋白補正も行ってください。

＜血漿サンプル＞

通常の方法にて採取してください。一般的な方法は以下の通りです。すなわち、血液 1mL あたりエチレンジアミン４酢酸(EDTA) 1mg を添加し、十分混和したのち遠心分離(3000 rpm)し、小ポリプロピレンチューブ（エッペンドルフ）に移し、－30℃にて保存してください。

Ⅷ. 貯蔵法および有効期間

＜貯法＞

遮光し、2-8℃にて保存してください。

＜有効期間＞

製造日より 12ヶ月間

＜包装＞

１キット 96 テスト分（標準曲線作成用を含む）

Ⅸ. 文　献

1. Blaschko H., Comiline R.S., Schneider F.H., Silver M. and Smith A.D. (1967) Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. Nature 215,58-59
2. Fischer-Colbrie R., Lassmann H., Hang C. and Winkler H. (1985) Immunological studies on the distribution of chromogranin A and B in endocrine and nervous tissues. Neuroscuence 16, 547-555
3. Konnecki D.S., Benedum U.M., Gerdesh H-H. and Huttner W.B. (1987) The primary structure of human and pancreastatin.　J. Biol. Chem. 262. 17025-17030
4. Mouland A.J., Bevan S., White G. N. (1994) Human chromogranin A Gene. Molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell-specific expression. J. Biol. Chem. 269. 6918-6926
5. Nishikawa Y., Li J., Futai Y., Yanaihara N., Iguchi K., Mochizuki T., Hoshino M., and Yanaihara C. (1998) Region-specific radioimmunoassay for human chromogranin A. Biomed. Res. 19, 245-251
6. O'Connor D.T. (1983) Chromogranin; widespread immunoreactivity in polypeptide hormone producing tissues and in serum. Regul. Pept. 6, 263 280
7. Yanaihara N., Nishikawa Y., Hoshino M., Mochizuki T., Iguchi K., Nagasawa S., Li J., Futai Y., Kanno T., Yanaihara H., Murai M., and Yanaihara C. (1998) Evaluation of region-specific radioimmunoassay for rat and human chromogranin A : measurement of immunoreactivity in plasma, urine and saliva. In The Adrenal Chromaffin Cell(ed. KannoT.,Nakazato Y. and kumakura K.) Hokkaido University Press, Sapporo, Japan, pp. 305 – 313
8. Wu J. T., Astill M. E., Lie G.H., and Stephenson R. A. (1998) Serum chromogranin A : Early detection of hormonal resistance inprostate cancer patients. J. Clin. Lab. Anal. 12, 20-25

＜お問合せ先＞
株式会社　矢内原研究所
〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 2480-1
FAX:0544-22-2770　TEL:0544-22-2771
www.yanaihara.co.jp　ask@yanaihara.co.jp

2020 年 1 月 20 日改訂