

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-286737**(P2004-286737A)**

(43) 公開日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53

N

2 GO 5 4

GO 1 N 21/76

GO 1 N 33/53

M

GO 1 N 33/574

GO 1 N 21/76

GO 1 N 33/574

Z

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2004-59413 (P2004-59413)

(22) 出願日 平成16年3月3日(2004.3.3)

(31) 優先権主張番号 特願2003-57444 (P2003-57444)

(32) 優先日 平成15年3月4日(2003.3.4)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(71) 出願人 000002288

三洋化成工業株式会社

京都府京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の
1

(72) 発明者 國近 誠

京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の 1 三
洋化成工業株式会社内Fターム(参考) 2G054 AA06 AB04 CA21 CA23 CE02
EA01 GA09

(54) 【発明の名称】 p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬

(57) 【要約】

【課題】 p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物に対する自己抗体を簡便かつ高感度で再現よく検出することができる免疫測定用試薬を提供すること。

【解決手段】 p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物 (R) に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、配列番号 (1) ~ (4) のいずれかのアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質 (P) と水不溶性担体 (B) とが結合されてなることを特徴とする免疫測定用試薬を用いる。また、この試薬と、抗ヒトイムノグロブリン抗体 (酵素等の標識化合物で標識されていることが好ましい) とを含有してなる免疫測定用試薬キットを用いることが好ましい。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物 (R) に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、配列番号 (1) ~ (4) のいずれかのアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質 (P) と水不溶性担体 (B) とが結合されてなることを特徴とする免疫測定用試薬。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の試薬と、抗ヒトイムノグロブリン抗体とを含有してなる免疫測定用試薬キット。

【請求項 3】

抗ヒトイムノグロブリン抗体が標識化合物で標識されてなる請求項 2 記載の試薬キット。

【請求項 4】

標識化合物が酵素である請求項 3 記載の試薬キット。

【請求項 5】

p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物 (R) に対する自己抗体を検出する免疫測定方法であって、請求項 3 又は 4 に記載の試薬キットをサンドイッチ法に適用し、産物 (R) に対する自己抗体の有無を標識化合物の定量により判断する工程を含む免疫測定方法。

【請求項 6】

化学発光酵素免疫測定法による請求項 5 記載の免疫測定方法。

【請求項 7】

検体中の p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物 (R) に対する自己抗体の有無の判断工程において、検体として血液を用い、この検体に対する抗ヒトイムノグロブリン量と、複数の健常人の血液に対する抗ヒトイムノグロブリン量から設定される基準値とを比較することを含む請求項 5 又は 6 に記載の免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物 (R) に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬、これを含む免疫測定用試薬キット及び産物 (R) に対する自己抗体の免疫測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

p 1 6 遺伝子は、サイクリン依存性キナーゼインヒビター 2 A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) [以下、p 1 6 遺伝子産物] をコードする癌抑制遺伝子である。そして、p 1 5 遺伝子、p 1 8 遺伝子及び p 1 9 遺伝子は、p 1 6 遺伝子と共通点が多くあり、p 1 6 遺伝子ファミリーとして知られている (非特許文献 1) 。種々のヒト癌において、これらの p 1 6 遺伝子ファミリーに高頻度に異常が起こることが知られている (非特許文献 2 及び 3) 。一方、肺癌患者においては、血中に p 1 6 遺伝子産物と反応する自己抗体が出現することがウエスタンブロット法で認められている (非特許文献 4) 。

【0003】

【非特許文献 1】ネイチャージェネティクス (Nature Genet.) , 8 , 1 5 頁 , 1 9 9 4 年

【非特許文献 2】ネイチャージェネティクス (Nature Genet.) , 8 , 2 7 頁 , 1 9 9 4 年

【非特許文献 3】キャンサーリサーチ (Cancer Res.) , 5 4 , 6 3 5 3 頁 , 1 9 9 4 年

【非特許文献 4】インターナショナル ジャーナル オブ オンコロジー (Int.J.Oncology) , 1 4 , 6 8 1 頁 , 1 9 9 9 年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物に対する自己抗体の存在が確認されていたウエスタンブロット法には、電気泳動又はブロッティング等の煩雑かつ長時間の操作が必要であるという問題があり、特に、多数の検体を測定する場合、臨床検査薬等への適応は困難である。さらに、ウエスタンブロット法は感度及び再現性等にも問題がある。すなわち、本発明の目的は、p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物に対する自己抗体を簡便かつ高感度に再現性よく検出することができる免疫測定用試薬を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

10

本発明者は、上記目的を達成するために鋭意研究を行った結果、特定の蛋白質を含む試薬を用いることにより、産物 (R) に対する自己抗体を簡便かつ高感度で再現性良く検出できることを見だし、本発明に到達した。すなわち、本発明の免疫測定試薬の特徴は、p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物 (R) に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、配列番号 (1) ~ (4) のいずれかのアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質 (P) と水不溶性担体 (B) とが結合されてなる点を要旨とする。

【発明の効果】

【 0 0 0 6 】

本発明の p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬は、非特異的反応が少なく、感度及び特異性に極めて優れている。すなわち、自己抗体を保有しない健常人からの検体の測定値と自己抗体を保有する癌患者からの検体の測定値との差が十分に大きく (高感度) 、また自己抗体を保有しない健常人の検体に対して非特異的反応が極めて少ないので高精度の測定ができる。また、簡便に測定することができるため、数多くの検体を短時間に容易に測定することができる。すなわち、本発明の免疫測定用試薬は、p 1 6 遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物に対する自己抗体を簡便かつ高感度で再現よく検出することができる。従って、本発明の測定試薬、測定試薬キット及び測定法を用いると、極めて迅速かつ正確な癌の診断ができる。

20

【発明を実施するための最良の形態】

30

【 0 0 0 7 】

p 1 6 遺伝子からの発現産物である p 1 6 遺伝子産物は、サイクリン依存性キナーゼインヒビター 2 A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) { 配列番号 (1) のアミノ酸配列からなるポリペプチド } である。p 1 5 遺伝子からの発現産物である p 1 5 遺伝子産物は、サイクリン依存性キナーゼインヒビター 2 B (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B) { 配列番号 (2) のアミノ酸配列からなるポリペプチド } である。p 1 8 遺伝子からの発現産物である p 1 8 遺伝子産物は、サイクリン依存性キナーゼインヒビター 2 C (cyclin-dependent kinase inhibitor 2C) { 配列番号 (3) のアミノ酸配列からなるポリペプチド } である。p 1 9 遺伝子からの発現産物である p 1 9 遺伝子産物は、サイクリン依存性キナーゼインヒビター 2 D (cyclin-dependent kinase inhibitor 2D) { 配列番号 (4) のアミノ酸配列からなるポリペプチド } である。

40

【 0 0 0 8 】

配列番号 (1) ~ (4) のいずれかのアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質 (P) としては、配列番号 (1) ~ (4) のいずれかのアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質 (P 1) 及び配列番号 (1) ~ (4) のいずれかのアミノ酸配列に含まれる一部のアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質 (P 2) 等が使用できる。これらのうち、調製の観点及び抗原性の観点等から、配列番号 (1) ~ (4) のいずれかのアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質 (P 1) が好ましい。

蛋白質 (P 2) としては、配列番号 (1) ~ (4) のいずれかのアミノ酸配列をアミノ酸 1 0 ~ 1 3 0 個 (好ましくは 3 0 ~ 1 2 0 個、さらに好ましくは 5 0 ~ 9 0 個) となる

50

ように分割した断片（アミノ酸配列）を構成単位としてなる蛋白質等が含まれ、例えば、配列番号（５）～（２４）からなる群より選ばれる少なくとも１種の配列番号のアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質等が挙げられる。これらのうち、配列番号（１）～（４）のいずれかのアミノ酸配列のＮ末端領域（アミノ酸配列）又はＣ末端領域（アミノ酸配列）を含むアミノ酸配列が好ましく、例えば配列番号（５）、（６）、（７）、（９）、（１０）、（１１）、（１２）、（１４）、（１５）、（１６）、（１７）、（１９）、（２０）、（２１）、（２２）及び／又は（２４）のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質が好ましい。蛋白質（Ｐ２）が２種以上のアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質である場合、Ｎ末端領域のアミノ酸配列（たとえば、配列番号（５）、（７）、（１０）、（１２）、（１５）、（１７）、（２０）及び／又は（２２））とＣ末端領域のアミノ酸配列（たとえば、配列番号（６）、（９）、（１１）、（１４）、（１６）、（１９）、（２１）及び／又は（２４））とを含むアミノ酸配列が好ましく、例えば、（５）と（６）、（７）と（９）、（１０）と（１１）、（１２）と（１４）、（１５）と（１６）、（１７）と（１９）、（２０）と（２１）又は（２２）と（２４）を含むことが好ましい。これらのうち、（７）と（９）、（１２）と（１４）、（１７）と（１９）又は（２２）と（２４）を含むことがさらに好ましい。

10

【０００９】

蛋白質（Ｐ）が１０～１００個（好ましくは２０～５０個）のアミノ酸で構成されている場合、蛋白質（Ｐ）は、配列番号（１）～（４）のいずれかのアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列のみから構成されていてもよく、さらにＮ末端及び／又はＣ末端がビオチン、チオグリコール酸、及び／又はリンカーとして用いるアミノ酸（システイン、リジン、チロシン、グルタミン酸及びアスパラギン酸等）等で修飾されていてもよい。また、さらにＮ末端が無水酢酸又はＮ－アセチルイミダゾール等でアセチル化されていてもよく、Ｃ末端が水溶性カルボジイミド（例えば、１－エチル－３－ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩）又はイソオキサゾリウム（例えば、Ｎ－メチル－５－フェニルイソオキサゾリウムフルオロボレート）等でアミド化されていてもよい。また、これらの修飾は組み合わせることもできる。Ｎ末端及び／又はＣ末端がアミノ酸で修飾されている場合、このアミノ酸の個数（個）は、Ｎ末端又はＣ末端当たり、１～５が好ましく、さらに好ましくは１～３、特に好ましくは１～２である。Ｎ末端及び／又はＣ末端がビオチン及び／又はチオグリコール酸で修飾されている場合、ビオチン又はチオグリコール酸の個数（個）は、蛋白質（Ｐ）１分子当たり、１～５が好ましく、さらに好ましくは１～３、特に好ましくは１～２である。これらのうち、ビオチン又はチオグリコール酸で修飾されていることが好ましく、蛋白質（Ｐ）と水不溶性担体（Ｂ）とを結合する場合の簡便性等の観点から、さらに好ましくはＮ末端及び／又はＣ末端がビオチンで修飾されていることである。

20

30

【００１０】

蛋白質（Ｐ）が１００個を超えるアミノ酸（好ましくは１０００個以下、さらに好ましくは５００個以下）で構成されている場合、蛋白質（Ｐ）は配列番号（１）～（４）のいずれかのアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列（（Ｐ１）及び／又は（Ｐ２））のみから構成されていてもよく、上述の修飾をされていてもよく、蛋白質発現用ベクターから発現した蛋白質を含んでいてもよい。蛋白質発現用ベクターから発現した蛋白質としては、グルタチオントランスフェラーゼ、ヒスチジントグ（例えば、ヒスチジンが６個結合したペプチド）及びプロテインＡのＺＺ領域部分の蛋白質等が挙げられる。これらのうち、蛋白質発現用ベクターから発現した蛋白質を含んでいることが好ましく、さらに好ましくはグルタチオントランスフェラーゼの蛋白質又はプロテインＡのＺＺ領域部分の蛋白質を含んでいることである。

40

【００１１】

蛋白質（Ｐ）は、遺伝子組み換え等で作成した融合蛋白質であってもよく、例えば配列番号（１）～（２４）のいずれかのアミノ酸配列を構成単位としてなるポリペプチドを、ＧＳＴ（グルタチオン Ｓ－トランスフェラーゼ）と融合した蛋白質等が含まれる。蛋白

50

質 (P) が、100個を超えるアミノ酸で構成されている場合、調製等の観点から融合蛋白質が好ましい。

【0012】

蛋白質 (P) は、従来公知のペプチド合成法、又は遺伝子組み換え法等で作成できる。ペプチド合成法によるとアミノ酸の個数が20個を超えると蛋白質 (P) の合成が極めて困難であるのに対して、遺伝子組み換え法であるとそれが容易であるため、調製の容易性等の観点から、遺伝子組み換え法が好ましい。

【0013】

ペプチド合成法は、溶液中でも、あるいは固体支持体上でも達成できるが固相支持体を用いた固相合成法が好ましく、さらに好ましくは自動ペプチド合成機を用いた固相合成法である。ペプチド合成法は、一般に、t - ブチルオキシカルボニル (B O C 基) 又は9 - フルオレニルメトキシ - カルボニル (F m o c 基) で保護された活性化アミノ酸を使用する。この他、具体的な合成操作、側鎖保護の種類、および切断法等は、例えば、ソリッドフェーズペプタイドシンセシス第2版、ピースケミカル社、1984年 (Stewart及びYoung, "Solid Phase Peptide Synthesis", 第2版, Pierce Chemical Company, 1984)、及びソリッドフェーズペプタイドシンセシス、アイアールエル社、1989年 (Atherton及びSheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis", IRL Press, 1989) に詳細に記述されている。

【0014】

遺伝子組み換え法としては、ヒト細胞、例えばヒト血管内皮細胞又はヒト線維芽細胞等から抽出したmRNAから、目的とするアミノ酸配列に対応するプライマーを用いてcDNAを作製し、これをPCR法 (ポリメラーゼチェーンリアクション法) によって増幅した後制限酵素で切断し、この断片をベクターに組み込み、得られた発現ベクターで大腸菌等の宿主を形質転換し、必要あれば誘導処理した後、宿主を培養し、菌体溶解物から目的とする融合蛋白質を抽出・精製する。このようにして、蛋白質 (P) を含む融合蛋白質が作成できる (例えば、生化学実験法45「組み換えタンパク質生産法」, 学会出版センター社, 2001年)。以上の他に、p16遺伝子ファミリーの遺伝子産物のアミノ酸配列から目的のアミノ酸配列に該当する遺伝子をDNA合成機で合成した後、その遺伝子をベクターに組み込み発現させることにより、蛋白質 (P) を作成できる。

【0015】

本発明の免疫測定用試薬は、このような蛋白質 (P) の少なくとも1種を含んでいればよいが、2種以上の蛋白質 (P) を含んでいることが、自己抗体との反応性 (特異性及び感度) がより高くなる点で好ましい。例えば、p16遺伝子産物に対応する配列番号 (1)、(5)、(6)、(7)、(8) 及び (9) からなる群より選ばれる少なくとも1種のアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質と、p15遺伝子産物に対応する配列番号 (2)、(10)、(11)、(12)、(13) 及び (14) からなる群より選ばれる少なくとも1種のアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質とを組み合わせることにより、p16遺伝子ファミリーに含まれる癌抑制遺伝子の産物に対する自己抗体検出の特異性及び感度がより向上する。

【0016】

本発明の免疫測定用試薬の好ましい蛋白質の組合せ例としては、例えば、次の組合せが例示できる。なお、カッコ内の数字は、配列番号に対応しており、その配列番号のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質を表す。すなわち、(2) + (3) は、配列番号 (2) のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質と配列番号 (3) のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質との組合せを表す。

【0017】

すなわち、(1) + (2)、(1) + (3)、(1) + (4)、(2) + (3)、(2) + (4)、(3) + (4)、(1) + (2) + (3)、(1) + (2) + (4)、(2) + (3) + (4)、(1) + (3) + (4)、(1) + (2) + (3) + (4)、(5) + (6) + (2)、(5) + (6) + (3)、(5) + (6) + (4)、(5) + (6

10

20

30

40

50

) + (2) + (3)、(5) + (6) + (2) + (4)、(5) + (6) + (3) + (4)
)、(5) + (6) + (2) + (3) + (4)、(7) + (9) + (2)、(7) + (9)
) + (3)、(7) + (9) + (4)、(7) + (9) + (2) + (3)、(7) + (9)
) + (2) + (4)、(7) + (9) + (3) + (4)、(7) + (9) + (2) + (3)
) + (4)、(1) + (1 0) + (1 1)、(1 0) + (1 1) + (3)、(1 0) + (1 1) + (4)、
 (1) + (1 0) + (1 1) + (3)、(1) + (1 0) + (1 1) + (4)、(1 0) + (1 1) + (3) + (4)、
 (1) + (1 0) + (1 1) + (3) + (4)、(1) + (1 2) + (1 4)、(1 2) + (1 4) + (3)、(1 2) + (1 4)
) + (4)、(1) + (1 2) + (1 4) + (3)、(1) + (1 2) + (1 4) + (4)、(1 2) + (1 4) + (3) + (4)、
 (1) + (1 2) + (1 4) + (3) + (4)、(1) + (1 2) + (1 4) + (3) + (4) 10
)、(1) + (1 5) + (1 6)、(2) + (1 5) + (1 6)、(1 5) + (1 6) + (4)、(1) + (2) + (1 5) + (1 6)、
 (2) + (1 5) + (1 6) + (4)、(1) + (1 5) + (1 6) + (4)、(1) + (2) + (1 5) + (1 6) + (4)、
 (1) + (1 7) + (1 9)、(2) + (1 7) + (1 9)、(1 7) + (1 9) + (4)、(1) + (2) + (1 7) + (1 9)、
 (2) + (1 7) + (1 9) + (4)、(1) + (1 7) + (1 9) + (4)、(1) + (2) + (1 7) + (1 9) + (4)、
 (1) + (2 0) + (2 1)、(2) + (2 0) + (2 1)、(3) + (2 0) + (2 1)、(1) + (2) + (2 0) + (2 1)、
 (2) + (3) + (2 0) + (2 1)、(1) + (3) + (2 0) + (2 1)、(1) + (2) + (3) + (2 0) + (2 1)、(1) +
 (2 2) + (2 4)、(2) + (2 2) + (2 4)、(3) + (2 2) + (2 4)、(1) + (2) + (2 2) + (2 4)、
 (2) + (3) + (2 2) + (2 4)、(1) + (3) + (2 2) + (2 4)、(1) + (2) + (3) + (2 2) + (2 4)、(5) + (6)
) + (1 0) + (1 1)、(5) + (6) + (1 5) + (1 6)、(5) + (6) + (2 0) + (2 1)、(1 0) + (1 1) + (1 5) + (1 6)、
 (1 0) + (1 1) + (1 5) + (1 6)、(1 0) + (1 1) + (2 0) + (2 1)、(1 5) + (1 6) + (2 0) + (2 1)、
 (5) + (6) + (1 0) + (1 1) + (1 5) + (1 6)、(5) + (6) + (1 0) + (1 1) + (2 0) + (2 1)、
 (1 0) + (1 1) + (1 5) + (1 6) + (2 0) + (2 1)、(5) + (6) + (1 0) + (1 1) + (2 0) + (2 1)、
 (1 5) + (1 6) + (2 0) + (2 1)、(7) + (9) + (1 2) + (1 4)、(7) + (9) + (1 7) + (1 9)、
 (7) + (9) + (2 2) + (2 4)、(1 2) + (1 4) + (1 7) + (1 9)、(1 2) + (1 4) + (2 2) + (2 4)、
 (1 7) + (1 9) + (2 2) + (2 4)、(7) + (9) + (1 2) + (1 4) + (1 7) + (1 9)、(7) + (9) + (1 2) + (1 4) + (2 2) + (2 4)、
 (1 2) + (1 4) + (1 7) + (1 9) + (2 2) + (2 4)、(7) + (9) + (1 7) + (1 9) + (2 2) + (2 4)、
 (7) + (9) + (1 2) + (1 4) + (1 7) + (1 9) + (2 2) + (2 4)、(5) + (6) + (1 2) + (1 4)、
 (5) + (6) + (1 5) + (1 6)、(5) + (6) + (2 2) + (2 4)、(1 2) + (1 4) + (1 5) + (1 6)、
 (1 2) + (1 4) + (2 2) + (2 4)、(1 5) + (1 6) + (2 2) + (2 4)、(5) + (6) + (1 2) + (1 4) + (1 5) + (1 6)、
 (5) + (6) + (1 2) + (1 4) + (2 2) + (2 4)、(1 2) + (1 4) + (1 5) + (1 6) + (2 2) + (2 4)、
 (1 2) + (1 4) + (2 2) + (2 4)、(1 2) + (1 4) + (1 5) + (1 6) + (2 2) + (2 4)、
 (5) + (6) + (1 5) + (1 6) + (2 2) + (2 4) 及び (5) + (6) + (1 2) + (1 4) + (1 5) + (1 6) + (2 2) + (2 4) 等が挙げられる。

【 0 0 1 8 】

これらのうち、(1) + (2) + (3) + (4)、(7) + (9) + (2) + (3) + (4)、
 (1) + (2) + (1 7) + (1 9) + (4)、(1) + (2) + (3) + (2 2) + (2 4)、
 (5) + (6) + (1 0) + (1 1) + (1 5) + (1 6) + (2 0) + (2 1)、
 (7) + (9) + (1 2) + (1 4) + (1 7) + (1 9) + (2 2) + (2 4) 及び (5) + (6) + (1 2) + (1 4) + (1 5) + (1 6) + (2 2) + (2 4)
 が好ましく、さらに好ましくは (5) + (6) + (1 0) + (1 1) + (1 5) + (1 6) + (2 0) + (2 1)、
 (7) + (9) + (1 2) + (1 4) + (1 7) + (1 9) 50

) + (22) + (24) 及び (5) + (6) + (12) + (14) + (15) + (16) + (22) + (24)、特に好ましくは (7) + (9) + (12) + (14) + (17) + (19) + (22) + (24) である。

【0019】

蛋白質 (P) は、これ自体で免疫凝集法等の免疫測定用試薬として用いることができるが、本発明においては、蛋白質 (P) が水不溶性担体 (B) と結合したかたちで免疫用試薬に含まれる。なお、水不溶性担体の水不溶性とは、1 ~ 50 のいずれの温度においても、水に対する溶解度が 0.01 g / 水 100 g 以下であることを意味し、担体とは 1 ~ 50 のいずれの温度においても固体 (ゲルを含む) であって p 16 遺伝子産物と結合できる物質を意味する。水不溶性担体 (B) としては、特開平 2 - 205774 号公報に記載の担体等が使用でき、無機物及び有機物等が使用でき、例えば、セルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリウレタン、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリエステル、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、絹、フィブロイン、リグニン、ヘミセルロース、キチン、エボナイト、ゴム、ガラス、石英、シリコン及びセラミックス等が挙げられる。これらのうち、ポリスチレン、ガラス、石英及びシリコンが好ましく、さらに好ましくはポリスチレン及びガラス、特に好ましくはガラスである。

10

【0020】

水不溶性担体 (B) の形状は、使用する目的に合わせて自由に決定でき、真球状や円盤状のビーズ、板状や棒状のスティック、試験管、及び不織布やフィルターのストリップ (短冊状の細片)、微粒子等が挙げられる。これらのうち、ビーズ及び微粒子が好ましく、さらに好ましくは真球状のビーズである。

20

【0021】

水不溶性担体 (B) の大きさは、使用する目的に合わせて自由に決定できるが、通常は内径 4 ~ 10 mm、深さ 10 ~ 20 mm 程度の円柱形反応容器 (ビーカー等) に投入できる大きさである (水不溶性担体が試験管の場合を除く。)。真球状ビーズの場合、直径 (mm) は 1 ~ 10 が好ましく、さらに好ましくは 2 ~ 8、特に好ましくは 3 ~ 7 である。円盤状ビーズの場合、直径 (mm) は 1 ~ 10 が好ましく、さらに好ましくは 2 ~ 8、特に好ましくは 3 ~ 7 であり、厚さは (mm) は 0.1 ~ 5 が好ましく、さらに好ましくは 0.2 ~ 2、特に好ましくは 0.3 ~ 1 である。スティックの場合、長さ (mm) は 2 ~ 10 が好ましく、さらに好ましくは 3 ~ 8、特に好ましくは 4 ~ 7 である。また、スティックの断面積 (mm²) は 1 ~ 25 が好ましく、さらに好ましくは 2 ~ 16、特に好ましくは 3 ~ 9 である。なお、断面積とは、長軸方向に対して垂直に切断した際の切断部分の断面積を意味する。試験管の場合、長さ (mm) は 5 ~ 100 が好ましく、さらに好ましくは 8 ~ 80、特に好ましくは 10 ~ 20 である。また、試験管の内径 (mm) は、5 ~ 20 が好ましく、さらに好ましくは 6 ~ 16、特に好ましくは 8 ~ 12 である。ストリップの場合、長さ (mm) は、5 ~ 100 が好ましく、さらに好ましくは 10 ~ 80、特に好ましくは 10 ~ 50 である。また、ストリップの幅 (mm) は、1 ~ 20 が好ましく、さらに好ましくは 2 ~ 16、特に好ましくは 3 ~ 10 である。厚さは (mm) は 0.1 ~ 2 が好ましく、さらに好ましくは 0.1 ~ 0.5 である。不織布やフィルターの平均孔径 (μm) は、0.1 ~ 10 が好ましく、さらに好ましくは 0.3 ~ 5 である。微粒子の場合、平均粒子径 (μm) は 0.01 ~ 200 が好ましく、さらに好ましくは 0.1 ~ 50、特に好ましくは 0.2 ~ 10 である。平均粒子径は、透過型電子顕微鏡法、光学顕微鏡による整列測定法等で測定できる。

30

40

【0022】

蛋白質 (P) と水不溶性担体 (B) とを結合する方法としては、化学的に結合する方法及び物理吸着により結合する方法等の従来公知の方法等を行うことができる。化学的に結合する方法としては、水不溶性担体 (B) の表面に導入されたアミノ基及び / 又はスルフィド基等の官能基と、蛋白質 (P) のアミノ基及び / 又はスルフィド基等の官能基とを結合剤 (グルタルアルデヒド、サクシナルデヒド、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロサクシニミドエステル及び o - フェニレンビスマレイミド等) で架橋する方

50

法（米国特許第4280992号明細書及び同第3652761号明細書等）等が挙げられる。物理吸着により結合する方法としては、水不溶性担体（B）がポリスチレンの場合、蛋白質（P）の0.001～0.04%（W/V）炭酸緩衝水溶液（pH9.0）に水不溶性担体を適当時間浸漬する方法（バイオシム・バイオフィズ・アクタ、251巻、427頁、1971年）等が挙げられる。この方法は、担体がポリスチレン以外の物質、例えばポリプロピレン、シリコン、ガラス及びセルロース等にも適用できる。また、特異的結合物質（例えば、抗原-抗体、アビジン-ビオチン、レクチン-糖鎖、相補的遺伝子鎖等）を利用して間接的に、蛋白質（P）と水不溶性担体（B）とを結合することもできる。例えば、蛋白質（P）をビオチンで修飾し、アビジンを結合した水不溶性担体と反応することにより、蛋白質（P）を水不溶性担体（B）に結合できる。アビジンとしては、卵白由来アビジン及びストレプトアビジン等が使用でき、ストレプトアビジンが好ましい。これら特異的結合物質のうち抗原-抗体、アビジン-ビオチン、レクチン-糖鎖については、[生化学実験法11「エンザイムイムノアッセイ」, 東京化学同人社, 1989年]に記載のもの、相補的な遺伝子としては特開平6-186232号公報に記載の相補的な遺伝子、例えばポリデオキシアデニル酸とポリチミジル酸の組み合わせ等が挙げられる。

10

【0023】

これらのうち、蛋白質（P）のアミノ酸個数が20～100個の場合、特異的結合物質を用いる方法が好ましく用いられ、特異的結合物質を用いる方法のうち、アビジン-ビオチン結合を利用した方法が特に好ましい。蛋白質（P）のアミノ酸個数が100を越える場合、化学的に結合する方法及び物理吸着による方法が好ましく、最も好ましくは化学的に結合する方法である。なお、アミノ酸個数20～100個の蛋白質と、アミノ酸個数100個を越える蛋白質とを結合する場合、例えば、アビジンとアミノ酸個数100個を越える蛋白質を混合して、水不溶性担体（B）と結合させた後、ビオチンで修飾した蛋白質（アミノ酸個数20～100個）と水不溶性担体（B）とを反応させる方法等が好ましい。

20

【0024】

本発明の免疫測定用試薬は、適当な緩衝液に浸漬した状態でもよいが、蛋白質（P）と水不溶性担体（B）とを結合した後、糖類及び/又は蛋白質でコーティングし乾燥した状態が好ましい。緩衝液としては、リン酸緩衝液及びグッド（Good）の緩衝液等が使用でき、蛋白、塩及び/又は界面活性剤等を含有していてもよい。蛋白としては、アルブミン（牛血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、マウス血清アルブミン、オバルブミン、コナルブミン及びラクトアルブミン等）、抗体（正常ウサギIgG及び正常マウスIgG等の蛋白質（P）との結合性がない抗体）及びゼラチン等が挙げられる。塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム及び臭化リチウム等が挙げられる。界面活性剤としては、ソルビタンラウリン酸モノエステルエチレンオキシド付加物（商品名：ツイーン20及びツイーン40、ICIアメリカ社）等のノニオン界面活性剤等が挙げられる。コーティング・乾燥方法としては、少なくとも糖類を含有する溶液中に浸漬したのち乾燥させる方法（特開平09-318628号公報及び特公平5-41946号公報）等が挙げられる。糖類としては、二糖類及び単糖類が好ましく、二糖類としては、麦芽糖、セロビオース、ゲンチオビオース、メリビオース、ショ糖、ラクトース及びイソサッカロース等が挙げられ、単糖類としては、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、アラビノース及びキシリトース等が挙げられる。これらのうち、ラクトース、ショ糖、グルコース及びフルクトースが好ましく、さらに好ましくはラクトース及びショ糖、特に好ましくはショ糖である。コーティングするとき、コーティング量（糖類などの含有量）、糖類などを含む溶液（コーティング液）の濃度、及び溶液の種類等は、公知の範囲でよく、例えば、特開平09-318628号公報及び特公平5-41946号公報等に記載されている。

30

40

【0025】

本発明の免疫測定用試薬キットは、本発明の免疫測定用試薬と共に、抗ヒトイムノグロブリン抗体とを含有していることが好ましい。抗ヒトイムノグロブリン抗体は、従来公知の方法で作成されたものが使用でる。この抗体は、例えば、ヒトイムノグロブリンを適当

50

な動物（例えば、マウス、ウサギ、ブタ、ヤギ、ウマ等）に免疫し、得られた抗血清を塩析、イオン交換カラムクロマトグラフィー等で精製することにより得られる。抗ヒトイムノグロブリン抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、また、 $(F_{ab'})^2$ 、 $F_{ab'}$ 等の抗体断片でもよい。なお、ヒトイムノグロブリンとは、IgG、IgA、IgM等の全てのイムノグロブリンを含むが、通常はIgG及びIgMであり、主にIgGである。

【0026】

抗ヒトイムノグロブリン抗体は、標識されていなくてもよいが、感度、測定の簡便性等の点から標識化合物で標識されていることが好ましい。抗ヒトイムノグロブリン抗体が標識化合物で標識されていない場合、抗ヒトグロブリン抗体を認識する抗体（例えば抗ヒトイムノグロブリン抗体がマウスのIgGである場合、ウサギで作成した抗マウスIgG抗体）を標識した試薬等が用いられる。標識化合物としては従来公知のものが使用でき、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質及び酵素等が用いられる。アイソトープとしては、¹²⁵I等が挙げられ、蛍光物質としてはユーロピウム錯体等が挙げられ、発光物質としてはN-メチルアクリジウムエステル等が挙げられ、酵素としては西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びβ-ガラクトシダーゼ等が挙げられる。これらの標識化合物のうち、酵素が好ましく、さらに好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びβ-ガラクトシダーゼ、特に好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼである。

【0027】

標識化合物を抗ヒトイムノグロブリン抗体に標識する方法は従来公知の方法等が適用でき、「続生化学実験講座5 免疫生化学実験法」（日本生化学会編、東京化学同人、1986年発行、102～112頁に記載の方法等が用いられ、例えば、次の(1)～(4)の方法等が適用できる。

(1) 標識化合物がアイソトープの場合、クロラミンTを酸化剤として用いて放射性ヨウ素を抗ヒトイムノグロブリン抗体のチロシン残基に導入する方法。

(2) 標識化合物が蛍光物質の場合、フルオレセインイソチオシアネートを緩衝液中で抗ヒトイムノグロブリン抗体に反応させ、抗ヒトイムノグロブリン抗体のリシン残基に結合させる方法。

(3) 標識物質が発光物質の場合、商品名「アクリジニウム誘導体-I」（同人化学研究所社製）を緩衝液中で抗ヒトイムノグロブリン抗体に反応させ、抗ヒトイムノグロブリン抗体のアミノ基に結合させる方法。

(4) 標識物質が酵素の場合、酵素の持つアミノ基と抗ヒトイムノグロブリン抗体の持つチオール基をN-スクシンイミジル-6-マレイドヘキサノエート等の二架橋性試薬で結合する方法。

【0028】

本発明の免疫測定用試薬キットには、本発明の免疫測定用試薬を含めば、試薬の剤型及び試薬キットの構成等に制限はない。すなわち本発明の試薬キットは、ラテックス凝集法及びラテックス比濁法等のホモジニアス免疫測定法にも、ヘテロジニアス免疫測定法にも適用できる。これらのうち、測定感度の点で、ヘテロジニアス免疫測定方法が好ましく、さらに好ましくは標識化合物を標識した抗ヒトイムノグロブリン抗体を含むヘテロジニアスなサンドイッチ免疫測定法（ピース法）である。すなわち、本発明の免疫測定用試薬と検体とを反応させると産物（R）に対する自己抗体のみが特異的に蛋白質（P）と結合する。そこで、抗ヒトイムノグロブリン抗体を加えると、この抗体は自己抗体と結合し、免疫複合体「蛋白質（P）-自己抗体-抗ヒトイムノグロブリン抗体」を形成する。この免疫複合体中の抗ヒトイムノグロブリン抗体を定量することにより自己抗体量を定量できる。抗ヒトイムノグロブリン抗体が標識化合物で標識している場合、抗ヒトイムノグロブリン抗体量は標識化合物の量を測定することにより定量することができる。

【0029】

標識化合物の測定は、標識化合物の種類により従来公知の方法等で実施できる。標識化

10

20

30

40

50

合物が蛍光物質の場合、例えば適当な波長の励起光の照射によって生じる蛍光量を光電子増倍管により定量する。標識化合物が化学発光物質の場合、例えばアクリジニウムエステルではアルカリ溶液を加えることにより生じる発光量を光電子増倍管により定量する。

【0030】

標識化合物が酵素の場合、適当な基質を反応させることにより酵素活性を吸光度（吸光度測定法）、蛍光量（蛍光量測定法）又は発光量（化学発光量測定法）として測定できる。例えば、酵素がペルオキシダーゼの場合、基質としては2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ニアンモニウム(ABTS)（吸光度測定法）及びルミノール/過酸化物質（化学発光量測定法）等を選択できる。酵素がアルカリフォスファターゼの場合、基質としてはp-ニトロフェニルフォスフェート（吸光度測定法）、4-メチルウンベリフェリルリン酸(4-MUP)（蛍光量測定法）及び3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''-ホスホリルオキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタン・二ナトリウム(AMPPD)（化学発光量測定法）等を選択できる。吸光度は分光光度計、蛍光量及び化学発光量は光電子増倍管により定量される。これらのうち、化学発光量測定法が好ましく（すなわち、本発明の試薬キットを用いて自己抗体を定量する方法としては化学発光酵素免疫測定法が好ましい。）、さらに好ましくはペルオキシダーゼとルミノール/過酸化物質との組合せ又はアルカリフォスファターゼとAMPPDとの組み合わせによる化学発光量測定法である。

10

【0031】

ルミノールとしては、ルミノール、イソルミノール、N-アミノヘキシル-N-エチルイソルミノール(AHEI)、N-アミノブチル-N-エチルイソルミノール(ABEI)及びこれらの金属塩等が含まれる。これらの金属塩としては、アルカリ金属(ナトリウム及びカリウム等)塩及びアルカリ土類金属(カルシウム及びマグネシウム等)塩等が使用できる。これらのうち、ルミノール及びルミノールの金属塩が好ましく、さらに好ましくはルミノールの金属塩、特に好ましくはルミノールのナトリウム塩である。過酸化物質としては、無機過酸化物質及び有機過酸化物質のいずれも使用できる。無機過酸化物質としては、過酸化水素、過ホウ酸ナトリウム、過ホウ酸カリウム、過酸化酸、過酸化炭酸、過酸化二炭酸、次亜塩素酸、次亜塩素酸カリウム、亜塩素酸、塩素酸、塩素酸ナトリウム、過塩素酸、過臭素酸、ペルオクソ硫酸及びペルオクソリン酸等が挙げられる。有機過酸化物質としては、過酢酸、過プロピオン酸、ジメチルスルホキシド(DMSO)、トリエチルアミノオキシド、メチルジエチルアミノオキシド及び過酸化フタロイル等が挙げられる。これらのうち、保存安定性等の観点から、無機過酸化物質が好ましく、さらに好ましくは過酸化水素である。

20

30

【0032】

本発明の免疫測定用試薬キットには、蛋白質(P)と水不溶性担体(B)とが結合してなる試薬(本発明の免疫測定用試薬)に好ましくは抗ヒトイムノグロブリンを含む試薬を加えて、さらに免疫反应用緩衝液、B/F分離用緩衝液及びコントロール試料等を含むことができる。免疫反應用緩衝液及びB/F分離用緩衝液としては従来免疫測定に使用される緩衝液等が使用でき、蛋白、塩及び/又は界面活性剤等を含有するリン酸緩衝液及びグッド(Good)の緩衝液等が使用できる。蛋白、塩及び界面活性剤としては上記と同じものが挙げられる。

40

【0033】

コントロール試料は、検体に産物(R)に対する自己抗体が存在するかを判断するための比較試料として用いるものであり、通常、自己抗体を含まない試料(陰性コントロール)及び自己抗体を含む試料(陽性コントロール)が用意される。陰性コントロールとしては、免疫反應用緩衝液と同様な蛋白等を含有した緩衝液、産物(R)に対する自己抗体を保有しないヒトプール血清等が使用できる。陽性コントロールとしては、p16遺伝子産物に対する自己抗体を保有するヒトプール血清、及び産物(R)に対する自己抗体を含む血清を添加した緩衝液(免疫反應用緩衝液と同様な蛋白等を含有)等が使用できる。

【0034】

50

本発明の免疫測定用試薬キットで測定される検体は、ヒト由来の体液であれば特に限定されず、血液、尿、唾液、リンパ液、胆汁、胃液及び膵液等が挙げられ、さらに生体から採取された組織のホモジネート抽出液等も用いることができる。これらのうち、血液及び尿が好ましく、さらに好ましくは血液（全血、血清又は血漿等を含む）である。

【0035】

本発明の試薬キットを用いた産物（R）に対する自己抗体を検出する方法（サンドイッチ測定法）の具体例（工程1～6）を以下に示す。

工程1．検体と、蛋白質（P）及び水不溶性担体（B）が結合されてなる免疫測定用試薬（本発明の免疫測定用試薬）とを反応させて反応混合物（工程2の複合体1を含む）を得る。

工程2．工程1の反応混合物から未反応物を除き（B/F分離）、複合体1を得る。

工程3．工程2で得られた複合体1と、標識化合物で標識された抗ヒトイムノグロブリン抗体とを反応させて反応混合物（工程4の複合体2を含む）を得る。

工程4．工程3の反応混合物から未反応物を除き（B/F分離）、複合体2を得る。

工程5．複合体2の標識化合物の量を測定する。

工程6．標識化合物の量を用いて、基準値（陰性コントロール及び/又は陽性コントロール）と比較し、自己抗体の有無を判定する。

【0036】

検体中の産物（R）に対する自己抗体の有無を判断する工程（上述の例では工程6）において、検体である血液に対する抗ヒトイムノグロブリン抗体量（抗ヒトイムノグロブリンに標識された標識化合物量として測定される）と、複数の健常人の血液での抗ヒトイムノグロブリン量（抗ヒトイムノグロブリンに標識された標識化合物量として測定される）から設定される基準値とを比較することにより自己抗体の有無を判定することが好ましい。基準値の設定方法は、例えば「臨床検査薬ガイド1999～2000、p64～71、文光堂（1999）」、「臨床検査データブック1997-1998、p8～13、医学書院（1997）」に記載された方法で行うことができる。すなわち複数の健常人（少なくとも50人以上、好ましくは120人以上）を測定し、標識化合物量を求める（化学発光酵素免疫測定法の場合、発光量となる）。標識化合物量を統計処理〔パラメトリック法、ノンパラメトリック法等〔パラメトリック法は母集団が正規分布（べき乗変換しても可）を示す場合に使用し、ノンパラメトリック法は母集団が正規分布しない場合に使用される。〕〕し、標本群の95%を含む範囲を求める基準範囲とし、上限を上限基準値、下限を下限基準値と設定する。従って、上限基準値を越えた検体については自己抗体を有する可能性が高いが、5%の確率で健常人でも越える場合がある。これを防ぐため、通常は上限基準値にさらに係数を乗じ、及び/又は付加したカットオフ値を設定することが行われる。すなわちカットオフ値を超えた検体を自己抗体が有るものとして判定する。カットオフ値の設定は、上限基準値と産物（R）に対する自己抗体を有する検体の分布下限の値との関係で設定するが、通常は上限基準値の1.5～3倍程度の値である。

【0037】

上述の陰性コントロール及び陽性コントロールは、設定したカットオフ値を簡易に再現できるように調製したものである。例えば、陰性コントロールの測定値（標識化合物量）の3倍がカットオフ値となる、陰性コントロールと陽性コントロールの平均値がカットオフ値となる等、の設定が可能である。

【実施例】

【0038】

以下、実施例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

<作成例1> p16遺伝子産物（GST融合蛋白質）の作製

インターナショナル ジャーナル オブ オンコロジー（Int.J.Oncology）、19、1035頁、2001年に記載の方法に準じて、GST（グルタチオンSトランスフェラーゼ）との融合蛋白質を以下の通り作製した。

10

20

30

40

50

【0039】

1. p16 遺伝子の調製

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 { Human Umbilical Vein Endothelial Cell (フナコシ社より購入) } から RNA を抽出した。抽出は、AGPC (Acetate buffer, Guanidinium thiocyanate, phenol, chloroform) 法を用いて、次のようにして行った。

【0040】

(AGPC 法試薬の調製)

(1) 1 M クエン酸ナトリウム (pH 7.0) の調製

クエン酸三ナトリウムの 29.4 g を蒸留水 80 ml に溶解した後、クエン酸を加えて、pH 7.0 にあわせた後、25 で蒸留水を加えて 100 ml とした。そして、オートクレーブ滅菌 (120、20 分) してから使用した。 10

(2) D 液の調製

GTC (グアニジウムチオシアネート) 236.3 g (4 M)、ザルコシル (L-Lauroylsarcosine) 2.5 g (0.8 重量%)、1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 12.5 ml (25 mM) 及び蒸留水 250 ml を 85 で均一溶解した後、室温 (25) に戻し、蒸留水で 496 ml にあわせた。細孔径 0.45 µm ボトルトップフィルターで濾過して保存した。使用時にこの保存溶液 50 ml に対して 2-メルカプトエタノール 360 µl (0.1 M) を加え、D 液とした。

(3) 2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) の調製

酢酸ナトリウム・トリハイドレート 27.2 g を蒸留水 10 ml に溶解させた後、酢酸を用いて pH 4.0 にあわせ、25 で蒸留水を加えて 100 ml とした。細孔径 0.45 µm ボトルトップフィルターで濾過して使用した。 20

【0041】

(AGPC 法の操作)

(1) チューブに D 液 0.5 ml を加え、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を分散し、細胞を破壊した。

(2) さらに、2 M 酢酸ナトリウム 50 µl、フェノール 0.5 ml 及びクロロホルム/イソアミルアルコール (体積比 49/1) 100 µl を順次加え、1 種類いれるごとに、チューブを 2 ~ 3 回振り、混ぜた。

(3) 10 秒間激しく混ぜた後、15 分間氷冷した。 30

(4) 遠心加速度 10,000 G で 10、20 分間遠心した後、下部に分離した水層を、DNA を含む中間層が混入しないように、別のチューブに分取した。

(5) 分取した水層に、イソプロパノール 0.5 ml を加え、-20 で 1 時間冷やした。次に、10 分間遠心 (10,000 G、0) し、RNA を沈殿させた。

(6) 沈殿した RNA を 0.5 ml の D 液に再び溶解し、イソプロパノール 0.5 ml を加え、-20 で 1 時間置いた。

(7) 遠心して RNA を沈殿させ、沈殿を 80 重量% エタノール水溶液 1 ml で洗い、乾燥させた後、水に溶解した。

【0042】

このようにして抽出した RNA から、商品名「レディ-トゥ-ゴウ RT-PCR ビーズ」 (Ready-To-Go RT-PCR Beads, アマシャム社) を使用して、cDNA の合成及び増幅を行った。すなわち、レディ-トゥ-ゴウ RT-PCR ビーズに RNA 及び表 1 の作成例 1 記載のアミノ酸配列に対応した 3' プライマー溶液を加え、42、1 時間反応した後、95、5 分間加温処理し、cDNA を合成した。引き続き、cDNA を含む反応液に 5' プライマーを加え、PCR (ポリメラーゼチェーンリアクション) をデナチュレーション反応 (95、1 分)、アニーリング反応 (60、1 分)、伸長反応 (72、1 分) の条件で PCR 用サーマルサイクラー (MP PCR サーマルサイクラー、宝酒造製) を用いて 30 サイクルで行い、増幅された cDNA を得た。 40

【0043】

2. 組み換え遺伝子の作成及び発現

得られた c D N A を発現用ベクター p G E X - 4 T - 3 (アマシャム社より購入) の B a m H I / E c o R I 部位にモレキュラークローニング, ア ラボラトリー マニュアル 第 2 版 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed), 1 9 8 9 年記載の方法で組み込んだ。シークエンス法にて c D N A の挿入方向が正しく組み込まれていることを確認した後、大腸菌 B L 2 1 (D E 3), L y s S (N o v a g e n 社) にトランスフォーム後、0.1 mM のイソプロピルチオベータガラクトシド (I P T G) を含む培地にて 3 7、2 時間誘導をかけた。超音波破碎により調製した大腸菌の細胞ライゼイトより目的の融合蛋白質をグルタチオン結合アフィニティーゲル (商品名 : グルタチオンセファロース 4 B、アマシャム社製) を用いたアフィニティークロマトグラフィー法にて精製 (溶出液 : 1 0 m M の還元型グルタチオンを含む 0.02 M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン / 塩酸緩衝液) し、G S T 融合蛋白質 G S T 1 { 配列番号 (1) のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質 } を調製した。

10

【 0 0 4 4 】

< 作成例 2 ~ 1 2 >

表 1 に示した 3' プライマー及び 5' プライマーを使用した以外は作成例 1 と同様にし、G S T 融合蛋白質 (G S T 2 ~ 1 2) を調製した。

【 0 0 4 5 】

【 表 1 】

		GST融合蛋白質	構成単位となるアミノ酸配列の配列番号	3' プライマーの塩基配列の配列番号	5' プライマーの塩基配列の配列番号
作成例	1	GST1	(1)	(25)	(26)
	2	GST2	(2)	(27)	(28)
	3	GST3	(3)	(29)	(30)
	4	GST4	(4)	(31)	(32)
	5	GST5	(7)	(33)	(26)
	6	GST6	(9)	(25)	(34)
	7	GST7	(12)	(35)	(28)
	8	GST8	(14)	(27)	(36)
	9	GST9	(17)	(37)	(30)
	10	GST10	(19)	(29)	(38)
	11	GST11	(22)	(39)	(32)
	12	GST12	(24)	(31)	(40)

20

30

【 0 0 4 6 】

< 実施例 1 >

1. G S T 1 結合ビーズの作成

1 重量 % γ - アミノプロピルトリエトキシシラン含有アセトン溶液 2 0 m L の入った蓋付きポリエチレン瓶に直径 3.2 m m のガラスビーズ (イムノケミカル社製) 1 0 0 0 個を加え、1 時間、2 5 で反応させ、反応残液をアスピレーターで吸引除去した。

40

次いで脱イオン水 2 0 m L を加えて蓋をし、ポリスチレン瓶をゆっくりと 2 回倒置攪拌したのち、液をアスピレーターで吸引除去してガラスビーズを洗浄した。この洗浄操作を 3 回行った。

次いで、この洗浄後のガラスビーズ 1 0 0 0 個を 2 重量 % グルタルアルデヒド含有水溶液 2 0 m L の入った蓋付きポリエチレン瓶に加えて、1 時間、2 5 で反応させ、反応残液をアスピレーターで吸引除去した。そして、脱イオン水 2 0 m L を加えて蓋をし、ポリスチレン瓶をゆっくりと 2 回倒置攪拌したのち、液をアスピレーターで吸引除去してガラスビーズを洗浄した。この洗浄操作を 3 回行った。

さらにこの洗浄後のガラスビーズ 1 0 0 0 個を G S T 1 を 2 0 μ g / m L の濃度で含む 0.02 M リン酸緩衝液 (p H 8.7) 2 0 m L の入った蓋付きポリエチレン瓶に加えて、1 時間、2 5 で反応させた。

反応後、G S T 1 含有リン酸緩衝液を除去し、2 0 m L の 0.1 重量 % 牛血清アルブミ

50

ン含有リン酸緩衝液 (pH 7.2) に 4、8 時間浸漬した。その後、緩衝水溶液をアスピレーターで吸引除去し、20 mL の 0.1 重量% 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液 (pH 7.2) でビーズを 2 回洗浄した。その後、10 重量% のショ糖を含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) に 30 分間浸漬した後、リン酸緩衝液をアスピレーターで除き、ビーズをろ紙上に撒き室温 (約 25) で風乾し、GST 融合蛋白質結合ビーズ 1 (本発明の免疫測定用試薬 1) を調整し、乾燥剤 (シリカゲル) を入れた密閉容器中で冷蔵 (2 ~ 10) 保存した。

【0047】

2. 免疫反应用緩衝液の作成

0.02 M のリン酸緩衝液 (pH 8.0) に、カゼインを 3 g/L 及び塩化ナトリウムを 8.5 g/L の濃度になるように添加し、免疫反应用緩衝液を作成した。使用時まで冷蔵 (2 ~ 10) 保存した。

【0048】

3. ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体の作成

抗ヒトイムノグロブリンポリクローナル抗体 (ダコジャパン (株) 製) 及び西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (東洋紡 (株) 製) を用い、文献 [エス・ヨシタケ、エム・イマガワ、イー・イシカワ、エトール; ジェイ・バイオケム, Vol. 92 (1982 年) 1413 - 1424 頁] に記載の方法でペルオキシダーゼ標識抗 β 2 - マイクログロブリンポリクローナル抗体 [1 mg/mL の蛋白質濃度である 0.02 M のリン酸緩衝液 (pH 6.0) の溶液] を調製し、冷凍 (-30) 保存した。

【0049】

4. 酵素標識抗体液の作成

上記で作成した免疫反应用緩衝液及びペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いて次の通り酵素標識抗体液を作成した。すなわち、免疫反应用緩衝液 100 mL にペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を蛋白量で 100 μ g 添加し、攪拌混合し、これを酵素標識抗体液とした。

【0050】

5. 過酸化水素液の調製

200 μ l の 35 重量% 過酸化水素水を脱イオン水 1 リットルに溶解し、過酸化水素水とした。使用するまで冷蔵 (2 ~ 10) 保存した。

【0051】

6. 基質液の調製

ルミノール (東京化成製) 0.18 g 及び 4 - (シアノメチルチオ) フェノール 0.1 g (三新化学製) を 0.1 M (モル/L)、pH 8.5 のトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン / 塩酸緩衝液 1 リットルに溶解した。使用するまで遮光、冷蔵 (2 ~ 10) 保存した。

【0052】

< 実施例 2 ~ 10 >

1. GST 融合蛋白質結合ビーズの作成

GST 1 に換えて、表 2 に示した GST 融合蛋白質を用いた以外実施例 1 と同様にして、GST 融合蛋白質結合ビーズ 2 ~ 10 (本発明の測定用試薬 2 ~ 10) を調整し、乾燥剤 (シリカゲル) を入れた密閉容器中で冷蔵 (2 ~ 10) 保存した。

なお、複数の GST 融合蛋白質を組み合わせて使用する場合 (実施例 5 ~ 10)、各 GST 融合蛋白質の量は同じとし、総量が 20 μ g/mL になるようにした。また、免疫反应用緩衝液、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体、酵素標識抗体液、過酸化水素液及び基質液は、実施例 1 で作成したものをを用いた。

【0053】

< 実施例 11 >

健常人プール血清及び癌患者血清を測定した例である。

1. 検体

健常人ボランティア50名から採取した血清を各0.2mLずつ混合し、健常人プール血清10mLを作成し検体1とした。又、癌患者から得た血清(患者1~3)を各10mLを用意し検体2~4として用いた。

【0054】

2. 免疫反応操作

12×75mm試験管中に、免疫測定用緩衝液300μL、検体1(健常人プール血清)10μL、及びGST融合蛋白質結合ビーズ1個を加え、37℃で、10分間反応させた。反応残液をアスピレーターで除去した後、生理食塩水2mLを加えてビーズを洗浄し、洗浄液をアスピレーターで除去した。さらに生理食塩水2mLを加えて同様に洗浄した。次に、酵素標識抗体液300μLを、洗浄後のビーズに加え37℃、10分反応させた。反応液をアスピレーターで除去し、生理食塩水2mLを加えてビーズを洗浄し、洗浄液をアスピレーターで除去した。さらに生理食塩水2mLを加えて同様に2回洗浄した。洗浄後のビーズについて、次のようにして酵素活性の測定を行った。また、検体2~4についても同様にして酵素活性の測定を行った。

10

【0055】

3. 酵素活性測定操作

洗浄後のビーズが入った試験管(12×75mm)をアロカ社製ルミネッセンスリーダーBLR-201型のサンプルホルダーにセットし、基質液200μL及び過酸化水素水200μLを加えて化学発光反応を開始した。発光反応開始40秒後から10秒間の発光量を積算計測し、これを酵素活性を示す発光量とした。

20

【0056】

4. 測定結果

発光量の測定結果を表2に示した。なお、表2中の数値は、上段が発光量を示し、下段は健常人プール血清の発光量を1.0としたときの各発光量の相対値(S/N比)である。

癌遺伝子産物のアミノ酸配列全体を用いた場合より、N末端及びC末端を含む配列を組み合わせる方が、感度(S/N比)が高いことが判った(例えば、実施例1と実施例5の比較、実施例9と実施例10の比較等)。また、単独の癌抑制遺伝子に対応するGST融合蛋白質を用いた場合(実施例1~8)、癌患者でも測定発光量が健常人プール血清と同じ場合があるが、複数の癌抑制遺伝子に対応するGST融合蛋白質を組み合わせる場合(実施例9及び10)、測定発光量が全ての患者血清で高くなった。従って、患者血清では個別のGST融合蛋白質に対して反応性が低い場合があっても、複数の癌抑制遺伝子に対応するGST融合蛋白質を組み合わせることにより特異性が向上することが判る。

30

【0057】

【表 2】

		G S T融合蛋白質	測定発光量 (c p s)			
			健常人プール 血清	患者1血清	患者2血清	患者3血清
実 施 例	1	GST1	6476 1.0	12533 1.9	6638 1.0	13847 2.1
	2	GST2	6349 1.0	6542 1.0	19571 3.1	8357 1.3
	3	GST3	6529 1.0	6467 1.0	6268 1.0	10701 1.6
	4	GST4	6832 1.0	11809 1.7	6568 1.0	6264 0.9
	5	GST5, GST6	4758 1.0	11419 2.4	5129 1.1	13322 2.8
	6	GST7, GST8	4478 1.0	4852 1.1	20986 4.7	8586 1.9
	7	GST9, GST10	4628 1.0	4507 1.0	4770 1.0	12033 2.6
	8	GST11, GST12	4628 1.0	12107 2.6	4570 1.0	4733 1.0
	9	GST1, GST2, GST3 GST4	6628 1.0	11107 1.7	10570 1.6	11033 1.7
	10	GST5, GST6, GST7, GST8, GST9, GST10, GST11, GST12	4628 1.0	10695 2.3	11308 2.4	12403 2.7

10

20

【 0 0 5 8 】

< 比較例 1 >

本比較例は従来技術による方法で測定を行った例である。

1. G S T 融合蛋白質のブロッキング

作成例 1 ~ 4 で作成した G S T 1 ~ G S T 4 の各 1 μ g をファルマシア社製「ファストシステム (PhastSystem)」を用いて S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びニトロセルロースフィルターへのブロッキングを行った。電気泳動は、ゲルとしてファルマシア社製「ファストゲルホモジニアス (PhstGel Homogeneous) 1 2 . 5」、泳動バッファ

ーとしてファルマシア社製「ファストゲルスディエスバッファーストリップ (PhstGel SD S Buffer Strips)」を用い、温度 1 5 、電圧 2 5 0 V、泳動 2 時間で行った。泳動したゲルから G S T 蛋白質をファルマシア社製「ファストトランスファー (PhstTransfer) セミドライブロッキング」を用いてニトロセルロースメンブレン (ミリポア社製) にブロッキングした。ブロッキングバッファは、1 9 2 m M グリシン及び 1 0 容量 % メタノールを含む 2 5 m M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (p H 8 . 3) を用いた。ブロッキングは、温度 1 5 、電圧 2 0 V、泳動 3 0 分で行った。

30

【 0 0 5 9 】

2. 検体中の自己抗体の検出

このメンブレンを 5 重量 % 脱脂粉乳含有 0 . 0 2 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 0) に室温 (2 5) で 8 時間浸した。メンブレンを取り出し、検体 1 (健常人プール血清) を 5 重量 % 脱脂粉乳含有 0 . 0 2 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 0) で 4 0 0 倍に希釈した溶液に浸漬し、2 5 、3 時間反応させた。次いでフィルターを取り出し、0 . 1 重量 % T w e e n 2 0 含有 0 . 0 2 M リン酸緩衝液 (7 . 0) に 2 5 、1 時間振とうしながら放置した後、液をアスピレーターで除くことによりフィルターを洗浄した。この洗浄を 3 回実施した。洗浄したフィルターを実施例 1 で作成した酵素標識抗体液に浸漬し、2 5 、1 時間反応した。上述の洗浄を同様に 6 回行った。洗浄したフィルターを 5 0 m g の 3 , 3 ' - ジアミノベンジジンを含む 1 0 0 m L の 0 . 0 5 M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン / 塩酸緩衝液 (p H 7 . 6) に浸漬し、2 5 、1 0 分反応した。上述の洗浄を 5 回 (ただし放置時間は 1 0 分) 行った後、フィルターを 2 5 で風乾した後、生じた発色バ

40

50

ンドを目視で確認した。また、検体 2 ～ 4（癌患者 1 ～ 3 の血清）についても同様にして、発色バンドを目視確認した。

【 0 0 6 0 】

3. 評価

健常人プール血清の場合のバンド（ほとんど生じないか、極弱い）と比較して、健常人プール血清と同じ程度の場合を -、僅かに強い場合を ±、強い場合を + で表した結果を表 3 に示した。実施例 8 で明らかに S / N 差がある場合でも、比較例 1 では - あるいは ± 判定となる場合があった。また、比較例 1 の判定は目視による主観的な判断であり、判定者によって結果が異なる恐れがあるほど微妙なものであった。一方、本発明の方法は、実施例 11 で示したように数値として明確に測定できるため、こういった問題は無い。

10

【 0 0 6 1 】

【表 3】

G S T 融合蛋白	発色バンド（目視確認）		
	患者1血清	患者2血清	患者3血清
GST1	±	—	+
GST2	—	+	±
GST3	—	—	—
GST4	±	—	—

20

【 0 0 6 2 】

< 実施例 12 >

複数の健常人血清を測定して基準値を求め、カットオフ値を設定し、癌患者 10 名からの血清を測定し、産物（R）に対する自己抗体の有無を判断した例である。

【 0 0 6 3 】

1. 検体の測定

実施例 10 で調製した G S T 融合蛋白質（G S T 5，G S T 6，G S T 7，G S T 8，G S T 9，G S T 10，G S T 11 及び G S T 12）結合ビーズ 10 を用いて、実施例 11 の方法と同様にして、健常人ボランティア 120 名からの血清検体及び実施例 11 の検体 1（健常人プール血清）を測定した。

30

健常人ボランティア 120 名の測定値（発光量）の分布を図 1 に示した。なお、図の横軸は発光量（cps）であり、点は検体の分布（1 点が 1 検体に対応）を示す。

【 0 0 6 4 】

2. カットオフ値の設定

健常人ボランティア 120 名からの血清検体及び検体 1 の測定値（発光量）を統計処理ソフト「STATFLEX v. 4. 1」（アーテック社製）を用いて分布型を解析した結果、発光量分布は、歪度 0. 72、尖度 5. 23 であった。なお、この分布は正規分布していなかった。ノンパラメトリック法で 95 % の信頼区間を求めたところ、基準値は、発光量 3013 ～ 6855 であった。ここで上限発光量の 1. 5 倍の発光量をカットオフ値と設定すると、発光量 10283 であった。この時、検体 1（健常人プール血清）の発光量は 4738 であり、カットオフ値の 1 / 2. 17 であった。従って、検体 1（健常人プール血清）を、陰性コントロールとして測定した場合、カットオフ値 = 「健常人プール血清測定発光量」 × 2. 17 と設定された。

40

【 0 0 6 5 】

3. 検体の測定

癌患者 10 名（患者 4 ～ 13）から採取した血清検体 5 ～ 14 及び陰性コントロールとして実施例 8 で作成した検体 1（健常人プール血清）を測定した。測定は、実施例 10 の G S T 融合蛋白質結合ビーズ 10 を用いて実施例 11 と同様に行なった。

【 0 0 6 6 】

4. 判定結果

50

検体 1 (健常人プール血清) を陰性コントロールとし、上記 2 で設定した係数でカットオフ値 (「健常人プール血清測定発光量」 × 係数) を求めた。発光量がカットオフ値以上 (カットオフ比 1 . 0 以上) の測定値を自己抗体陽性、一方、発光量がカットオフ値未満 (カットオフ比 1 . 0 未満) の測定値を自己抗体陰性と判断した。これらの結果を表 4 に示した。

【 0 0 6 7 】

【表 4】

検体	発光量(cps)	カットオフ比	判定
健常人プール血清	4738	—	—
患者 4	14342	1. 4	陽性
患者 5	8462	0. 8	陰性
患者 6	36704	3. 6	陽性
患者 7	6730	0. 7	陰性
患者 8	12206	1. 2	陽性
患者 9	9234	0. 9	陰性
患者 1 0	34678	3. 4	陽性
患者 1 1	6864	0. 7	陰性
患者 1 2	19002	1. 8	陽性
患者 1 3	18348	1. 8	陽性
カットオフ値	10283	1. 0	—

10

20

【 0 0 6 8 】

表 4 から、癌患者では高頻度 (1 0 人中 6 人) で産物 (R) に対する自己抗体が陽性と判定された。本発明の方法が、癌の診断に有用である可能性が示された。

【 0 0 6 9 】

< 作成例 1 3 ~ 2 0 >

表 5 に示した 3 ' プライマー及び 5 ' プライマーを使用した以外は作成例 1 と同様にして、GST 融合蛋白質 (GST 1 3 ~ 2 0) を調製した。

30

【 0 0 7 0 】

【表 5】

	GST融合蛋白質	構成単位となるアミノ酸配列の配列番号	3'プライマーの塩基配列の配列番号	5'プライマーの塩基配列の配列番号
作成例	13 GST13	(5)	(41)	(26)
	14 GST14	(6)	(25)	(45)
	15 GST15	(10)	(42)	(28)
	16 GST16	(11)	(27)	(46)
	17 GST17	(15)	(43)	(30)
	18 GST18	(16)	(29)	(47)
	19 GST19	(20)	(44)	(32)
	20 GST20	(21)	(31)	(48)

40

【 0 0 7 1 】

< 実施例 1 3 ~ 2 5 >

1 . p 1 6 遺伝子産物 (GST 融合蛋白質) 結合ビーズの作成

GST 1 に換えて、表 6 に示した GST 融合蛋白質を用いた以外実施例 1 と同様にして、GST 融合蛋白質結合ビーズ 1 3 ~ 2 5 (本発明の測定用試薬 1 3 ~ 2 5) を調整し、乾燥剤 (シリカゲル) を入れた密閉容器中で冷蔵 (2 ~ 1 0) 保存した。

なお、複数の GST 融合蛋白質を組み合わせて使用する場合 (実施例 2 1 ~ 2 5) 、各 GST 融合蛋白質の量は同じとし、総量が 2 0 μ g / m L になるようにした。また、免疫

50

反作用緩衝液、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体、酵素標識抗体液、過酸化水素液及び基質液は、実施例 1 で作成したものをを用いた。

【 0 0 7 2 】

< 実施例 2 6 >

実施例 1 1 と同様にして、検体を測定し表 6 に示した（表 6 中の数値は、上段が発光量を示し、下段は健常人プール血清の発光量を 1 . 0 としたときの各発光量の相対値である。）

癌患者では、測定発光量が健常人プール血清の発光量より高く、発光量比（表中下段の数値で、各測定発光量を健常人プール血清の測定発光量で除した値）が大きいことが判る。又、患者血清では個別の G S T 融合蛋白質に対して反応性が低い場合があっても、複数の G S T 融合蛋白質を組み合わせることにより感度が向上することが判る。

10

【 0 0 7 3 】

【表 6】

		G S T 融合蛋白質	測定発光量 (c p s)			
			健常人プール血清	患者1血清	患者2血清	患者3血清
実 施 例	13	GST13	6753 1.0	11615 1.7	7766 1.1	10737 1.6
	14	GST14	6024 1.0	9102 1.5	7349 1.2	9096 1.5
	15	GST15	6818 1.0	7159 1.1	13970 2.0	9000 1.3
	16	GST16	6129 1.0	6374 1.0	11744 1.9	6730 1.1
	17	GST17	6309 1.0	6391 1.0	6620 1.0	8833 1.4
	18	GST18	5524 1.0	6291 1.1	6016 1.1	7955 1.4
	19	GST19	5948 1.0	8386 1.4	6067 1.0	6543 1.1
	20	GST20	5298 1.0	8160 1.5	5510 1.0	5803 1.1
	21	GST13, GST14, GST2, GST3, GST4	6113 1.0	9353 1.5	11187 1.8	11247 1.8
	22	GST1, GST2, GST3, GST11, GST12	5923 1.0	9596 1.6	9713 1.6	10073 1.7
	23	GST1, GST2, GST4, GST9, GST10	6423 1.0	11047 1.7	9830 1.5	12330 1.9
	24	GST13, GST14, GST15, GST16, GST17, GST18, GST11, GST12	6333 1.0	12286 1.9	13616 2.1	14195 2.2
	25	GST13, GST14, GST7, GST8, GST17, GST18, GST11, GST12	6223 1.0	12694 2.0	13318 2.1	14562 2.3

20

30

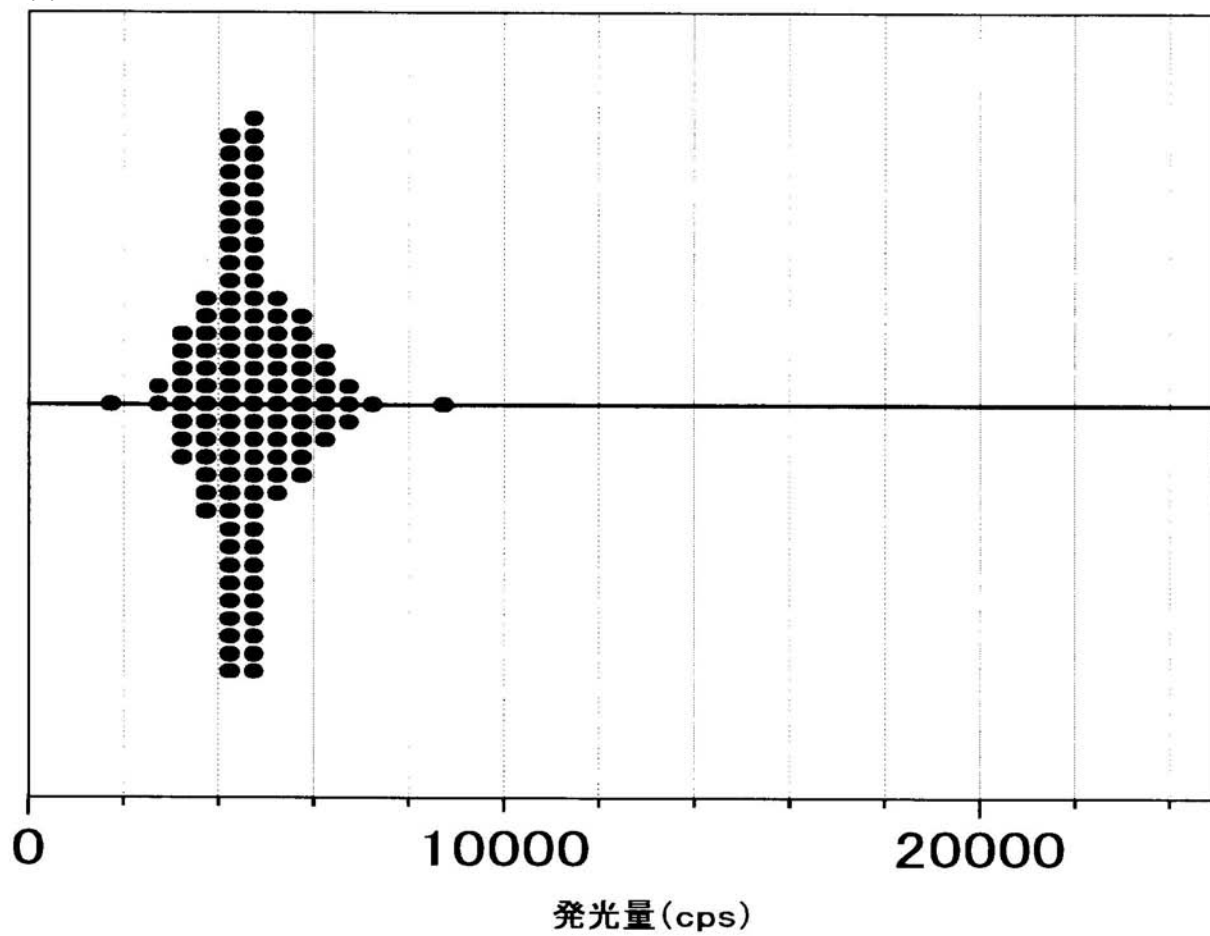
40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 4 】

【図 1】 G S T 融合蛋白質結合ビーズ（本発明の免疫測定用試薬 7）を用いて、健常人ボランティア 1 2 0 名の血清について測定した発光量の分布を示したグラフである（実施例 9）。

【図 1】



【配列表】

2004286737000001.app

专利名称(译)	用于检测针对p16基因家族中包含的肿瘤抑制基因产物的自身抗体的免疫测定试剂		
公开(公告)号	JP2004286737A	公开(公告)日	2004-10-14
申请号	JP2004059413	申请日	2004-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
[标]发明人	國近誠		
发明人	國近 誠		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76 G01N33/574		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.M G01N21/76 G01N33/574.Z		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/CA21 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/GA09		
优先权	2003057444 2003-03-04 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种免疫测定试剂，其能够简单且高度灵敏且可再现地检测针对p16基因家族所含肿瘤抑制基因产物的自身抗体。用于检测针对p16基因家族中所包括的肿瘤抑制基因产物（R）的自身抗体的免疫测定试剂，其具有SEQ ID NO：（1）至（4）中任一个的氨基酸序列一种免疫分析试剂，其特征在于，具有所包含的氨基酸序列作为结构单元的蛋白质（P）和水不溶性载体（B）相互结合。另外，优选使用含有该试剂和抗人免疫球蛋白抗体（优选用酶等标记化合物标记）的免疫分析试剂盒。[选择图]无

【表1】

		GST融合 蛋白質	構成単位とな るアミノ酸配 列の配列番号	3'プライマーの 塩基配列の 配列番号	5'プライマーの 塩基配列の 配列番号
作 成 例	1	GST1	(1)	(25)	(26)
	2	GST2	(2)	(27)	(28)
	3	GST3	(3)	(29)	(30)
	4	GST4	(4)	(31)	(32)
	5	GST5	(7)	(33)	(26)
	6	GST6	(9)	(25)	(34)
	7	GST7	(12)	(35)	(28)
	8	GST8	(14)	(27)	(36)
	9	GST9	(17)	(37)	(30)
	10	GST10	(19)	(29)	(38)
	11	GST11	(22)	(39)	(32)
	12	GST12	(24)	(31)	(40)