

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-527523

(P2007-527523A)

(43) 公表日 平成19年9月27日(2007.9.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 4
CO 7 K 16/40 (2006.01)	CO 7 K 16/40	4 H O 4 5
GO 1 N 33/532 (2006.01)	GO 1 N 33/532 Z	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

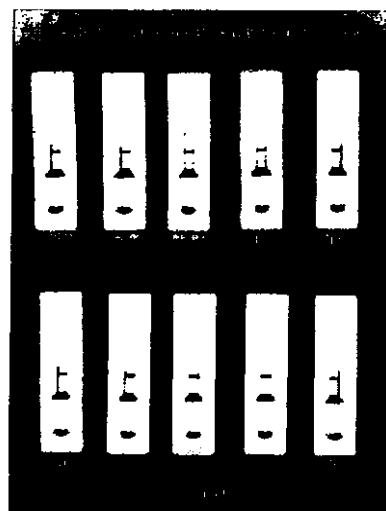
(21) 出願番号	特願2006-518805 (P2006-518805)	(71) 出願人	500584309 シンジェンタ パーティシペーションズ アクチェンゲゼルシャフト スイス国, ツェーハー 4058 バーゼル, シュバルツバルトアレー 215
(86) (22) 出願日	平成16年7月2日(2004.7.2)	(71) 出願人	506008803 ゼイトウニ, リリアン アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27 709, リサーチ トライアングル パーク, コーンウォーリス ロード 3054
(85) 翻訳文提出日	平成18年3月1日(2006.3.1)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/021396	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(87) 国際公開番号	W02005/014847		
(87) 国際公開日	平成17年2月17日(2005.2.17)		
(31) 優先権主張番号	60/485, 602		
(32) 優先日	平成15年7月7日(2003.7.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 飼料用酵素を検出するための試薬、方法、及びキット

(57) 【要約】

本発明は、免疫学の分野に関し、より具体的には、特に飼料用酵素における、タンパク質及び酵素を検出するための、イムノアッセイ法、例えば、ELISA法、及びイムノストリップアッセイ、キット、及び試薬に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の飼料用酵素の検出のためのイムノアッセイであって、

a) 一次抗体 - 飼料用酵素複合体が形成するように、抽出物中の飼料用酵素を免疫学的に認識する一次抗体の存在下において、試料の抽出物を調製する工程；

b) 免疫学的に飼料用酵素を認識可能な所望の二次抗体と結合させることにより、多数の間隙を伴う実質的な容積を形成するように、三次元で有意な寸法を有する固相フォーマットを調製する工程、ここで当該二次抗体は検出手段と接合され、そしてまた当該二次抗体は飼料用酵素を免疫学的に認識する；

d) 工程 (a) の抽出物と工程 (b) の調製したフォーマットを併せ、これにより当該抽出物が、一次抗体 - 飼料用酵素複合体を捕獲している調製された固相フォーマットの間隙を通して引き上げられる工程；

e) 上記捕獲された一次抗体 - 飼料用酵素複合体の存在により飼料用酵素を検出する工程、を含んで成るイムノアッセイ。

【請求項 2】

上記飼料用酵素が、フィターゼ、キシラナーゼ、セルラーゼ、グルカナーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、及び/又はプロテアーゼタンパク質である、請求項 1 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 3】

上記フィターゼが、熱安定性のフィターゼである、請求項 2 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 4】

上記固相フォーマットが、酢酸セルロース、セルロース、ニトロセルロース、又はナイロンである、請求項 1 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 5】

上記固相フォーマットが、重ねられ、且つ連続した複数の層から構成され、ここで各層が異なる飼料用酵素を捕獲することができる、請求項 4 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 6】

上記固相フォーマットの試料吸収パッドを更に含んで成る、請求項 4 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 7】

標識された抗 - 飼料用酵素抗体を含んで成るストリップを更に含んで成る、請求項 6 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 8】

上記検出手段が、金コロイドである、請求項 1 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 9】

請求項 1 に記載のイムノアッセイによる検出のためのキットであって、

a) 試料からの上記飼料用酵素の抽出の手段；

b) 一次抗 - 飼料用酵素抗体を含んで成り、そして免疫学的に飼料用酵素を認識可能な所望の二次抗体と結合させることにより、多数の間隙を伴う実質量を形成するように、三次元において有意な寸法を有する固相フォーマット、ここで当該二次抗体は検出手段と接合し、そしてまた当該二次抗体は飼料用酵素を免疫学的に認識する、を含んで成るキット。

【請求項 10】

バッファーを含む容器を更に含んで成る、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

上記固相フォーマット上で試料を分配する手段を更に含んで成る、請求項 10 に記載のキット。

【請求項 12】

飼料用酵素の検出及び定量化のためのイムノアッセイであって、

a) 当該試料の抽出物を調製する工程；

10

20

30

40

50

b) 抗体 - ポリマー - 抗体複合体を作成するために、当該抽出物の一部を、当該飼料用酵素と結合する一次抗 - 飼料用酵素抗体、固形担体に結合される一次抗体、及び当該飼料用酵素と結合する二次抗 - 飼料用酵素抗体とともにインキュベートする工程；

c) 結合していない二次抗体を除去するために、当該抗体 - ポリマー - 抗体複合体を洗浄する工程；

d) 当該二次抗体と免疫学的に反応する検出抗体を添加する工程、ここで当該検出抗体は標識されている；そして、

e) 当該液体中の水処理ポリマーの濃度を測定するために、結合している又は結合していない標識された抗体の量を測定する工程、
を含んで成るイムノアッセイ。

10

【請求項 13】

上記飼料用酵素が、フィターゼ、キシラナーゼ、セルラーゼ、グルカナーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、及び/又はプロテアーゼタンパク質である、請求項 12 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 14】

上記フィターゼが熱安定性のフィターゼである、請求項 13 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 15】

上記検出可能な標識が酵素である、請求項 12 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 16】

上記酵素が、アルカリ性ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、又は - ガラクトシダーゼである、請求項 15 に記載のイムノアッセイ。

20

【請求項 17】

上記酵素が、不溶性反応生成物を産出する、請求項 16 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 18】

請求項 12 に記載のイムノアッセイによる検出及び定量化のためのキットであって、

a) 試料から当該飼料用酵素を抽出するための手段；

b) 固形支持体に結合する一次抗 - 飼料用酵素抗体を含んで成る固形支持体；

c) 二次 - 飼料用酵素抗体；及び、

d) 二次体と免疫学的に結合可能な検出抗体、ここで当該検出抗体は検出手段で標識されている、を含んで成るキット。

30

【請求項 19】

上記検出手段が酵素である、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

上記検出酵素が、アルカリ性ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、又は - ガラクトシダーゼである、請求項 19 に記載のキット。

【請求項 21】

上記酵素が、可溶性又は不溶性反応生成物を産出する、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 22】

上記酵素のための基質を更に含んで成る、請求項 21 に記載のキット。

【請求項 23】

免疫学的にフィターゼを認識する抗体。

40

【請求項 24】

上記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 23 に記載の抗体。

【請求項 25】

上記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 23 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫学の分野に関し、より具体的には、特に飼料用酵素における、タンパク質及び酵素を検出するための、イムノアッセイ法、例えば、ELISA法、及びイムノス

50

トリップアッセイ、キット、及び試薬に関する。

【0002】

当該出願は、2003年、6月7日に出願された仮米国特許出願第60/485,602号の出願日の利益を主張し、これは本明細書に明細書全体中に組み入れられている。

【背景技術】

【0003】

動物飼料中の酵素の存在を検出するための簡便で、比較的容易なアッセイの有意な必要性が存在する。今日まで、このような検出のための標準的な免疫学的アッセイは存在しない。

【0004】

また、植物が遺伝子改変されているか、又は穀物又は加工食品がGMO形質を含んでいるかを検出することが極めて必要である。当該必要性は、新規のDNA又はタンパク質のいずれかを検出し、且つ定量化することができるテスト方法を必要とする。本発明は、飼料用酵素の検出及び定量化のための免疫学的方法、試薬、及びキットを供することにより当該必要性を満足する。

【発明の開示】

【0005】

試料中の1又は複数の酵素を検出及び測定するための方法、キット、及び試薬が供される。好ましくは、検出されるタンパク質は、制限することなく1又は複数のフィターゼ、キシラナーゼ、セルラーゼ、グルカナーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、及びプロテアーゼを含む。当該タンパク質は、多様な微生物、例えば、制限することなく大腸菌 (*Escherichia coli*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、及びピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 中、又は植物、例えば、制限することなく、トウモロコシ、小麦、稲、アブラナ、及びアルファルファ中で産出される。特に、当該タンパク質は、当該タンパク質をコードする遺伝子を含む飼料中又は遺伝子組み換え植物中で検出される。当該飼料は動物飼料である。当該動物飼料は単胃用又は反芻動物用であってよい。当該飼料はマッシュ飼料及び/又はペレット飼料であってよい。

【0006】

上記試薬は、精製されたタンパク質、及び当該タンパク質に特異的な抗体を含む。好ましい態様において、当該タンパク質はフィターゼである。当該フィターゼタンパク質は、大腸菌 (*E. coli*) 封入体から単離することができ、そしてポリクローナル又はモノクローナル抗体を産出するために動物に投与される。あるいは当該タンパク質は、可溶性の細胞抽出物、例えば、大腸菌 (*E. coli*) 細胞抽出物から単離することができる。

【0007】

上記抗体は、上記タンパク質に高感受性及び特異性を有し、そして動物中又は遺伝子組み換え生物中の酵素活性タンパク質の検出のためのイムノアッセイ法に有用である。

【0008】

上記方法は、本明細書に説明される抗体を利用するイムノアッセイ法であり、そして低濃度のタンパク質を検出することが可能である。当該抗体は精製され、飼料中に存在する他のタンパク質と最小限に反応する。

【0009】

上記抗体及び/又はタンパク質は、タンパク質の検出のための慣習的なイムノアッセイ試薬とキット中でアSEMBLされる。

【0010】

試料中のタンパク質を検出及び測定するための方法、キット、及び試薬が供される。検出されるタンパク質は、1又は複数の飼料用酵素、例えば、フェターゼ、キシラナーゼ、セルラーゼ、グルカナーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、及びプロテアーゼを含む。当該タンパク質は、多様な微生物、例えば、制限することなく大腸菌 (*Escherichia coli*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、及びピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 中で産出することができる。特に、フィターゼタンパク質は、動物飼料中、及び所望

10

20

30

40

50

の飼料用酵素遺伝子、例えば、フィターゼ遺伝子を発現する遺伝子組み換え植物中で検出される。

【0011】

上記試薬は、抗原性ペプチド/タンパク質、及び抗体を含んでよい。当該抗原性ペプチド/タンパク質は、当該抗体と免疫応答性である。当該抗原性ペプチド/タンパク質は、通常、異なる種において産出されるタンパク質により共有される。当該抗原性ペプチド/タンパク質は、単離又は合成され、そして抗体を産出するために動物に投与される。

【0012】

フィターゼのために、上記抗体は、高感受性、及び多様な種において産出されるフィターゼタンパク質に交差反応性を有し、従ってフィターゼ遺伝子を発現するように操作された遺伝子組み換え生物、特に植物の検出のためのイムノアッセイ法において有用である。

10

【0013】

上記方法は、本発明において説明される抗体を利用するイムノアッセイであり、そして動物飼料及び遺伝子増強作物試料中の低濃度のフィターゼタンパク質を検出することが可能である。当該抗体は、フィターゼ遺伝子により発現されたフィターゼ上のエピトープ又は共通のエピトープと免疫反応性であり、そして試料中に存在しうる他のタンパク質と最小限に反応し、したがって試料中、例えば、穀物試料中の遺伝子組み換え生物の存在の正確な検出を供する。

【0014】

エピトープ、抗体、又はその両方は、キット中でタンパク質の検出のための慣習的なイムノアッセイ試薬と集合的にアSEMBLする。当該キットは、任意的にモノクローナル及びポリクローナル抗体の両方、並びに試料中のタンパク質又は飼料用酵素の存在の検出のためのスタンダードを含んでよい。

20

【0015】

上記観点において、試料中の特異的なタンパク質又は飼料用酵素の同定を許容する技術の発展が真に必要とされる。

【0016】

本発明の他の目的、特色、及び有利性は以下の詳細な説明により明らかになるであろう。しかしながら、本発明の精神及び範囲中の多様な変化及び改変は当該詳細な説明から当業者に明らかであるため、当該詳細な説明及び具体的な実施例は、本発明の好ましい態様を示すが、単なる説明として与えられることを理解すべきである。

30

【0017】

開示された態様の詳細な説明

試料中のタンパク質の検出のための方法、キット、及び試薬は本明細書において説明される。好ましくは、当該タンパク質は、飼料用酵素、そしてより好ましくは当該飼料用酵素は、制限することなくフィターゼ、キシラナーゼ、セルラーゼ、グルカナーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、及びプロテアーゼを含む。

【0018】

本発明の方法は、試料、例えば、動物飼料中のいずれかの酵素を検出するために使用することができる。多くの飼料用酵素は当業者に既知である。例えば、いくつかのフィターゼが知られており、その検出は本発明を使用して達成することができる。既知のフィターゼは、制限することなく、表題 "Recombinant Bacterial Phytases and Uses Thereof" である WO 01/90333、表題 "Novel Phytase" である WO 99/08539、表題 "Microbially Expressed Thermotolerant Phytase For Animal Feed" である米国特許出願第10/334,672号、及び表題 "Thermotolerant Phytase for Animal Feed" である米国特許出願第10/334,671号において説明され、これらのそれぞれ及び全ては本明細書全体において引例として組み入れられている。

40

【0019】

遺伝子導入植物中のタンパク質、及びこれらから産出された生成物（食物フラクションを含む）を検出するためにイムノアッセイを行う場合、テストは様々な遺伝子由来のタン

50

パク質を検出する能力を有することが重要である。従って、交差反応性抗体は、成功的な商品の開発に極めて重要である。

【0020】

上記試薬は、共通のエピトープを共有する抗原性タンパク質又はペプチドであり、そして抗タンパク質抗体は異なる遺伝子から発現されたタンパク質と交差反応性であるものである。上記方法は、感受的なタンパク質の特異的な検出のためのイムノアッセイであり、動物飼料中、及び遺伝子改変植物、例えば、農産物中のタンパク質の検出に特異的である。上記キットは、本明細書において説明される抗-タンパク質抗体、及び他の試薬、特に、以下により詳細に説明されるイムノアッセイにおける使用のためのストリップテストフォーマットにおいて使用されるものを含む。

10

【0021】

抗原性タンパク質

組換えタンパク質、例えば、フィターゼの調製のために、適当な宿主株の形質転換、及び適当な細胞密度になるまでの当該宿主株、例えば、細菌、昆虫、又は酵母宿主の成長後、選択したプロモーターを適当な方法（例えば、温度シフト、又は化学誘導）により誘導することができ、そして組換え酵素を産出するために追加期間細胞を培養する。それから細胞は、遠心分離により典型的に回収され、物理的又は化学的方法により破壊し、そして更なる精製のために生じる粗抽出物を保持する。

【0022】

タンパク質の発現において利用される微生物細胞は、いずれかの既知な方法、例えば、凍結-解凍サイクリング、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤の使用により破壊することができる、このような方法は当業者に周知である。

20

【0023】

上記酵素は、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出法、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、及びレクチンクロマトグラフィーを含む方法により組換え細胞培養液から回収し、そして精製することができる。タンパク質の再折りたたみ工程は、必要であれば、成熟タンパク質の完全立体配置において使用することができる。最後に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を最終精製工程に利用することができる。

30

【0024】

抗原性ペプチド

抗原性ペプチドは、タンパク質、好ましくは多様な微生物から発現されるタンパク質を発現する多様な種にわたるエピトープを共有するタンパク質表面ペプチドであってよい。

【0025】

上記ペプチドは、上記タンパク質の検出及び定量化のための診断マーカーとして極めて有用である。また、当該ペプチドは、成功的な製品に必要な優れた感受性を有する抗体、テスト及びキットを産出するために有用である。

【0026】

ある態様において、上記ペプチドは、タンパク質コード遺伝子が発現される細胞培養液から当業者に既知な慣習的な技術、例えば、アフィニティークラム精製法を使用して単離され、あるいは当業者に既知な方法に従い、当該ペプチドのアミノ酸配列は産出され、そして当該ペプチドは合成される。

40

【0027】

上述した特徴を有する抗原性ペプチドは、フィターゼタンパク質と反応性であるモノクローナル又はポリクローナル抗体の産出に有用である。

【0028】

抗体

本発明において有用な抗体は、哺乳類、特に、ウサギ、ニワトリ、マウス、又はヤギを使用して作製することができる。接種のためのプログラムは重大ではなく、そして当業界

50

における当該目的のために通常使用されるいずれかのものであってよい。このような手順は、例えば、Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 92-115 ページにおいて説明されている。

【0029】

フィターゼの検出のために好ましい抗体は、大腸菌 (E.coli) 封入体において産出される組換えフィターゼに対して免疫親和性である精製されたウサギ抗体、ニワトリ抗体、及びヤギ抗体である。フィターゼを検出及び定量化するために、当該抗体は、好ましくは、酵素、放射性同位体、及び有色粒子、例えば、ラテックスビーズ、又は金コロイドを含む標識を直接的に使用して標識される。他の態様において、当該抗体は、例えば、当該抗体と結合する標識された物質、例えば、二次抗体、プロテイン A、又はプロテイン G との反応により間接的に標識される。

10

【0030】

ポリクローナル抗体

ある態様において、上記抗体はポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体を調製するための方法は当業者に既知である。ポリクローナル抗体は、例えば、1又は複数の免疫化剤、及び所望する場合にはアジュバントの注射により動物中で産生することができる。典型的には、当該免疫化剤及び/又はアジュバントは、複数回の皮下又は腹腔内注射により哺乳類中に注入される。当該免疫化剤は、飼料用酵素又はその融合タンパク質を含む。例えば、当該薬剤は、フィターゼポリペプチド、又はその融合タンパク質である。他の方法において、当該免疫化剤は、免疫化される哺乳類中で免疫原生として知られるタンパク質と接合する。このような免疫原生タンパク質は、制限することなく、鍵穴カサガイヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、及び大豆トリプシン阻害剤を含む。アジュバントの例は、フロイント完全アジュバント、及び M P L - T D M アジュバント (モノホスホリル脂質 A、合成トレハロースジコリノマイコレート (dicorynomycolate)) を含む。当該免疫化プロトコルは、過度の実験をすることなく当業者により選択することができる。好ましい抗体は、飼料用酵素、例えば、制限することなく、フィターゼタンパク質、例えば、流通経路における穀物の大量の試料中の相対濃度における遺伝子導入フィターゼタンパク質の検出に高感受性である。好ましくは、当該抗体は、約 0.059 ng/ml 高感受性において、飼料用酵素、例えば、フィターゼタンパク質を検出する。高感受性の抗体は、遺伝子改変作物組織、例えば、制限することなく葉、茎、種子、柄、根等

20

30

【0031】

モノクローナル抗体

一方、抗 - 飼料用酵素抗体、例えば、抗 - フィターゼ抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、例えば、Kohler and Milstein, Nature, 256: 495 (1975) により説明されるものを使用して調製される。ハイブリドーマ法において、マウス、ハムスター、又は他の適当な宿主動物は、典型的には、免疫化剤と特異的に結合する抗体を産出し、又は産出することができるリンパ球を誘発するために免疫化剤で免疫化される。あるいは、当該リンパ球を試験管内において免疫化してもよい。

40

【0032】

上記免疫化剤は、典型的には、所望のポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般的に、末梢血リンパ球 (「PBL」) は、ヒト起源の細胞が所望される場合に有用であり、あるいは非 - ヒト哺乳類源が所望される場合には、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。それから当該リンパ球を、適当な融合剤、例えば、ポリエチレングリコールを使用して、不死化細胞株と融合させ、ハイブリドーマを形成させる (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103)。不死化細胞株は通常形質転換した哺乳類細胞であり、特に、げっ歯類、ウシ、及びヒト起源のミエローマ細胞である。通常、ラット又はマウスミエローマ細胞株が利用される。当該ハイブリドーマ細胞は、融合されていない不死化細胞の成長又は生存を阻害する好ましくは 1 又

50

は複数の物質を含む適当な培養培地において培養される。親細胞が、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT、又はHPR T) 酵素を欠く場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的にはヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン (「HAT培地」) を含む、それらの物質はHGPRT - 欠乏細胞の成長を阻害する。

【0033】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体産出細胞により安定に高レベルの抗体の発現をサポートし、そして培地、例えば、HAT培地に感受性であるものである。より好ましい不死化細胞株は、例えば、the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. 及び the American Type Culture Collection, Manassas, Va. Human myelomaから得ることができるマウスミエローマ株であり、そしてまた、マウス - ヒトヘテロミエローマ細胞株もヒトモノクローナル抗体の調製のために説明されている (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, pp. 51-63)。

10

【0034】

ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、それからPROに対して作られたモノクローナル抗体の存在のためにアッセイされる。好ましくは、当該ハイブリドーマにより産出されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法、又は試験管内結合アッセイ、例えば、放射性イムノアッセイ (RIA)、又は酵素結合免疫吸収アッセイ (ELISA) により測定される。このような技術及びアッセイは当業界において既知である。当該モノクローナル抗体の結合アフィニティーは、the Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980)により測定することができる。

20

【0035】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、そして標準方法 (Goding, supra)により成長させる。当該目的のために適当な培養培地は、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地、及びRPMI - 1640培地である。あるいは、当該ハイブリドーマ細胞は、哺乳類の腹水として生体内において成長させる。サブクローンにより分泌された当該モノクローナル抗体を、慣習的な免疫グロブリン精製方法、例えば、プロテインA - セファロース、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーにより培養培地又は腹水液から単離又は精製する。

30

【0036】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば、米国特許第4,816,567号に説明されるように作製される。本発明の抗体をコードするDNAは、慣習的な方法 (例えば、マウス抗体の重鎖お軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより) を使用して容易に単離し、そして配列決定される。本発明のハイブリドーマ細胞はこのようなDNAの好ましい起源として有用である。単離した後、当該DNAを発現ベクター中に置き、それから、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を得るために、宿主細胞、例えば、サルCOS細胞、中国ハムスター卵巣 (CHO) 細胞、又は別の免疫グロブリンタンパク質を産出しないミエローマ細胞に形質転換する。また、当該DNAは、例えば、相同マウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常部のコード配列を置換することにより (米国特許第4,816,567号; Morrison et al., supra)、又は免疫グロブリンコード配列を非 - 免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部と共有結合的に結合することにより改変される。このような非 - 免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常部のために置換され、又はキメラ二価抗体を作製するために本発明の抗体の1つの抗原結合部位の多様なドメインのために置換される。

40

【0037】

他の態様において、当該抗体は一価抗体である。一価抗体を調製するための方法は当業

50

界において周知である。例えば、ある方法は免疫グロブリンの軽鎖及び改変重鎖の組換え発現に関する。当該重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防ぐためにFc領域のいずれかの点において切頭される。あるいは関連するシステイン残基は、他のアミノ酸残基で置換され、あるいは架橋を防ぐために欠失される。また、試験管内方法は、一価抗体の調製に相当である。そのフラグメント、特にFabフラグメントを産出するための抗体の分解は、当業界に既知な慣習的な技術を使用して達成することができる。

【0038】

当業界に既知な他の方法は、Keamey, et al., J. Immunol. 123: 1548-1558 (1979)の方法を含み、これは、本明細書において引例として組み入れられている。端的には、動物、例えば、マウス、又はウサギはアジュバント中の免疫原で播種され、そして脾臓細胞が回収され、そしてミエローマ細胞株と混合される。当該細胞はポリエチレングリコールの添加により融合するように誘導される。ハイブリドーマは、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン(HAT)を含む選択培地中で細胞を培養することにより化学的に選択される。ハイブリドーマは続いて、抗-フィターゼモノクローナル抗体を産出するための能力のためにスクリーニングされる。抗体を産出するハイブリドーマはクローニングされ、発展させ、そして将来の産生のために凍結保存される。

10

【0039】

他の態様において、上記抗体は、飼料用酵素、特にフィターゼタンパク質の同定及び定量化に検出可能なレベルで直接的に標識される。イムノアッセイに使用される標識は、当業者に一般的に知られており、酵素を制限することなく放射性同位体、並びに蛍光、発光、及び色素生産性物質、例えば、有色粒子、例えば、金コロイド及びラテックスビーズを含む。

20

【0040】

あるいは、上記抗体は、免疫グロブリンと親和性を有する標識された物質、例えば、プロテインA若しくはG、又は二次抗体との反応により間接的に標識される。当該抗体は二次物質と接合し、そして抗体と接合した二次物質と親和性を有する標識された三次物質で検出される。例えば、当該抗体は、ビオチンと接合し、そして抗体-ビオチン接合体は、標識されたアビジン又はストレプトアビジンを使用して検出される。

【0041】

他の態様において、上記抗体はハプテンと接合し、そして当該抗体-ハプテン接合体は標識された抗-ハプテン抗体を使用して検出される。抗体を標識するこれらの及び他の方法、及びアッセイ接合剤は、当業者に周知である。

30

【0042】

飼料用酵素タンパク質と同様か、又はより優れた感受性を有する抗-飼料用酵素、特に、抗-フィターゼモノクローナル及びポリクローナル抗体は、動物を飼料用酵素、特に、上述のフィターゼタンパク質で免疫化し、当該タンパク質と反応する抗体を単離し、そして当業者に周知な方法に従い当該抗体を生物液、例えば、血液から回収しそして精製することにより産出される。

【0043】

イムノアッセイ

上記抗体は、所望の飼料用酵素、又は以下に説明するイムノアッセイを使用するタンパク質の検出のための慣習的なイムノアッセイ試薬で、キットにおいて集合的にアセンブルされる。当該キットは、モノクローナル及びポリクローナル抗体の両方、並びに試料中の酵素の存在を測定するためのスタンダードを任意的に含んでよい。これらの試薬を含むキットは、当該タンパク質の部位検出において簡便性、迅速性を供する。

40

【0044】

上述の抗体は、試料中の飼料用酵素の存在を測定するためのいくつかの異なるイムノアッセイの基本的な試薬として使用される。当該抗体は、定質的又は定量的ないずれかの種類のイムノアッセイにおいて利用される。

【0045】

50

典型的な定量的なサンドイッチアッセイにおいて、3つの基本的なパートが存在する。例えば、このような飼料用酵素、例えば、フィターゼのためのアッセイにおいて、遺伝子組み換え植物抽出物中、又は飼料抽出物、例えば、ニワトリ飼料中の当該フィターゼタンパク質は、一次抗体を使用して固相において捕獲される。それから「サンドイッチ」は、ウェルに添加された当該一次抗体、飼料用酵素タンパク質と二次抗体間に形成される。ある態様において、当該二次抗体はヤギ抗 - 飼料用酵素抗体である。洗浄工程後、結合していない二次抗体は除去され、結合した二次抗体が標識された抗体を使用して検出される。特別な態様において、当該検出抗体は、アルカリ性ホスファターゼ - 標識ロバ抗 - ヤギ抗体である。検出酵素用の基質であるアルカリ性ホスファターゼが添加され、そして各ウェルの吸光度を読むことにより発色を測定する。標準曲線は、吸光度に対する濃度をプロットするために4 - パラメーター曲線を使用する。

10

【0046】

本発明のある態様において、飼料用酵素の検出のためのイムノアッセイは、以下の工程を含んで成る：

- a) 当該試料の抽出物を調製する工程；
- b) 抗体 - ポリマー - 抗体複合体を作成するために、当該抽出物の一部を、当該飼料用酵素と結合する一次抗 - 飼料用酵素抗体、固形担体と結合している一次抗体、及び当該飼料用酵素と結合する二次抗 - 飼料用酵素抗体とともにインキュベートする工程；
- c) 結合していない二次抗体を除去するために、当該抗体 - ポリマー - 抗体複合体を洗浄する工程；
- d) 当該二次抗体と免疫学的に反応する検出抗体、ここで当該検出抗体は標識化されている、を添加する工程；そして、
- e) 当該液体中の水処理ポリマーの濃度を測定するために、結合している又は結合していない標識された抗体の量を測定する工程。

20

【0047】

特別な態様において、上記飼料用酵素は、フィターゼ、キシラナーゼ、セルラーゼ、グルカナーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、及び/又はプロテアーゼタンパク質である。より好ましい態様において、当該フィターゼは熱安定性フィターゼである。

【0048】

本発明の他の態様において、検出可能な標識は、酵素である。より好ましい態様において、当該酵素はアルカリ性ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、又は - ガラクトシダーゼである。

30

【0049】

他の態様において、上記酵素は、不溶性の反応生成物を産出する。

【0050】

また、本発明は、以下を含んで成るイムノアッセイ法による検出及び定量化のためのキットを供する：

- a) 試料から当該飼料用酵素を抽出するための手段；
- b) 固形支持体に結合する一次抗 - 飼料用酵素抗体を含んで成る固形支持体；
- c) 二次 - 飼料用酵素抗体；及び、
- d) 二次体と免疫学的に結合可能な検出抗体、ここで当該検出抗体は検出手段で標識されている。

40

【0051】

特別な態様において、上記検出手段は酵素である。より好ましい態様において、当該検出酵素は、アルカリ性ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、又は - ガラクトシダーゼである。

【0052】

他の態様において、上記酵素は、可溶性又は不溶性の反応生産物を産出する。

【0053】

他の態様において、上記キットは、更に上記酵素のための基質を含んで成る。

50

【0054】

また、このようなイムノアッセイは酵素 - 結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) を意味する。

【0055】

また、上述の抗体は、飼料用酵素、例えば、フィターゼの検出のための定質的イムノアッセイに利用される。このようなアッセイのひとつは、通常イムノストリップを意味する。イムノストリップは、液体試料が毛細管作用により引き上げられるメンブラン及びフィルターを使用して作製される。試料中のフィターゼは、当該ストリップの全長を移動するときにイムノストリップに含まれる抗体と反応する。ニワトリ飼料中のフィターゼタンパク質を検出するために、当該飼料をバッファーで洗浄し、当該固形物質から分離し、そして当該イムノストリップに加える。当該液体試料がイムノストリップの反対の端に移動すると、フィターゼは特異的な抗体と反応し、そして可視化したライン中で捕獲される。テストラインにおけるシグナルの検出は、フィターゼが試料中に存在することを示す。

10

【0056】

ある態様において、本発明は以下の工程を含んで成る試料中の飼料用酵素の検出のためのイムノアッセイを供する：

a) 一次抗体 - 飼料用酵素複合体が形成するように、抽出物中の飼料用酵素が免疫学的に認識される一次抗体の存在下において、試料の抽出物を調製する工程；

b) 免疫学的に飼料用酵素を認識可能な所望の二次抗体と結合させることにより、多数の間隙を伴う実質量を形成するように、三次元で有意な寸法を有する固相フォーマットを調製する工程、ここで当該二次抗体は検出手段と接合し、そしてまた、二次抗体は飼料用酵素を免疫学的に認識する；

20

d) 工程 (a) の抽出物と工程 (b) の調製したフォーマットを併せ、これにより当該抽出物が、一次抗体 - 飼料用酵素複合体を捕獲している調製された固相フォーマットの間隙を通して引き上げられる工程；

e) 上記捕獲された一次抗体 - 飼料用酵素複合体の存在により飼料用酵素を検出する工程。

【0057】

他の態様において、上記飼料用酵素は、フィターゼ、キシラナーゼ、セルラーゼ、グルカナーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、及び/又はプロテアーゼタンパク質である。好ましい態様において、当該フィターゼは熱安定性フィターゼである。

30

【0058】

他の態様において、上記固相フォーマットは、酢酸セルロース、セルロース、ニトロセルロース、又はナイロンである。他の態様において、当該固相フォーマットは、重ねられ且つ連続した複数の層から成り、ここで各層は異なる飼料用酵素を捕獲することができる。好ましい態様において、当該固相支持体は、更に、固相フォーマットの試料吸収パッドを含んで成る。より好ましい態様において、更に、当該イムノアッセイは、標識された抗 - 飼料用酵素抗体を含んで成るストリップを含んで成る。

【0059】

特別な態様において、検出手段は金コロイドである。

40

【0060】

上述の抗体を利用する高感受性イムノアッセイが供される。当該アッセイは、飼料用酵素、又はタンパク質をコードする遺伝子、例えば、フィターゼ遺伝子を含むように操作された遺伝子組み換え生物の検出に有用である。当該イムノアッセイは、飼料、例えば、動物飼料中及び遺伝子増強作物試料中の低濃度のタンパク質を検出することが可能である。

【0061】

上述のとおり、上記イムノアッセイに使用される抗体は、多様な微生物により発現される飼料用酵素、特にフィターゼタンパク質上の複数のエピトープ又は共通の1つのエピトープと免疫反応性であり、そして試料中に存在しうる他のタンパク質と最小限に反応し、従って、試料、例えば、穀物試料中の遺伝子組み換え微生物の存在の正確な検出を供す

50

る。

【0062】

上記イムノアッセイは、試料、例えば、動物飼料、及び農業試料、例えば、植物物質の多様性において、所望の酵素タンパク質、例えば、フィターゼの存在又は量を測定するために有用である。当該試料は、所望のタンパク質が抗体に利用できるいずれかの資源から得ることができる。例えば、当該試料は、根、柄、葉、又は種子、あるいはこのような作物、例えば、食物フラクション由来の生産物を含むいずれかの植物組織、又は抽出物であってよい。

【0063】

上述の1又は複数の抗体は、飼料用酵素、特にフィターゼタンパク質等の検出のためのいずれかの異種若しくは同種、サンドイッチ、又は競合的イムノアッセイにおいて利用される。抗体は、検出可能な標識で標識されるか、あるいは固相にカップリングされる。抗体を固相にカップリングするための方法は当業者に周知である。当該イムノアッセイ法に従い、当該飼料用酵素を含む試料は、十分な時間、試料中のフィターゼタンパク質に対する抗体の結合を促進する条件下で抗体と反応させる。当該イムノアッセイ試薬及び試料は、異なる組み合わせ、及び順番において反応できることが当業者に理解されるだろう。固相に結合した試薬と結合していない試薬を分離するために、物理的手段、例えば、粒子のろ過、反応溶液のコートイングチューブ又はウェルからのデカンテーション、磁気分離、毛細管作用、及び当業者に既知な他の手段が利用される。また、固相の分離洗浄は、当該方法に含まれることが理解されるだろう。

10

20

【0064】

試料中の飼料用酵素タンパク質、例えば、フィターゼの濃度は、当該試料により産出された色の強度をカラーカードと比較することにより、又は反射計を使用することにより測定される。

【0065】

生じる反応混合物、又は抗体と試料の組み合わせは、抗体 - 飼料用酵素結合速度を最適化する溶液中で調製される。適当な溶液は水溶液又はバッファーである。当該溶液は、好ましくは特異的な結合を促進し、非特異的な結合を最小化し、飼料用酵素を可溶化し、試薬反応性を安定化し、そして保存する条件下で供され、そしてバッファー、洗浄剤、溶媒、塩、キレート剤、タンパク質、ポリマー、炭水化物、糖、及び当業者に既知な他の物質

30

【0066】

上記反応混合溶液は、抗体 - 飼料用酵素複合体を形成するために、抗体が飼料酵素と反応及び結合することを許容する十分な時間反応させる。アッセイを完了するために必要な時間を最小化するために、結合を生じる最短の反応時間が所望される。イムノストリップテストのための適当な反応時間は、10分以下であり、又は約1分～10分である。5分以下の反応時間が好ましい。最も好ましくは、当該反応時間は3分以下である。試薬の最適化により、結合は試薬が結合するときに実質的に完了する。

【0067】

上記反応は、試薬が分解又は失活しないいずれかの温度において行われる。約18 ~ 30 の温度が好ましく、最も好ましい反応温度は周囲温度又は室温である(約22)

40

【0068】

固相フォーマット、例えば、イムノストリップが、理想的には当該イムノアッセイに適している。テストストリップは、複数の多孔性成分、メンブラン、及びフィルターを含んで成り、液体試料は、毛細管作用により引き上げられる。試料中の飼料用酵素は、当該ストリップを通過するときにテストストリップ中に含まれるテスト試薬と反応する。穀物又は種子中のタンパク質を検出するために、当該穀物は、後に固形物質から分離し、そして上記テストを使用してアッセイされる液体を伴う粉末及び当該粉末から抽出したタンパク質中に置く。当該液体をイムノストリップに適用し、そして飼料用酵素は当該ストリップ

50

の末端に移動する。それが当該ストリップを移動すると、当該飼料用酵素は検出可能なシグナル生成物を生じる当該ストリップに適用され又はストリップ上に固定化された試薬と反応する。

【0069】

ある態様において、上記固相フォーマットは、酢酸セルロース、セルロース、ニトロセルロース、又はナイロンである。好ましい態様において、当該固相フォーマットはニトロセルロースである。

【0070】

他の態様において、上記固相フォーマットは、試料吸収パッド、ニトロセルロースのストリップ、及び標識された抗-飼料用酵素抗体を含んで成るボトムパッドを含んで成る。

10

【0071】

更に他の態様において、上記固相フォーマットは、各層が異なる飼料用酵素を捕獲することができる、重ねられ、且つ連続した複数の層から成る。

【0072】

イムノアッセイキット

試料中の飼料用酵素を検出するためのイムノアッセイキットは、1又は複数の上述した抗体を含む。当該キットは、追加的に、試料を得るための機器、試薬用容器、時間測定手段、試料の希釈用バッファ、及び比色計、反射率計、又は測定される色の変化に対するスタンダードを含んでよい。当該キットは上述のとおり、イムノストリップの形態において試薬を含んでよい。

20

【0073】

好ましい態様において、抗体を含む上記試薬は乾燥している。水性試料のバイアル又はストリップへの添加は、乾燥試薬の可溶化を生じ、反応の原因となる。

【0074】

上述の試薬、イムノアッセイ方法、及びキットは、以下の制限されない実施例により更に理解されるだろう。以下の実施例は、試料、例えば、飼料又は他の使用植物物質中の飼料用酵素、特に、フィターゼの検出において使用することができる典型的な実験プロトコル及び試薬を示す。このような実施例は、説明を意図するものであり、制限することを意図するものではない。

【0075】

上記に引用される多くの引例は、明細書全体を通して全て組み入れられている。

30

【実施例】

【0076】

これらの方法及び材料は、トウモロコシ試料、及び以下に説明する実施例において使用されるモノクローナル抗体製品の一般的な調製方法を説明する。

【0077】

材料及び方法

トウモロコシ試料：トウモロコシ抽出物は、Hi11種子若しくはA188種子（非遺伝子組み換え）、又は遺伝子改変フィターゼ種子のいずれかに由来する。5つの穀粒をクレコ組織粉碎機（kleco tissue grinder）を使用して微粉碎した。当該タンパク質を可溶化するために生じたトウモロコシ粉を5mlの蒸留水に懸濁した。当該懸濁液を、ELISA法又はイムノストリップ法のいずれかにおいてテストした。

40

【0078】

ポリクローナル抗体の産生

免疫化：最初の注射後、動物（ウサギ又はヤギ）を28日後に追加免疫する。その後の各追加免疫は21日毎である。各追加免疫から10日後、動物から採血する。

【0079】

ニワトリのために、最初の追加免疫は、最初の注射から7日後であり、続く追加免疫は各28日である。各追加免疫から10日後、ニワトリから採血し、そして良好な抗体価が検出された場合、追加免疫後に生まれた卵を収集する。

50

【0080】

免疫化剤は、全て大腸菌 (E.coli) 発現系から精製したフィターゼタンパク質とした。動物への最初の注射で、当該タンパク質は完全フロイントアジュバント中で乳化される。追加免疫は不完全フロイントアジュバント中におけるものである。ポリクローナル抗体を産生するために我々が使用した動物はウサギ、ニワトリ、及びヤギである。

【0081】

フィターゼ (Nov 9 X) 精製物 :

10%ソルビトール、10%NaCl、及びpH4.2で処方したフィターゼ (Nov 9 X) を、SnakeSkin 10K MWC0 透析チューブ (Pierce, Rockford, IL) を使用してpH8.0の25mMのTris-HClに対して4で一昼夜透析した。透析固形物である (NH₄)₂SO₄を当該フィターゼ混合物に0で添加し、最初に25%の飽和度、それから50%、そして最後に75%の飽和度となるようにした。25%の飽和度への (NH₄)₂SO₄の添加において、当該混合物を0で30分間攪拌し、それから20,000rpmで20分間遠心分離した。デカントした懸濁液に、(NH₄)₂SO₄を50%の飽和度になるように添加し、一方ペレットを、pH9.0の25mMのTris-HCl中に再懸濁した。当該手順を3回行い、0~25%、25~50%、及び50~75%の飽和度のNov 9 X (NH₄)₂SO₄ペレットを産出した。SDS-PAGE分析は、50~75%分画においてNov 9 Xの存在を示した。当該分画をpH9.0の25mMのTris-HClに対して透析し、そしてカラムクロマトグラフィー精製のために調製した。

【0082】

50~75%の (NH₄)₂SO₄分画由来の粗Nov 9 X TAMを、5.0mL/分の流速を使用してHiTrap Q 陰イオン交換カラム (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) に充填した。Nov 9 Xを溶出するために、30分にわたり展開したpH9.0の25mMのTris-HCl中の0~0.4MのNaClの直線勾配を使用した。当該クロマトグラフィー操作の進行に従うように280nmにおける吸光度係数を使用した。SDS-PAGE分析後、最も純粋なNov 9 X含有分画をプールし、Centricon Plus-20遠心性濃縮器 (Millipore, Bedford, MA) で濃縮し、そして1mL/分で操作する26/60 Sephacryl S100 サイズ除外カラム (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) に充填した。当該溶出剤バッファーは、pH9.0の25mMのTris-HClとした。純粋なNov 9 X含有分画をプールし、濃縮し、pH8.0の25mMのTris-HClに対して透析し、そして以下に説明する実験に使用した。

【0083】

実施例1: フィターゼELISA

当該実施例は、ELISA免疫学的技術を使用する、トウモロコシ試料中のフィターゼ酵素の検出及び定量的測定を説明する。

【0084】

マルチウェルプレート (Nunc, Maxisorp) を、2µg/mlの濃度のウサギ抗-フィターゼ抗体で4において一昼夜コーティングし、pH8.5のホウ酸塩緩衝生理食塩水 (50mMのホウ酸ナトリウム/ホウ酸、75mMのNaCl) で希釈した。当該プレートをpH8.0のTris塩基バッファー (0.05% Tween-20、及び0.03% アジ化ナトリウムを含む10mMのTris) で5回洗浄した。注意: 各インキュベーション後において、結合していない抗体/試料を除去するために同じ洗浄工程を行った。それからプレートを、室温において45分間、pH7.4のPBS/Tween-20/BSAバッファー (pH7.4の100mMのリン酸ナトリウム (希釈) 中、1%ウシ血清アルブミン、0.05% Tween-20、0.03% アジ化ナトリウム、150mMのNaCl) でブロックした。50マイクロリットルの各試料を当該プレートに添加し、そして1.5時間室温でインキュベートした。ヤギ抗-フィターゼ抗体 (希釈液中2µg/mlに希釈した) をそれから当該プレートに添加し、そして37で1時間インキュベートした。当該検出抗体 (アルカリ性ホスファターゼ-標識ロバ抗-ヤギ抗体を希釈液中1µg/mlに希釈した) を当該プレートに添加し、そして37で1時間インキュベートし

た。当該基質であるパラニトロフェニルホスフェート (p N P P) を添加し、そして 3 0 分間室温で発色させた。当該吸光度を、参考として 4 9 2 n m を伴い、4 0 5 n m で測定した。

【 0 0 8 5 】

アッセイの特性

当該フィターゼの標準曲線は、4 - パラメーターカーブフィットとした (図 1 を参照のこと) 。当該曲線は、0 . 0 4 ~ 1 6 n g / m l の範囲で l o g に対してプロット直線であった。l o g X 軸における 4 - パラメーター標準曲線をプロットするために、0 n g / m l スタンドを、0 n g / m l の代わりに 0 . 0 1 n g / m l 当該分析プログラムに入れる必要がある。いずれかの 4 - パラメーターカーブフィッティングプログラムでも作動するであろうが、使用した分析プログラムは、Tecan SunriseTM マイクロプレートリーダー用 WinSelectTM ソフトウェアを使用した。

10

【 0 0 8 6 】

最小検出可能用量 (M D D) は、統計学的にゼロスタンダードと区別される最低レベルのフィターゼタンパク質とした。当該最小検出可能用量は、1 m g / m l の全タンパク質におけるネガティブコントロールのトウモロコシ種子抽出物の 2 4 回の重複測定分析により測定した。ゼロスタンダード平均値 O . D . の 2 つの標準偏差 (9 5 % 信頼限界) を当該平均値に加え、そして当該全 O . D . 値の用量を、標準曲線を使用して測定した。当該最小検出可能用量は 0 . 0 4 4 n g / m l であった。

20

【 0 0 8 7 】

ラン間精度は、2 1 の異なるアッセイにおいて 4 つの異なるコントロール試料をアッセイすることにより測定した。当該試料は、E L I S A 希釈剤に加えた精製されたフィターゼとした。当該結果は、以下の表 1 に示す。当該精度は、上記標準曲線の直線部分において測定した試料濃度に良好であり、1 5 % 以下である。

【 0 0 8 8 】

表 1 . ラン間精度テスト

【 表 1 】

試料	平均フィターゼ ng/ml	標準偏差	変異係数%
1	9.65	2.27	23.5%
2	2.99	0.38	12.8%
3	0.94	0.11	12.0%
4	0.39	0.10	25.6%

30

【 0 0 8 9 】

ラン内精度は、2 0 ~ 2 4 回の以下の試料の重複測定をテストすることにより測定した。当該試料は E L I S A 希釈剤に加えたフィターゼとした。当該結果は、以下の表 2 に示す。全ての試料は極めて良好な精度をもたらし、単一のアッセイラン内で良好な再現性を示す。

40

【 0 0 9 0 】

表 2 . ラン内精度テスト

【表 2】

試料	平均フィターゼ ng/ml	標準偏差	変異係数%
1	0.463	0.030	6.44%
2	2.293	0.264	11.51%
3	5.224	0.787	15.07%

10

【0091】

4つのトウモロコシ種子抽出物を、アッセイの直線性をテストするために、ELISA希釈剤で希釈した。当該トウモロコシ抽出物は、Hil種若しくはA188種子（非遺伝子組み換え）、あるいは遺伝子組み換えフィターゼ種子に由来した。5つの穀粒をクレコ組織粉碎機で微粉碎した。タンパク質を可溶化させるために生じたトウモロコシ粉を5mlの蒸留水に懸濁させた。当該懸濁液をELISAにおいて、又はストリップでテストした。フィターゼの希釈試料からの回収率は受容可能であった。

20

【0092】

表3. アッセイの直線性テスト

【表 3】

試料	希釈	測定した フィターゼ (ng/ml)	測定した X値 希釈分画	回収率
A	1/2500	12.76	31900	82%
	1/5000	5.85	29250	75%
	1/10,000	3.90	39000	100%
B	1/2500	6.87	17175	52%
	1/5000	6.90	34500	104%
	1/10,000	3.33	33300	100%
C	1/2500	3.58	8950	63%
	1/5000	2.35	11750	83%
	1/10,000	1.41	14100	100%
D	1/2500	6.11	15275	72%
	1/5000	3.54	17700	83%
	1/10,000	2.13	21300	100%

30

40

【0093】

実施例2: フィターゼイムノストリップ

当該実施例は、試料中のフィターゼの存在をテストするためのイムノストリップアッセイの使用を説明する。

【0094】

手順

50

飼料を50mlの遠心分離チューブに15ml入れることにより、マッシュ・ニワトリ飼料の抽出物を調製した。当該量の飼料を、抽出バッグ中の片側のメッシュ挿入口に加えた。抽出バッファー(0.5% Tween-20を含むpH7.5の25mlの0.1Mホウ酸塩)を添加し、そして全ての飼料が湿るように当該バッファーを静かに飼料上に入れた。テストのために3~5滴をイムノストリップに適用する前に、当該抽出物を室温で10分以上インキュベートした。

【0095】

イムノストリップ

端的には、側流式(lateral-flow)イムノストリップは、特異的なウサギ(ニワトリ抗体も使用できる)抗-フィターゼポリクローナル抗体の1mmのラインを噴霧した、ニトロセルロースの検出メンブラン(2.5x18cm)を含んで成り、プラスチックのバックキング(AristaTM製プラスチックカセット、Bethlehem, PA)上に支持された。ロバ抗-ヤギ抗体の試薬コントロールラインを上記の最初の抗体ラインに並行に噴霧した。ニトロセルロースのストリップのボトムエンド部分を処理したポリエステルストリップの断片で被せた。当該ポリエステルストリップを最初に溶液B(0.5%BSA、0.5%ポリビニルアルコール、及び0.1% Triton X-100; pH7.4の50mMのリン酸バッファー)及びヤギ抗-フィターゼ抗体に接合した金コロイドで最初に処理した。当該ポリエステルストリップを乾燥させる。それから当該ポリエステルストリップをコットン試料処理パッドで覆う。当該試料処理パッドはまた溶液C(0.1% Triton X-100、及びpH8.5の0.1Mホウ酸塩バッファー)で前処理し、乾燥させた。ニトロセルロース上のテスト抗体及びコントロール抗体領域上を通過後、試料から上記溶液を吸収するために、隣接しているニトロセルロースの他の端又は頂端は、他のコットンパッドとする。それから、試料パッド上に位置する卵形の試料処理ウェル、及びニトロセルロースメンブランの検出領域上に位置する矩形の検出窓を伴うプラスチックカセットに合わせるために、完成したカードを4mmのテストストリップに切った。

【0096】

上記アッセイは、150µl(3~5滴)の抽出物を試料ウェルに添加することにより行った。約5~10分待った後、二本の赤いラインが結果窓に現れた。下のラインは、フィターゼの存在を示し、一方上のラインは適切に装置が働いていることを示すコントロールラインである。フィターゼが存在しない場合、結果窓には、一本のみの赤いコントロールラインが表れる。試料イムノストリップについては図3及び4を参照のこと。図3は、フィターゼの存在の検出を示す。矢印により示されるとおり、フィターゼが活性を喪失し始めたために、20分後にフィターゼの検出は低下している。

【0097】

イムノストリップの詳細な調製

フィターゼ第二世代ストリップ-メンブランのコーティング

材料

1. AE100メンブランを伴う2.25x180mmのカード
2. PBS中1.0mg/mlにおけるニワトリ抗-フィターゼIAP
3. PBS中0.15mg/mlにおけるジャクソン ロバ抗-ヤギ抗体
4. ピアス(Pierce)RBS洗浄剤

【0098】

手順

テストラインのコーティング:

1. vol, 18, enter, enterと押すことによりCamagTM噴霧器の容積を、18(1µ/cm)に設定する。
2. track, 1, enter, enterと押すことによりトラックを設定する。
3. プラットホームにカードを置く。2つの紙片を伴う当該カードの一部を機器の手前に一番近く置く。当該カードをマグネットで安全にする。
4. シリンジに1.0mg/mlのニワトリ抗-フィターゼIAPを充填する。

5. スプレーヘッドを30mmに設定する。

6. gas, calc, runと押すことによりガス供給をつけ、そして噴霧を開始する。噴霧パターンの一貫性及び精度に注意する。

7. 追加的な各カードのために3～6の工程を繰り返す。

8. シリンジを片付け、そしてピラスRBS洗浄剤(20 μ lの濃度/ml dH₂O)で5回洗浄する。

【0099】

コントロールラインのコーティング

9. vol, 18, enter, enterと押すことによりCamagの容積を、18(1 μ /cm)に設定する。

10. track, 1, enter, enterと押すことによりトラックを設定する。

11. シリンジに0.15mg/mlのロバ抗-ヤギを充填する。

12. スプレーヘッドを36mmに設定する。

13. gas, calc, runと押すことによりガス供給をつけ、そして噴霧を開始する。噴霧パターンの一貫性及び精度に注意する。

14. 追加的な各カードのために11～13の工程を繰り返す。

15. シリンジを片付け、そしてピラスRBS洗浄剤(20 μ lの濃度/ml dH₂O)で5回洗浄し、それからdH₂Oで10回洗浄する。

16. 33 で一昼夜カードを乾燥させ、それから室温に移す。

17. 室温で乾燥物を保存する。

【0100】

フィルターゼストリップ-ポリエステル上の接合体のコーティング。

材料

1. OD = 50の金接合ヤギ抗-NOV9X

2. 溶液Bで処理した2033グレードのポリエステルシート

3. スクロース

4. トレハロース

5. ピラスRBS洗浄剤

【0101】

手順

18. 金希釈剤を使用して金接合体をOD = 50に希釈する。

19. 安定化させるために20%のスクロース及び5%のトレハロースを金接合体に添加する(1mlの金接合体あたり0.2gのスクロースと50mgのトレハロース)。完全に溶解するまで混合する。

20. vol, 27, enter, enterと押すことによりCamagTM噴霧器の容積を、27(1.5 μ /cm)に設定する。

21. track, 1, enter, enterと押すことによりトラックを設定する。

22. ポリエステルシートをプラットホーム上に置き、そしてマグネットで安全にする。

23. シリンジに、安定化した金接合ヤギ抗-NOV9X(OD = 50)を充填する。

24. スプレーヘッドを15mmに設定する。

25. gas, calc, runと押すことによりガス供給をつけ、そして噴霧を開始する。噴霧パターンの一貫性及び精度に注意する。

26. スプレーヘッドを9mm動かす(24mmに設定)

27. gas, calc, runと押すことによりガス供給をつけ、そして噴霧を開始する。

28. 全体のポリエステルシートが塗られるまで、当該接合体の噴霧を続け、各ランのために9mm動かす。接合体の8つのラインがシートに塗られる。

29. 当該シートを37 で1時間乾燥させる。

30. 金接合体のラインが各ストリップに沿って動くように、1/4"のストリップに切断する。

10

20

30

40

50

31. 室温で乾燥物を保存する。

【0102】

機器のクリーニング

シリンジを片付け、そしてピアスRBS洗浄剤(20 µlの濃度/ml dH₂O)で5回洗浄し、それからdH₂Oで10回洗浄する。

dH₂Oで機器のプラットフォームをクリーニングする。

【0103】

フィターゼストリップ - アセンブリー

材料

6. 1. 0 mg/ml及び1 µl/cmにおいて、ニワトリ抗 - フィターゼIAP抗体でコーティングしたカード。 10

7. #40吸収紙の5/8" x 180 mmストリップ(トップパッド)

8. pH 8.6の溶液Cで処理した#903吸収紙の3/4" x 180 mmストリップ(ボトムパッド)。

9. 金接合体で噴霧した1/4" x 180 mmストリップ(ヤギ抗 - NOV9X、1.5 µl/cmにおいてOD = 50)。

10. 手袋

【0104】

手順

注意: 40%以下の湿度の条件下におけるアSEMBルスリップ。全ての成分を適用するために手袋をはめる。 20

1. カードの底の接着剤ストリップから2つのライナーを除去する。

2. トップに沿って金接合体のラインで金ストリップを配置し、そして1 ~ 1.5 mmまでメンブランを重ねる。

3. ボトムパッドをカードのボトムエッジに沿って置き、暴露したゴールドストリップを残すことに気をつける。

4. カードのトップに沿う接着剤ストリップからライナーを除去する。1 ~ 1.5 mmまでメンブランを重ねたカードのトップに沿ってトップパッドを置く。

5. ストリップに切断する準備まで、室温で乾燥した完成したカードを保管する。

6. ストリップを4 mmの長さに切断する。1つのカードから40個ほどのストリップが生じる。室温で乾燥したストリップを保管する。 30

【0105】

実施例3: 酵素的に活性なフィターゼの検出

手順

ピキア(Pichia)が産出した精製したフィターゼを99に60分間加熱することにより不活性化させた。それからフィターゼを酵素活性のためにテストし、そしてフィターゼELISAにおける反応性(図2)、及びフィターゼイムノストリップとの反応性(図3)を比較した。

ELISA比較: 図2は、99でのインキュベーション後のNOV9Xの残留活性のグラフを示す。04-28-03, FPLC 精製 TAM ロット番号PHY-PP9XR-PB200Lの活性対ELISAデータの比較。これは、ELISAアッセイ及びイムノストリップが活性フィターゼのみを検出するように見えることを示す。加熱により不活性化されたフィターゼはいずれのアッセイにおいても検出されない。 40

【0106】

実施例4: フィターゼイムノアッセイキット

当該診断テスト(図4を参照のこと)は、飼料中のフィターゼの素早い(10分)検出のために設計された。当該キットは、テストを行うために必要とされる全ての試薬及び機器を含む。当該キットは100°F(38°C)を超えない周囲温度において保管することができる。当該テストは、水分を吸収することができるシリカゲル乾燥剤を伴う密封した防水分ホイルバッグ中にパッケージされる。その使用前までそのパッケージ中で当該テス 50

トを保つ。当該テストを湿気のある場所に置くことを避ける。

【0107】

アッセイ手順

1. 飼料を大チューブの15目盛りまで充填する。当該量の飼料を抽出バッグのメッシュ挿入口の片側に添加する。

2. 抽出バッファ（25ml）の1つのプラスチック容器をキットから取り出し、そして抽出バッグ中に注ぐ。

3. バッグを閉め、そして全ての飼料が湿るようにバッファを飼料上に移動させる。

4. ホイルバッグからフィールドテスト取り出し、平らな乾燥表面上に置く。乾燥したことを確認する。青色になるはずである。ピンクになった場合、当該テストはもはや有効ではなく、処分するべきである。

5. トランスファーピペットを使用して、フィールドテストの試料ウェルに充填するために3～5滴の飼料抽出物を移す。

6. 試料ウェル上の窓中に見える結果のために約5分間待つ。

10

【0108】

結果

試料中にフィターゼが存在する場合、二本の赤いラインがフィールドテストの結果窓に見える。下のラインは、フィターゼの存在を示し、一方上のラインは適切に装置が働いていることを示すコントロールラインである。テストラインはコントロールラインよりは濃くないだろう。テストラインに見えるいずれかの反応は陽性と考えられる。

20

フィターゼが存在しない場合、結果窓には1本の赤いコントロールラインしか現れない。

【0109】

実施例5：ペレット飼料中のフィターゼの検出

当該実施例は、ペレット動物飼料中のフィターゼを検出するためのイムノストリップアッセイの使用を示す。

当該方法及び試薬は、ペレット動物飼料がいずれかの機械的装置で粒状に又は粉末状にすり潰されていること、及び抽出バッファが、ホウ酸塩バッファの代わりに水中0.5% Tween-20を伴う5%メタノールであったことを除き、実施例4において上述したとおりである。また、抗-フィターゼ抗体はウサギの代わりにニワトリに由来した。当該結果は、以下の表4に示す。表4は、Quantum（登録商標）フィターゼは、ELISA及びイムノストリップアッセイの両方を使用するマッシュ（ペレットイング前）及びペレット食餌の両方において検出可能であった。表5は、Quantumフィターゼが、イムノストリップ及びELISAにより、初期食餌（ペレットイング前）及び粉碎（crumbler）食餌（ペレット化食餌）において検出可能であることを示す。また、活性は酵素アッセイで確認した。

30

【0110】

表4 ペレット化飼料中のフィターゼの検出

【表 4】

食餌	平均 ng/ml	添加した フィターゼレベル	タイプ
RA0309初期食餌1	0	0	マッシュ
RA0309初期食餌9	0	0	ペレット
RA0309初期食餌4	0	0	マッシュ
RA0309初期食餌15	0	0	ペレット
RA0309初期食餌11	22. 3375	285	マッシュ
RA0309初期食餌19	24. 9875	285	マッシュ
RA0309初期食餌2	8. 8425	285	ペレット
RA0309初期食餌23	10. 93	285	ペレット
RA0309初期食餌6	27. 495	566	マッシュ
RA0309初期食餌17	46. 25	566	マッシュ
RA0309初期食餌13	19. 76	566	ペレット
RA0309初期食餌21	24. 425	566	ペレット
RA0309初期食餌3	58. 19	1133	マッシュ
RA0309初期食餌14	69. 0275	1133	マッシュ
RA0309初期食餌7	20. 7225	1133	ペレット
RA0309初期食餌22	32. 825	1133	ペレット
RA0309初期食餌12	153. 62	2832	マッシュ
RA0309初期食餌24	173. 7425	2832	マッシュ
RA0309初期食餌10	104. 2125	2832	ペレット
RA0309初期食餌28	100. 6525	2832	ペレット
RA0309初期食餌5	0	305	ロノザイム
RA0309初期食餌26	0	605	ロノザイム

10

20

30

【 0 1 1 1 】

初期及び粉碎食餌中のフィターゼ活性及びフィターゼの E L I S A 定量化

【表 5】

初期食餌	抽出可能な活性 平均 (FTU/kg)	ELISA結果 ng/ml
T1	37.7	0.0
T2	301.1	4.9
T3	426.3	16.7
T4	74.8	0.0
T5	209.8	7.5
T6	449.3	17.3
T7	58.0	0.0
T8	152.7	4.0
T9	806.6	13.3
T10	436.5	18.4
粉碎食餌		
T1	50.6	0.0
T2	142.2	4.5
T3	353.7	11.4
T4	68.7	0.0
T5	167.7	12.7
T6	237.8	9.1
T7	50.4	0.9
T8	234.4	8.8
T9	301.7	13.6
T10	711.0	22.5

10

20

30

40

50

【0112】

飼料用酵素タンパク質、特にフィターゼの検出のための本試薬、方法、及びキットの改変は、先の詳細な説明より当業者にとって明らかだろう。

【0113】

本発明は、具体的な態様に関する引例を伴い説明されたが、多数の変更、改変、及び異なる態様が可能であり、従ってこのような全ての変更、改変、及び態様は、本発明の範囲内であると考えられる。

【0114】

多様な特許、出願、及び引例が本明細書内で議論され又は引用され、そして全体において引例として組み入れられている。

【図面の簡単な説明】

【0115】

【図1】図1は、フィターゼ活性のための標準曲線を示すグラフである。

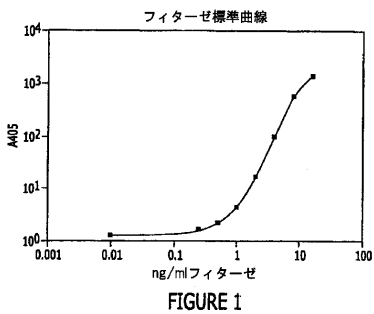
【図2】図2は、ELISA及び酵素活性アッセイの両方におけるフィターゼ酵素の99でのインキュベーション時間に対する相対活性パーセントを示すグラフである。ELISAにおけるフィターゼ酵素の検出は、酵素活性アッセイにおいて検出された活性量に平行する。

【図3】図3は、99で1時間未満のインキュベーション後、フィターゼの検出(矢印)を示すイムノストリップテストのスキャン複写である。フィターゼの検出における低下

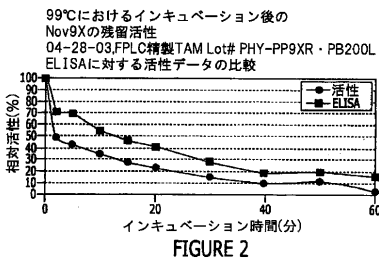
は 99 で約 20 分後に見られる。

【図 4】図 4 は、同じものを使用する見本のイムノアッセイテストキット及び方法の説明である。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

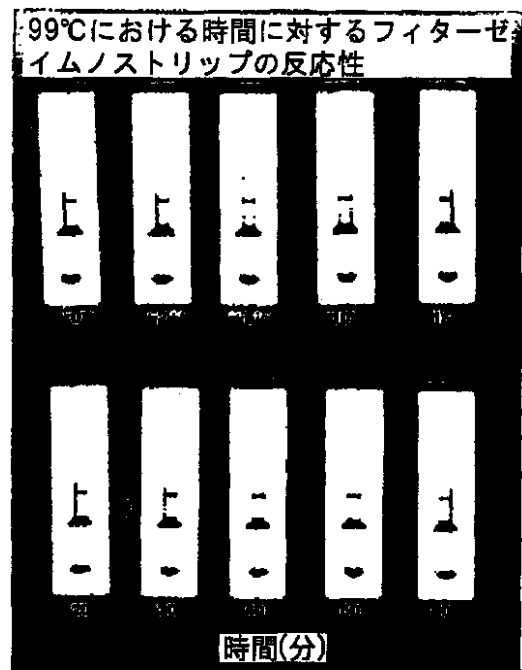


FIGURE 3

【 図 4 】

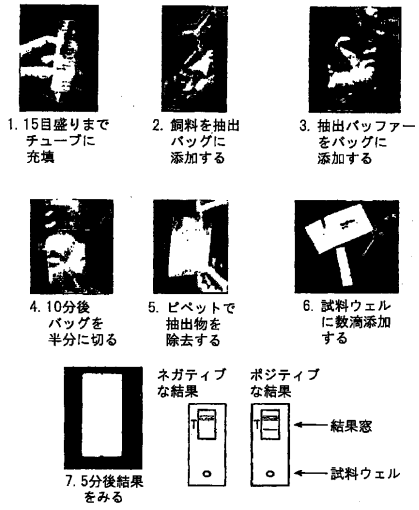


FIGURE 4

【 国際調査報告 】

60600620059



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/21396

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(8) : G01N 33/53		
US CL : 435/4,7.1,7.9,183,283.1,287.1,2887.2,288.7; 422/50,68.1,69,70,82.08,82.05;436/518,528,529,164,166		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
U.S. : 435/4,7.1,7.9,183,283.1,287.1,2887.2,288.7; 422/50,68.1,69,70,82.08,82.05;436/518,528,529,164,166		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,548,019 (LEE et al) 15 April 2003 (15.04.2003) see entire document.	1-25
Y	US 2003/0103958 (SHORT et al) 5 June 2003 (05.06.2003) see entire document.	1-25
Y	US 5,720,971 (BEAUCHEMIN et al) 24 February 1998 (24.02.1998), see entire document.	5
Y	US 6,602,661 (KNEZEVIC et al) 5 August 2003 (05.08.2003), see entire document.	5
Y	US 6,610,494 (MARQUARDT et al) 26 August 2003 (26.08.2003), see entire document.	12-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 November 2005 (16.11.2005)		24 FEB 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Melanie Yu Telephone No. (571) 272-2933
		22.5.2006

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/21396

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
Chemical Abstracts, Medline
search terms: feed enzyme, immunoassay, phytase

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74) 代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74) 代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72) 発明者 ゼイトウニ, リリアン

アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27709, リサーチ トライアングル パーク, コーンウォリス ロード 3054

(72) 発明者 ヤーナル, ミッシェル スーザン

アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27709, リサーチ トライアングル パーク, コーンウォリス ロード 3054

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 DA13

4H045 AA11 AA30 CA31 DA76 DA86 DA89 EA07 EA50 FA72

专利名称(译)	用于检测饲料酶的试剂，方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2007527523A	公开(公告)日	2007-09-27
申请号	JP2006518805	申请日	2004-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	先正达公司参股Schons的股份公司 要海胆莉莲		
申请(专利权)人(译)	先正达公司参股Schons的股份公司 Zeitouni, 莉莲		
[标]发明人	ゼイトウニリリアン ヤーナルミッシェルスーザン		
发明人	ゼイトウニ,リリアン ヤーナル,ミッシェル スーザン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/40 G01N33/532 C12P21/08 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/573		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/40 G01N33/532.Z C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA31 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA07 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 池田 达则 西山雅也		
优先权	60/485602 2003-07-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及免疫学领域，更具体地涉及免疫测定方法，例如ELISA方法，免疫条带测定，试剂盒和用于检测蛋白质和酶的试剂，特别是在饲料酶中。

