

(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2005-315859**(P2005-315859A)**

(43) 公開日 平成17年11月10日(2005.11.10)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53 P

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/543 5 4 5 Z

GO 1 N 33/577

GO 1 N 33/577 B

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2005-63331 (P2005-63331)
 (22) 出願日 平成17年3月8日 (2005.3.8)
 (31) 優先権主張番号 特願2004-102307 (P2004-102307)
 (32) 優先日 平成16年3月31日 (2004.3.31)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000003159
 東レ株式会社
 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
 (72) 発明者 五十嵐 浩司
 愛知県名古屋市港区大江町9番地の1 東
 レ株式会社名古屋事業場内
 (72) 発明者 井戸 隆喜
 愛知県名古屋市港区大江町9番地の1 東
 レ株式会社名古屋事業場内

(54) 【発明の名称】 イヌインターフェロン- γ 測定方法

(57) 【要約】

【課題】 正確かつ迅速にイヌインターフェロン- γ を測定することができる測定方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 標準イヌインターフェロン- γ 溶液と、不溶性担体と、抗イヌインターフェロン- γ 抗体と、標識剤結合抗イヌインターフェロン- γ 抗体と、酵素複合体と、基質液と、反応停止液と必要に応じて使用される発色剤を用いるサンドイッチ法による酵素免疫測定法によってイヌインターフェロン- γ を測定することで、イヌインターフェロン- γ をより正確かつ迅速に測定することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンドイッチ法による酵素免疫測定法によってイヌインターフェロン - γ を測定することを特徴とするイヌインターフェロン - γ 測定方法。

【請求項 2】

標準イヌインターフェロン - γ 溶液、不溶性担体、抗イヌインターフェロン - γ 抗体、標識剤結合抗イヌインターフェロン - γ 抗体、酵素複合体、基質液および反応停止液を用いることを特徴とする請求項 1 記載のイヌインターフェロン - γ 測定方法。

【請求項 3】

さらに発色剤を用いることを特徴とする請求項 2 記載のイヌインターフェロン - γ 測定方法。 10

【請求項 4】

抗イヌインターフェロン - γ 抗体および標識剤結合抗イヌインターフェロン - γ 抗体の抗イヌインターフェロン - γ 抗体がイヌインターフェロン - γ をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 2 または 3 記載のイヌインターフェロン - γ 測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、イヌインターフェロン - γ を測定するために、酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA 法) を用いたモノクローナル抗体を使用するサンドイッチ法によるイヌインターフェロン - γ 測定方法に関するものである。 20

【背景技術】

【0002】

血清などの体液中の抗原性物質を検出したり、またその抗原性物質の濃度を測定する方法として免疫学的測定方法が近年ますます利用されてきている。かかる方法は周知の方法であって、例えば抗原性物質あるいは抗体を放射性物質で標識し、かかる抗原性物質と抗体との間に錯体を形成させ標識成分を測定することによって測定すべき抗原性物質を検出したり、その濃度を測定することから構成されている。 30

【0003】

また、近年の遺伝子操作技術の進歩により各種疾病の治療に有望な生体内に存在するサイトカインなどの有用タンパク質が次々に発見され、医薬品としての用途開発研究が盛んに行われている。なかでもインターフェロン (IFN) は免疫調節作用、抗ウイルス作用を持つ生理活性物質であり医薬用途で注目されている。遺伝子操作技術によりヒトの IFN のみならず、ウシ、ウマ、ネコなどの動物の IFN も大量生産が可能となり、その結果ウイルス病や腫瘍などの治療薬としての IFN の用途開発研究が行われているものもある。

【0004】

イヌについても、 α , β , γ 各タイプの IFN が報告されている。イヌには、乳腺腫瘍など多数の腫瘍、パルボウイルス感染症、ジステンバー感染症など多数のウイルス病およびアトピー性皮膚炎などの多数の皮膚病などが知られている。これらの治療薬としてイヌ IFN - γ が特に有効であると考えられるので、発明者らによってイヌ IFN - γ の動物用医薬品としての開発を進めている。 40

【0005】

イヌ IFN - γ を動物用医薬品として開発するにあたっては、当然イヌ IFN - γ を測定する必要がある。従来、イヌ IFN - γ の測定方法として BCA 試薬などを用いたタンパク質濃度の測定、細胞変性効果による抗ウイルス活性測定などが用いられている。

【0006】

一方、イヌインスリンを測定する方法としては、特許文献 1 にサンドイッチ法による酵 50

素免疫測定法によって測定する方法が記載されている。

【特許文献1】特開平11-626322号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、タンパク質濃度測定の場合は、測定サンプル中のイヌIFN- γ を高純度に精製する必要がある。また抗ウイルス活性測定は操作が煩雑かつ測定に長時間を要するうえ、測定誤差が生じやすいという欠点を有している。したがって、イヌIFN- γ の測定方法としてより簡便、迅速かつ高感度な測定方法が望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らはかかる状況に鑑み、イヌIFN- γ を測定する方法を鋭意検討した結果、イヌIFN- γ をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体および、標識剤結合イヌIFN- γ モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ法によるELISA法によりイヌIFN- γ を正確かつ迅速に測定できることを見出して本発明に至った。したがって本発明は、「抗イヌIFN- γ 抗体および標識剤結合抗イヌIFN- γ 抗体を用いたサンドイッチ法によるELISA法によってイヌIFN- γ を測定するイヌIFN- γ の測定方法」である。

【発明の効果】

【0009】

本発明にかかるイヌIFN- γ 測定方法は、従来のイヌIFN- γ 測定方法として知られる抗ウイルス活性測定など比較して、より正確かつ迅速にイヌIFN- γ を測定することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明におけるイヌIFN- γ の測定方法は上記したように、抗イヌIFN- γ 抗体および標識剤結合抗イヌIFN- γ 抗体を用いるサンドイッチ法によるELISA法である。以下に発明の詳細を説明する。

【0011】

標準イヌIFN- γ 溶液の調製

本発明のイヌIFN- γ 測定方法に使用されるイヌIFN- γ 標準溶液は当業者に周知の手法によって調製することができる。例えば、イヌIFN- γ のDNAをカイコ多核体ウイルスに組み込みカイコ細胞で発現可能な組換えベクターとし、カイコ細胞で生産する方法（特開平9-234085）で作製することができる。このようにして作製したイヌIFN- γ を用いて標準イヌIFN- γ 溶液を調製する。標準イヌIFN- γ 溶液は、原液を緩衝液で希釈して得ることができる。

【0012】

抗イヌIFN- γ モノクローナル抗体の製造

本発明において用いられる抗イヌIFN- γ モノクローナル抗体は、常法に従って、例えば、ケーラー・ミルシュタイン法（Nature, vol. 256, pp. 495-497, 1975）に従って、イヌIFN- γ を免疫抗原として免疫した免疫動物の脾臓細胞と、同種動物由来のミエローマ細胞とを細胞融合して得られた融合細胞（ハイブリドーマ）から製造することができる。本発明において用いる免疫原としてのイヌIFN- γ を免疫する免疫動物としてマウス、ヌードマウス、ラットなどがあげられる。免疫原の免疫量は、免疫動物の種類、免疫注射部位などにより適宜決められるが、例えばマウスの場合には、1匹あたりの1回の免疫注射量は0.1 μ gないし5mgの免疫原を含むように免疫注射するのが好ましい。また、免疫原の免疫注射は、フロイント完全アジュバンド、フロイント不完全アジュバンドなどの公知のアジュバンドを添加して行うのが好ましい。このように免疫動物に初回免疫した後、免疫原を2回ないし6回追加免疫注射した。追加免疫注射も、初回免疫の場合と同様に、公知のアジュバンドを添加混合して行うのが好まし

10

20

30

40

50

い。初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をE L I S A法などによって繰り返し行って、抗体価がプラトーに達したら、免疫原を生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）に溶解した免疫原の水溶液を免疫動物に注射して、最終免疫とする。この最終免疫後適当な時間が経過した後、免疫動物の脾細胞、リンパ節細胞または末梢リンパ球などの抗体産生能を持つ細胞を取得する。

【0013】

このようにして取得したかかる抗体産生能を有する細胞を同種哺乳動物由来の骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）と細胞融合される。かかるミエローマ細胞としては、例えば、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリジシル・トランスフェラーゼ（G P R T）またはチミンキナーゼ（T K）などの酵素欠損細胞株などが挙げられる。この細胞融合は、各種分子量のポリエチレングリコール、リポゾーム、センダイウイルスなどの融合促進剤を用いてまたは電気融合法により行うことができる。そのミエローマ細胞がG P R T欠損株またはT K欠損細胞株由来である場合には、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを含む選択用培地（H A T培地）を用いることにより、抗体産生能を有する細胞とミエローマ細胞との融合細胞（ハイブリドーマ）のみ選択的に培養し、増殖させることができる。このようにして得られたハイブリドーマの培養上清をE L I S A法、ウエスタンブロット法などの免疫学的測定法により測定することにより、変性もしくは修飾されていないイヌI F N - γ とは結合していなくて、変性もしくは修飾されたイヌI F N - γ と特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することができ、この方法と、限界希釈法などの公知のスクリーニング法とを組み合わせることによって、本発明に使用するモノクローナル抗体の産生細胞株を単離して得ることができる。このモノクローナル抗体産生細胞株を、無血清培地などの適当な培地で培養して、例えば、その培養上清から、本発明に使用するモノクローナル抗体を常法により得ることができる。

10

20

【0014】

標識剤結合抗イヌI F N - γ 抗体の製造

次いで、上記のようにして別途製造した抗I F N - γ モノクローナル抗体を標識剤と結合する。結合の方法は常法に従って、例えば「続生化学実験講座5免疫生化学研究法」（東京化学同人発行：1986年発行、102 - 112頁）に記載された方法に従って行うことができる。使用される標識剤としては、例えば β -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、等の酵素、ビオチン、ヘム等の補酵素、補欠分子族などが挙げられる。

30

【0015】

抗イヌI F N - γ モノクローナル抗体の固相化

前記のようにして得られた抗イヌI F N - γ モノクローナル抗体は次いで不溶性担体に固相化して固相試薬が製造される。使用される不溶性担体としては、例えばポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、スチレン-無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライドなどの高分子物質、紙、ガラス、金属、アガロースおよびこれらの組み合わせなどが挙げられる。また、かかる不溶性担体の形状としても特に限定されたものではなく、例えば、マイクロタイタープレート、ディスクなどの平板状、ビーズなどの粒子状、試験管などの管状、繊維状、膜状、ラテックス粒子などの微粒子状、セルなど種々の形状であってもよく、測定条件によって適宜変えることができる。また、上記抗イヌI F N - γ モノクローナル抗体を上記不溶性担体に固相化して固相試薬を得る方法にしても当業者に周知の方法が使用できる。

40

【0016】

抗原と固相試薬との反応による抗原-抗体複合体の生成

次いで、上記の用にして調製された固相試薬を検体もしくは標準イヌI F N - γ 溶液と標識剤結合抗イヌI F N - γ モノクローナル抗体とを反応させる。この反応により、検体もしくは標準イヌI F N - γ 溶液に存在する抗原としてのイヌI F N - γ を固相化試薬標

50

識剤結合抗イヌIFN- γ モノクローナル抗体に結合して、サンドイッチ型抗原-抗体複合体を生成する。

【0017】

抗体-標識物質複合体の生成

上記のようにして生成された抗原-抗体複合体は更に標識物質を一定温度で一定時間反応させて、抗体-標識物質複合体が生成される。標識物質としては酵素、発光物質、蛍光物質などが一般的に使用される。酵素としては例えば、ペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼなどが挙げられる。発光物質としては例えば、イソルシノール、ルシゲニン、などが挙げられ、また蛍光物質としては例えば、フルオレッセインイソチオシアネート、フィコビリプロテインなどが挙げられる。

10

【0018】

標識物質として酵素を使用する場合には、その活性を測定するためには基質を使用するのが好ましいが、必要に応じて発色剤も使用することができる。例えば、酵素としてHRPを使用する場合には、基質として過酸化水素、ペルオキシダーゼアビジンなどを使用し、発色剤としては2,2'-アジノジ[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンなどを使用するのが好ましい。また、酵素としてアルカリフォスファターゼを使用する場合には、基質としては θ -ニトロフェニルフォスフェートなどを使用するのが好ましく、更に酵素として β -D-ガラクトシダーゼを使用する場合には、基質としては、p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、フルオレッセイン-ジ-(β -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシドなどを使用するのが好ましい。

20

【0019】

次いで、上記のようにして得られた抗体-標識物質複合体に基質液を反応させる。この反応を所定時間行って、反応が進行した段階で、その反応を停止させるために反応停止剤が使用される。使用する反応停止剤としては例えば、硫酸などの酸などの当業者にとって周知の薬剤を使用することができる。得られた反応液は、所定の波長でその吸光度が測定されて、該抗体-標識物質複合体中における該標識物質としての酵素の活性を測定する。例えば、上記のようにして得られた抗原-抗体複合体に、ストレプトアビジン複合体を作用させて抗体-酵素複合体を形成させ、該複合体にp-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを反応させて、遊離したp-ニトロフェノールを、波長415nmで比色定量することによって、該複合体中の β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定することができる。同様に、該複合体にペルオキシダーゼアビジン複合体を反応させる場合には、 θ -フェニレンジアミンでは波長412nm、テトラメチルベンチジンでは波長450nmで比色定量する事によって、該複合体中のペルオキシダーゼ活性を測定することができる。

30

【0020】

標準イヌIFN- γ 濃度の検量曲線の作製

標準イヌIFN- γ 溶液濃度の算出は、方対数グラフ用紙のX線(log側)にイヌIFN- γ 濃度(ng/ml)を、Y軸にそれぞれの吸光度をとり、標準イヌIFN- γ 濃度に対して得られた吸光度をプロットして標準曲線を作成し、この標準曲線から、検体の吸光度に対応するイヌIFN- γ 濃度を読みとることによって、イヌIFN- γ 濃度を算出することができる。

40

【0021】

従って、本発明にかかるイヌIFN- γ 測定方法は、一つの実施態様として、上記したように標準イヌIFN- γ 溶液と、不溶性担体と、標識剤結合抗イヌIFN- γ 抗体と、酵素複合体と、基質液と、反応停止液と、必要に応じて使用される発色剤を用いる。本発明のイヌIFN- γ 測定方法によってイヌIFN- γ の測定を行うには、抗原抗体反応を利用することを特徴としている。この抗原抗体反応を利用したIFN- γ などのタンパク質を測定する手法も種々開発されているが、本発明に利用できるかかる測定手法は特に限定されるものではなく、タンパク質を測定するために採用されている手法であればいづれ

50

でもよく、特に酵素免疫法（E I A法）を使用するのが好ましい。また、このE I A法には、競合法と非競合法とがあるが、本発明にかかる測定方法はいずれも利用することができる。

【0022】

次に、本発明の測定方法にもちいるサンドイッチ法を用いたE L I S A法について説明する。当然のことながら本発明の測定方法は下記に例示した測定手法には何ら限定されるものではないことは明かである。まず、精製した抗I F N - γ 抗体を緩衝液で一定量に希釈し、この抗体溶液の一定量を96穴マイクロタイタープレートの各ウエルに添加して、一定温度で一定時間反応させた後、過剰な抗体液を除去する。その後、プレートの各ウエルに安定化剤、例えばウシ血清アルブミン（B S A）を含むリン酸生理食塩水緩衝液（P B S）を一定量添加して、一定温度で一定時間反応させることによって抗I F N - γ 固相化プレートを得ることができる。抗I F N - γ 固相化プレートの各ウエルにP B Sで希釈した検体または標準I F N - γ 溶液を一定量添加して、一定温度で一定時間反応する。反応完了後、ウエル内の溶液を除去して、洗浄液で洗浄する。その後、各ウエルにビオチン結合抗I F N - γ 抗体などの標識剤結合抗I F N - γ 抗体P B S含有溶液を一定量添加して、一定温度で一定時間反応する。この反応完了後、ウエル内の溶液を除去し、洗浄液で洗浄する。洗浄した後、ペルオキシダーゼアピチン結合体などや、3, 3', 5, 5'-テトラメチル-ベンジジン（T M B）塩酸塩と過酸化水素との混合物などの酵素液や基質液を各ウエルに一定量添加して、一定温度で一定時間反応させる。この反応を停止させるために、一定時間反応させた後、硫酸などの反応停止液を添加する。このようにして得られた反応液を分光光度計を用いて所定の波長における吸光度を測定する。この測定値を、別に作成した標準I F N - γ 溶液の検量曲線にプロットすることにより検体サンプルに含まれるI F N - γ 濃度を測定する。

【実施例】

【0023】

以下、実施例をあげて本発明を更に具体的に説明する。ただし、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0024】

標準イヌI F N - γ 溶液の調製

前記文献の方法に準じて標準イヌI F N - γ 溶液を調製した。標準イヌI F N - γ 溶液は、原液をP B Sで希釈して所定の濃度に希釈して得た。

【0025】

抗イヌI F N - γ 抗体の作製

イヌI F N - γ 抗原をマウスに免疫して下記のような限界希釈法の常法によってモノクローナル抗体を作製した。イヌI F N - γ 抗原を滅菌蒸留水に溶解し、I F N - γ 濃度10mg/mlとした抗原液を調製した。この溶液にフロイント完全アジュバンドを等量混合し、油性エマルジョンとした。これにB A L B / cマウス（7週齢、雌）の背部に0.2mlずつ初回免疫として皮下注射した。初回免疫後、7日目と16日目に追加免疫をし、更に細胞融合の3日前に最終免疫として抗原液を0.25mg/0.2mlずつ腹腔内に注射した。最終免疫後3日してマウスの脾臓を摘出して、その脾細胞をミエローマ細胞と10:1の割合となるように混合して、50%ポリエチレングリコール4000を用いて細胞融合させ、H A T培地を用いて選択した。細胞融合後14日目に培養上清中のイヌI F N - γ に対する活性をE I A法によって測定した。つまりイヌI F N - γ を100 μ lのタンパク濃度で固相化した96穴E I Aプレートの各ウエルに細胞融合の培養液を200 μ lずつ添加し、37で1時間反応させた。反応後洗浄して、ペルオキシダーゼ標識抗マウスI g G（1:500）200 μ lを添加した。洗浄後、基質液として0.1M θ -フェニレンジアミンと0.012%過酸化水素水との混合液を各ウエルに200 μ lずつ添加し、室温で15分間反応させた。その後、4N硫酸を各ウエルに50 μ lずつ添加して酵素反応を停止させた。次いで、492nmにおける吸光値を測定して、イヌI F N - γ のみに対して陽性のクローンを限界希釈法により2回クローニングした。このクロ

ーニングによって腹水として得られたモノクローナル抗体 1 D 6 株、1 H 1 0 株、5 E 1 株等を次のようにして精製した。つまり、得られたそれぞれの腹水 1 m l に対して、P B S 1 m l で 2 倍に希釈し、飽和硫酸アンモニウム 2 m l を滴下し、4 で 4 時間放置した後、3 0 0 0 r p m で 2 0 分間遠心分離をし、得られた沈殿を P B S 2 m l で浮遊させて透析後、0 . 2 μ m のフィルターで濾過して精製抗イヌ I F N - γ 抗体のクローンのイムノグロブリンサブクラスは I g G 1 であることが判明した。

【 0 0 2 6 】

(実施例 1)

抗体固相化プレートの作製

9 6 穴プレートの各ウエルに、上記のようにして得た抗イヌ I F N - γ 抗体 1 D 6 株を炭酸水素ナトリウムで 5 0 0 0 倍に希釈して、1 0 0 μ l ずつ分注して、コーティングして、4 で一晩静置後、洗浄液で洗浄した。その後、B S A を含む P B S を各ウエルに 1 0 0 μ l ずつ添加し、室温で 1 から 2 時間静置後、洗浄液で洗浄した。

10

【 0 0 2 7 】

抗原 - 抗体複合体の生成

上記のようにして抗イヌ I F N - γ 抗体 1 D 6 株を固相化した 9 6 穴プレートの各ウエルに P B S で希釈したイヌ I F N - γ 含有検体を 1 0 0 μ l ずつ添加し、コーティングして室温で 1 時間反応後、洗浄液で洗浄した。その後、P B S で 2 0 0 0 倍に希釈したビオチン標識結合抗イヌ I F N - γ 抗体 5 E 1 株を 1 0 0 μ l ずつ各ウエルに添加し、コーティングして室温で 1 時間反応後、洗浄液で洗浄した。

20

【 0 0 2 8 】

抗体 - 酵素複合体の生成

上記のようにして反応させた後洗浄した該抗体固相化プレートの各ウエルにペルオキシダーゼ - アビジン結合体を 1 0 0 μ l ずつ各ウエルに添加し、室温で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄した。

【 0 0 2 9 】

吸光度の測定

発色液として T M B 塩酸塩と過酸化水素との混合物を 1 0 0 μ l ずつ該抗体固相化プレートの各ウエルに添加し、室温で 5 から 3 0 分反応させた。その後反応停止液として 6 N 硫酸と 2 N 塩酸を等量混合したものを 1 0 0 μ l ずつ各ウエルに添加し、反応を停止させた。得られた反応液をプレートリーダーで 4 9 2 n m の波長を測定した。

30

【 0 0 3 0 】

標準イヌ I F N - γ 曲線の検量曲線の作成

標準イヌ I F N - γ 濃度の算出は片対数グラフ用紙の X 線 (l o g 側) にイヌ I F N - γ 濃度、Y 軸にそれぞれの吸光度をとり、標準イヌ I F N - γ 濃度に対して得られた吸光度をプロットして標準曲線を作成した。図 1 に標準イヌ I F N - γ 濃度の標準曲線を示す。この標準曲線から、イヌ I F N - γ の濃度は、検体の吸光度に対応するイヌ I F N - γ 濃度を読みとることによって算出した。

【 0 0 3 1 】

(実施例 2)

抗体固相化プレートの作製

9 6 穴プレートの各ウエルに、上記のようにして得た抗イヌ I F N - γ 抗体 1 H 1 0 株を炭酸水素ナトリウムで 1 0 0 0 倍に希釈して、1 0 0 μ l ずつ分注して、コーティングして、4 で一晩静置後、洗浄液で洗浄した。その後、B S A を含む P B S を各ウエルに 1 0 0 μ l ずつ添加し、室温で 1 から 2 時間静置後、洗浄液で洗浄した。

40

【 0 0 3 2 】

抗原 - 抗体複合体の生成

上記のようにして抗イヌ I F N - γ 抗体 1 H 1 0 株を固相化した 9 6 穴プレートの各ウエルに P B S で希釈したイヌ I F N - γ 含有検体を 1 0 0 μ l ずつ添加し、コーティングして室温で 1 時間反応後、洗浄液で洗浄した。その後、P B S で 1 0 0 0 倍に希釈したビ

50

オチン標識結合抗イヌIFN- γ 抗体5E1株を100 μ lづつ各ウエルに添加し、コーティングして室温で1時間反応後、洗浄液で洗浄した。

【0033】

抗体-酵素複合体の生成

上記のようにして反応させた後洗浄した該抗体固相化プレートの各ウエルに2000倍に希釈したペルオキシダーゼ-アビジン結合体を100 μ lづつ各ウエルに添加し、室温で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄した。

【0034】

吸光度の測定

発色液としてTMB塩酸塩と過酸化水素との混合物を100 μ lづつ該抗体固相化プレートの各ウエルに添加し、室温で5から30分反応させた。その後反応停止液として6N硫酸と2N塩酸を等量混合したものを100 μ lづつ各ウエルに添加し、反応を停止させた。得られた反応液をプレートリーダーで492nmの波長を測定した。

【0035】

標準イヌIFN- γ 曲線の検量曲線の作成

標準イヌIFN- γ 濃度の算出は片対数グラフ用紙のX線(log側)にイヌIFN- γ 濃度、Y軸にそれぞれの吸光度をとり、標準イヌIFN- γ 濃度に対して得られた吸光度をプロットして標準曲線を作成した。図2に標準イヌIFN- γ 濃度の標準曲線を示す。この標準曲線から、イヌIFN- γ の濃度は、検体の吸光度に対応するイヌIFN- γ 濃度を読みとることによって算出した。

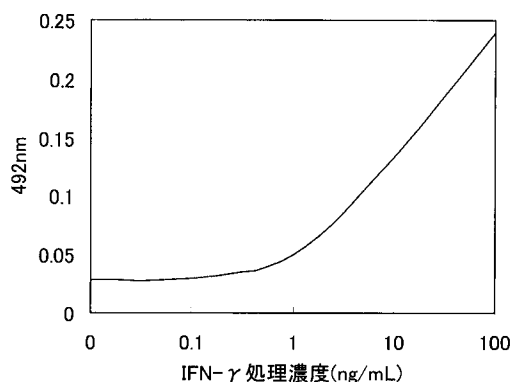
【図面の簡単な説明】

【0036】

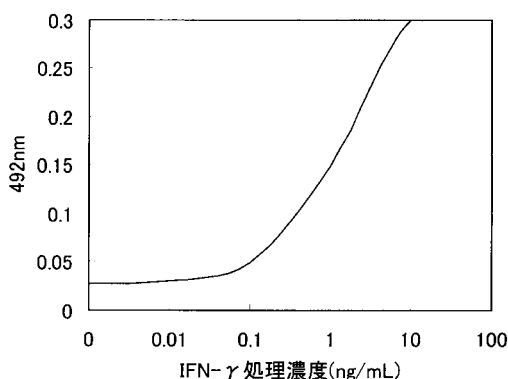
【図1】実施例1で得られた標準イヌIFN- γ 溶液の標準曲線を示す図である。

【図2】実施例2で得られた標準イヌIFN- γ 溶液の標準曲線を示す図である。

【図1】



【図2】



专利名称(译)	犬干扰素- γ 测量方法		
公开(公告)号	JP2005315859A	公开(公告)日	2005-11-10
申请号	JP2005063331	申请日	2005-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
[标]发明人	五十嵐浩司 井戸隆喜		
发明人	五十嵐 浩司 井戸 隆喜		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.P G01N33/543.545.Z G01N33/577.B		
优先权	2004102307 2004-03-31 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够准确，快速地测量犬干扰素- γ 的测量方法。
 ŽSOLUTION：犬干扰素- γ 通过酶免疫测定法使用参考犬干扰素- γ 溶液通过夹心法测量;不溶性载体;抗犬干扰素- γ 抗体;与标记试剂结合的抗犬干扰素- γ 抗体;酶复合物;基质液体;反应停止液体;和需要时使用的着色剂。由此可以准确且快速地测量犬干扰素- γ 。 Ž