

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/038936

発行日 平成27年3月26日(2015.3.26)

(43) 国際公開日 平成25年3月21日(2013.3.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02	4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N 9/99	
G O 1 N 33/531 (2006.01)	G O 1 N 33/531	B
G O 1 N 33/535 (2006.01)	G O 1 N 33/535	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

出願番号	特願2013-533612 (P2013-533612)	(71) 出願人	302019245 タカラバイオ株式会社 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2012/072343	(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(22) 国際出願日	平成24年9月3日(2012.9.3)	(72) 発明者	中川 一夫 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラ バイオ株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2011-199101 (P2011-199101)	(72) 発明者	上萩 京子 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラ バイオ株式会社内
(32) 優先日	平成23年9月13日(2011.9.13)	(72) 発明者	浅田 起代蔵 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラ バイオ株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	Fターム(参考)	4B050 KK06 LL03
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ペルオキシダーゼ反応の停止方法及び反応停止剤

(57) 【要約】

ペルオキシダーゼ及びテトラアルキルベンジジン又はその塩を含有するペルオキシダーゼ反応液に、クエン酸を好ましくは終濃度が0.125M以上となるよう添加することを特徴とする、ペルオキシダーゼ反応の停止方法。本発明により、ペルオキシダーゼ活性の測定の感度あるいは精度を向上することができ、加えて反応停止作業、反応停止剤の安全性の改善という効果も得ることができることから、本発明は、免疫生化学分野、遺伝子工学分野、応用生命科学分野、及び医学分野において有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ペルオキシダーゼ及びテトラアルキルベンジジン又はその塩を含有するペルオキシダーゼ反応液にクエン酸を添加して反応を停止させることを特徴とする、ペルオキシダーゼ反応の停止方法。

【請求項 2】

テトラアルキルベンジジン又はその塩が 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン又はその塩である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

ペルオキシダーゼ反応液に終濃度が 0 . 1 2 5 M 以上となるようクエン酸を添加する請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

ペルオキシダーゼがペルオキシダーゼ標識物を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

ペルオキシダーゼ標識物がペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原である請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

クエン酸を有効成分として含有する、請求項 1 ~ 5 いずれかに記載のペルオキシダーゼ反応の停止方法に使用される反応停止剤。

【請求項 7】

(1 - a) テトラアルキルベンジジン又はその塩、及び
(1 - b) クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤を含有するペルオキシダーゼ活性を測定するためのキット。

【請求項 8】

クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤が、テトラアルキルベンジジン又はその塩とペルオキシダーゼを含有する反応液に、クエン酸の終濃度が 0 . 1 2 5 M 以上となるように添加される反応停止剤である請求項 7 記載のキット。

【請求項 9】

(2 - a) テトラアルキルベンジジン又はその塩、
(2 - b) ペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原、及び
(2 - c) クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤を含有する酵素免疫測定法のためのキット。

【請求項 10】

クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤が、テトラアルキルベンジジン又はその塩とペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原を含有する反応液に、クエン酸の終濃度が 0 . 1 2 5 M 以上となるように添加される反応停止剤である請求項 9 記載のキット。

【請求項 11】

テトラアルキルベンジジン又はその塩が 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン又はその塩である請求項 7 ~ 10 いずれかに記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ペルオキシダーゼによる呈色反応の停止方法、及び当該停止方法に使用する停止剤に関する。更に詳しくは、テトラアルキルベンジジン又はその塩を発色物質としたペルオキシダーゼによる呈色反応の停止方法、及び当該停止方法に使用する停止剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

体液中の成分、例えば血液中あるいは尿中の抗原又は抗体などを測定する方法として、

10

20

30

40

50

抗原又は抗体を酵素で標識して使用する酵素免疫測定方法が普及している。代表的な方法としてサンドイッチ法があるが、この方法では(1)まず測定しようとする物質(抗原)に対する第1の抗体をプレートやビーズなどの担体に固相化しておき、これに抗原を添加して抗原を固相化抗体に結合させる。(2)次いで酵素で標識した第2の抗体を添加し、固相化抗体-抗原-標識抗体複合体を形成する。(3)そして抗原に結合しなかった酵素標識抗体を洗浄して除去し、その後固相に結合した酵素活性を測定することにより抗原量を求める。すなわち、酵素活性は固相に結合した酵素標識抗体の量によって決まり、その酵素標識抗体量は固相化抗体に結合した抗原量によって決まるので、酵素活性は抗原量に相関することになる。ここで酵素としては、分子量が比較的小さく、反応が早く、短時間で感度の高い測定が期待できるためペルオキシダーゼが広く用いられている。

10

【0003】

従来からペルオキシダーゼ活性は種々の反応方法で測定されているが、過酸化物の存在下、発色物質を酸化させることにより色素を形成させ、これを比色定量する方法が最も一般的に行なわれている。かかる発色物質としては種々のものが使用されてきた。代表的な発色物質としてオルトフェニレンジアミンなどが用いられていたが、人体に有害であり使用時に注意が必要であった。新たな発色物質としてテトラアルキルベンジジン、なかでも非常に鋭敏な感度を得られかつ非発癌性である3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(以下、TMBZという)が開発され(非特許文献1)、その有用性のためサンドイッチ法(特許文献1)やテストストリップ(特許文献2)に用いられている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開昭62-28666号公報

【特許文献2】特開昭52-21892号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】テトラヘドロソ(Tetrahedron)、第30巻、3299-3302頁、1974年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

ペルオキシダーゼによる呈色反応の停止には、一般的に0.5~2Mの硫酸のような強酸を用いる。ところがテトラアルキルベンジジンを発色物質に用いたペルオキシダーゼ反応の停止に硫酸を用いた場合、発色強度が高くなるにつれ退色の速さが速く、かつ沈殿物の生成リスクが高くなり、データの信頼性に影響を及ぼす可能性があることが分かった。また退色は1時間を超えると顕著になるため、測定の時間的條件が著しく制限される点においても問題があることが分かった。

【0007】

上記の現状に鑑み、本発明の目的は、ペルオキシダーゼによる呈色反応において反応停止後の退色を抑制するペルオキシダーゼによる呈色反応の停止方法、及び当該停止方法に使用する停止剤を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上述した反応停止後の呈色安定性の改善という問題を解決するために鋭意検討を重ねた。その結果、発色物質としてテトラアルキルベンジジンを含有するペルオキシダーゼ反応において、クエン酸を含有する反応停止剤を添加した反応液の呈色安定性が高いことを見出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち本発明を概説すれば、下記[1]~[11]に関する。

[1] ペルオキシダーゼ及びテトラアルキルベンジジン又はその塩を含有するペルオキシ

50

ダーゼ反応液にクエン酸を添加して反応を停止させることを特徴とする、ペルオキシダーゼ反応の停止方法。

[2] テトラアルキルベンジジン又はその塩が3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン又はその塩である[1]記載の方法。

[3] ペルオキシダーゼ反応液に終濃度が0.125 M以上となるようクエン酸を添加する[1]記載の方法。

[4] ペルオキシダーゼがペルオキシダーゼ標識物を含む[1]記載の方法。

[5] ペルオキシダーゼ標識物がペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原である[4]記載の方法。

[6] クエン酸を有効成分として含有する、[1]~[5]いずれかに記載のペルオキシダーゼ反応の停止方法に使用される反応停止剤。 10

[7] (1-a) テトラアルキルベンジジン又はその塩、及び
(1-b) クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤
を含有するペルオキシダーゼ活性を測定するためのキット。

[8] クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤が、テトラアルキルベンジジン又はその塩とペルオキシダーゼを含有する反応液に、クエン酸の終濃度が0.125 M以上となるように添加される反応停止剤である[7]記載のキット。

[9] (2-a) テトラアルキルベンジジン又はその塩、
(2-b) ペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原、及び
(2-c) クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤
を含有する酵素免疫測定法のためのキット。 20

[10] クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤が、テトラアルキルベンジジン又はその塩とペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原を含有する反応液に、クエン酸の終濃度が0.125 M以上となるように添加される反応停止剤である[9]記載のキット。

[11] テトラアルキルベンジジン又はその塩が3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン又はその塩である[7]~[10]いずれかに記載のキット。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、ペルオキシダーゼ活性の比色定量において、反応後の呈色が安定化されるため、ペルオキシダーゼ活性の測定の感度あるいは精度の向上が実現される。また、硫酸による反応停止の際に見られる沈殿の発生がないために、ペルオキシダーゼ活性が高い領域での測定も可能となった。加えてクエン酸は、食品添加物として使用されており人体への毒性がないため、反応停止作業、反応停止剤の安全性の改善という効果も得ることができ、強酸で懸念される流通上の問題が生じにくい。更にクエン酸溶液は金属腐食性が低いことにより、分析機器を腐蝕する恐れもすくないことも本発明の効果として挙げることができる。 30

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、硫酸又は各濃度のクエン酸水溶液の添加によるペルオキシダーゼによる呈色反応停止後の反応液の吸光度と経過時間との関係を示す図である。 40

【図2】図2は、硫酸添加による反応停止後のペルオキシダーゼによる呈色反応液の吸光度とPIP濃度との関係を示す図である。

【図3】図3は、クエン酸添水溶液加による反応停止後のペルオキシダーゼによる呈色反応液の吸光度とPIP濃度との関係を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

ペルオキシダーゼは過酸化物、例えば過酸化水素のペルオキシドを還元する酵素である。ペルオキシダーゼは西洋わさび、牛乳、酵母、白血球、赤血球などから抽出されるものが知られているが、本発明には研究用試薬、標識用酵素として汎用されている西洋わさび 50

由来のペルオキシダーゼが好ましい。

【0013】

本発明でいうペルオキシダーゼによる呈色反応とは、ペルオキシダーゼが触媒する反応、例えば過酸化水素の分解反応に共役した色素の呈色反応を言う。本明細書では、かかる色素のことを発色物質といい、ペルオキシダーゼによる呈色反応のことを単にペルオキシダーゼ反応と記載することもある。当該反応を利用するものとして、例えば石川榮治ら編集「酵素免疫測定法」、30 - 49頁（医学書院1982年発行）には、ペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原を用い、ペルオキシダーゼ活性量を過酸化物及び発色物質を含有する基質溶液を用いて測定する酵素免疫測定法が記載されている。本発明では発色物質としてテトラアルキルベンジジン又はその塩を用いることから、ペルオキシダーゼ活性量を過酸化物及びテトラアルキルベンジジン又はその塩から選択される発色物質を含有する基質溶液を用いて測定する方法ならいずれの方法にも適用される。

10

【0014】

具体的には、本発明の方法は過酸化物、例えば過酸化水素をペルオキシダーゼを用いて検出する方法や試料中のペルオキシダーゼを検出・測定する方法に利用することが可能である。また、前記のとおり、ペルオキシダーゼは抗体を用いた物質の検出に広く利用されており、本発明の方法はペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原を利用した酵素免疫測定法に好適に使用することができる。本発明では、かかる方法においてペルオキシダーゼ反応が行われる液のことをペルオキシダーゼ反応液といい、該反応液には、過酸化物、ペルオキシダーゼ、発色物質としてテトラアルキルベンジジン又はその塩が含有される。なお、これらの成分は、予め反応液に存在したものであっても、別途添加したものであってもよい。

20

【0015】

本発明のペルオキシダーゼ反応の停止方法では、前記ペルオキシダーゼ反応液にクエン酸を添加して反応を停止させることを特徴とする。本発明において、該反応液におけるクエン酸終濃度が0.125 M以上であると安定にペルオキシダーゼによる呈色反応が停止される。また3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンを発色物質としたペルオキシダーゼによる呈色反応のエンドポイントアッセイで用いられる450 nmにおける吸光度測定を行う場合、更にクエン酸終濃度が高いほど吸光度が高くなり、測定感度の面で好ましい。よって、クエン酸濃度としては、ペルオキシダーゼ反応液へ添加された後の終濃度が好ましくは0.125 M以上、より好ましくは0.24 M以上、更に好ましくは0.5 M以上、更により好ましくは1 M以上である。また、クエン酸の濃度に特に上限はないが、例えばペルオキシダーゼ反応液への添加後のクエン酸の終濃度が好ましくは3 M以下、より好ましくは1.5 M以下である。また、本発明におけるクエン酸終濃度の好適な範囲は、0.980 M ~ 1.471 Mである（後述の実施例2参照）。本発明では、かかるクエン酸終濃度となるように調製されたクエン酸溶液を、反応停止剤として用いることができる。

30

【0016】

本発明におけるペルオキシダーゼは、ペルオキシダーゼ単体であっても、ペルオキシダーゼ標識物に含まれるものであってもよい。ペルオキシダーゼ標識物としては、ペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原が挙げられるが、標識物の調製は公知の方法に従って行なうことができる。また、本発明に使用されるペルオキシダーゼ標識された抗体としては、測定対象物質に対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のどちらでも良いが、測定の再現性の観点からはペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体が好ましい。抗体のペルオキシダーゼによる標識は公知の方法、例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、過ヨウ素酸を用いる方法、マレイミド基の導入を利用する方法により実施することができる。

40

【0017】

また、本発明で用いられるテトラアルキルベンジジン又はその塩はベンジジンの誘導体であり、溶液中でペルオキシダーゼによる過酸化水素の分解と共役して酸化し強い青色の

50

化合物に変わり、酸性下で黄色となる。テトラアルキルベンジジンとしては、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンが挙げられる。また、その塩としては、例えば 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン二塩酸塩二水和物が挙げられる。

【0018】

なかでも本発明に好ましく用いられる 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMBZ) 又はその塩は非常に鋭敏な感度でペルオキシダーゼ活性を測定することができ、且つ非発癌性であるとされる。本発明に用いられる TMBZ を含む組成物の態様としてはペルオキシダーゼ反応に共役した色素の呈色反応に使用できるものであれば限定はなく、TMBZ の塩酸塩など、又は DMSO 溶液などの市販品を使用することができる。

【0019】

TMBZ は、ペルオキシダーゼによる過酸化水素の分解と共役して酸化し鋭敏に青緑色 ($\lambda_{max} = 655 \text{ nm}$) に発色する。この発色は酸性下では直ちに黄色 ($\lambda_{max} = 450 \text{ nm}$) の色素に変化する。したがって、ペルオキシダーゼによる呈色反応をクエン酸で停止させる本発明の方法では、硫酸を用いる従来の方法と同様に酸性下で反応を停止させることができ、同じ測定波長でペルオキシダーゼ活性の比色定量ができる。

10

【0020】

ペルオキシダーゼ反応が停止される温度としては、クエン酸が反応液に十分混合されれば特に限定はないが、4 ~ 37 °C が好ましく、20 ~ 30 °C がより好ましい。

【0021】

なお、本発明の方法を免疫測定法にて使用する場合、測定対象となる物質に特に限定はない。研究、診断、環境測定などの分野で測定することが望まれ、かつそれに結合する抗体を取得可能である物質を測定対象とすることができる。例えばヒトもしくは非ヒト動物の生体由来物質、植物、微生物、ウイルスに由来する抗原やアレルゲン等が挙げられる。

20

【0022】

かくして、ペルオキシダーゼの反応をクエン酸によって停止することが出来、その結果、テトラアルキルベンジジンの酸性下での呈色によりペルオキシダーゼ活性を測定することが可能となる。従って、本発明の別の態様として、ペルオキシダーゼ及びテトラアルキルベンジジン又はその塩を含有するペルオキシダーゼ反応液にクエン酸を添加して反応を停止させることを特徴とする、ペルオキシダーゼ活性の測定方法が挙げられる。

【0023】

また、本発明の一態様として、クエン酸を反応液に添加することでペルオキシダーゼ反応を停止させることができることから、クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤を提供する。該反応停止剤は、前記本発明のペルオキシダーゼ反応の停止方法に好適に用いられる。

30

【0024】

本発明における反応停止剤は、有効成分としてクエン酸を含有し、テトラアルキルベンジジンとペルオキシダーゼを含有する反応液に添加された際にペルオキシダーゼの触媒する反応を停止し、かつ反応停止後に生じた黄色色素の吸光度が安定に保持されるものであれば限定はない。具体的には、例えば、クエン酸水溶液が挙げられる。

【0025】

反応停止剤におけるクエン酸含有量は一概には決定されず、ペルオキシダーゼ反応液へ添加された後のクエン酸終濃度が好ましくは 0.125 M 以上、より好ましくは 0.5 M 以上、更に好ましくは 1 M 以上となるよう調製されたクエン酸溶液が反応停止剤として適している。また、特に上限はないが、例えば反応液への添加後のクエン酸の終濃度が好ましくは 3 M 以下、より好ましくは 1.5 M 以下となるよう調製された反応停止剤が本発明に適している。かかるクエン酸濃度となるのであれば、反応停止剤の調製方法は特に制限されず、例えば、クエン酸一水和物を水に溶解して調製することができる。

40

【0026】

なお、本明細書において「クエン酸を有効成分として含有する」とは、ペルオキシダーゼ反応を実質的に停止する成分としてクエン酸を含有することを意味し、本発明の反応停

50

止剤には、クエン酸以外に、本発明の効果を損なわない範囲内で、ペルオキシダーゼ反応を停止可能な公知の成分が含まれていてもよく、また、ペルオキシダーゼ反応に関与しない成分が含まれていてもよい。

【0027】

上記の、本発明のペルオキシダーゼ反応の停止方法に使用される反応停止剤を含有するキットも本発明の一態様である。

【0028】

具体的には、

(1-a) テトラアルキルベンジジン又はその塩、及び

(1-b) クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤を含有するペルオキシダーゼ活性を測定するためのキット（ペルオキシダーゼ活性測定用キット）が挙げられる。

10

【0029】

該キットにおける(1-a) テトラアルキルベンジジン又はその塩としては、本発明のペルオキシダーゼ反応の停止方法にて用いられるものと同様のものを用いることができ、なかでも、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン又はその塩が好ましい。また、(1-b) 反応停止剤は、本発明の反応停止剤であれば特に限定はない。

【0030】

キットの形態や使用方法是特に制限されず、例えば、(1-b) クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤を、(1-a) テトラアルキルベンジジンとペルオキシダーゼを含有する反応液に、クエン酸の終濃度が0.125 M以上となるように添加することで、ペルオキシダーゼ反応を停止させてペルオキシダーゼ活性を測定することができる。該反応液には、本発明のペルオキシダーゼ反応の停止方法における反応液に含有される成分と同様の成分を添加してもよい。また、反応停止剤の添加は、反応を停止させたいポイントで添加すればよい。

20

【0031】

また、

(2-a) テトラアルキルベンジジン又はその塩、

(2-b) ペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原、及び

(2-c) クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤を含有する酵素免疫測定法のためのキットが挙げられる。

30

【0032】

該キットにおける(2-a) テトラアルキルベンジジン又はその塩としては、本発明のペルオキシダーゼ反応の停止方法にて用いられるものと同様のものを用いることができ、なかでも、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン又はその塩が好ましい。

【0033】

(2-b) ペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原としては、本発明のペルオキシダーゼ反応の停止方法にて記載したものが例示され、その調製方法も同様である。

【0034】

(2-c) 反応停止剤は、本発明の反応停止剤であれば特に限定はない。

40

【0035】

キットの形態や使用方法是特に制限されず、例えば、(2-c) クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤を、(2-a) テトラアルキルベンジジン又はその塩と(2-b) ペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原を含有する反応液に、クエン酸の終濃度が0.125 M以上となるように添加してペルオキシダーゼ活性を測定することで、酵素免疫測定を行なうことができる。該反応液には、本発明のペルオキシダーゼ反応の停止方法における反応液に含有される成分と同様の成分を添加してもよい。また、反応停止剤の添加は、反応を停止させたいポイントで添加すればよい。

【0036】

より詳しくは、本発明を利用した酵素免疫測定法の一例としては、例えば下記のような

50

工程 1) ~ 5) の手順での測定が例示される。

- 1) 固相化一次抗体による測定対象物質の捕捉と固相の洗浄。
- 2) 測定対象物質へのペルオキシダーゼ標識二次抗体の結合、並びに固相の洗浄。
- 3) 基質溶液 (過酸化水素並びに TMBZ) を添加してインキュベーション (ペルオキシダーゼによる呈色反応)。
- 4) 本発明の反応停止剤を添加してペルオキシダーゼによる呈色反応を停止。
- 5) 吸光度を測定。

【0037】

上記 1) ~ 3) の工程は、従来のペルオキシダーゼ標識された抗体を用いた酵素免疫測定法とまったく同一の操作で実施することができる。本発明では、反応停止後に生じる呈色の退色が抑制されていることから、工程 4) と 5) の間に時間がかかった場合であっても、再現性のあるデータを取得することができる。

10

【0038】

なお、本発明が上記のようなサンドイッチ法の以外の酵素免疫測定法 (例えば競合法、ウェスタンブロット法) にも適用できることは言うまでもない。

【0039】

測定対象物質の検出・定量に使用される、

- (3-a) テトラアルキルベンジジン又はその塩、
- (3-b) 測定対象物質に結合するペルオキシダーゼ標識抗体、又はペルオキシダーゼ標識された測定対象物質、及び
- (3-c) クエン酸を有効成分として含有するペルオキシダーゼ反応の反応停止剤、を含有するキットも本発明に包含される。

20

【0040】

以上詳細に説明したように、本発明の態様として、

- [12] 発色物質としてテトラアルキルベンジジンを含有するペルオキシダーゼ反応液にクエン酸を添加することを特徴とする、ペルオキシダーゼによる呈色反応の安定化方法、
- [13] テトラアルキルベンジジンが 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンである [12] 記載の方法、
- [14] ペルオキシダーゼ反応液に終濃度が 0.125 M 以上となるようクエン酸を添加する [12] 記載の方法、
- [15] ペルオキシダーゼ反応液がペルオキシダーゼ標識物を含有する反応液である [12] 記載の方法、
- [16] ペルオキシダーゼ標識物がペルオキシダーゼ標識された抗体又は抗原である [15] 記載の方法、
- [17] クエン酸を有効成分として含有する、[12] ~ [16] いずれかに記載のペルオキシダーゼによる呈色反応の安定化方法に使用される反応停止剤及び / 又は安定化剤、も提供される。

30

【実施例】

【0041】

以下に実施例により、更に詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲内に限定されるものではない。なお、本明細書において、室温とは特に断りのない限り 4 ~ 37 のことである。

40

【0042】

実施例 1 クエン酸を含有する反応停止剤によるペルオキシダーゼによる呈色反応の停止
1.5 mL Micro Centrifuge Tube (Treff社製) に TMB One Component HRP Microwell Substrate (SurModics社製) 500 µL と本発明者らが取得した過ヨウ素酸をもちいた抗 Rat Collagen 2 抗体 - ペルオキシダーゼ標識物液 20 µL を添加して攪拌後、8 分間室温で静置してペルオキシダーゼによる呈色反応を行った。次に各種反応停止剤を 500 µL 添加して反応を停止した。反応停止後の各反応液を 96 Well Mic

50

ro titer Plate (Thermo Fisher Scientific 社製) 各 1 ウェルに 100 μ L ずつ分注し、Thermo Max Micro plate reader (Molecular Devices 社製) を用いて停止直後から 5 分毎に 450 nm における吸光度を測定した。反応は 4 連で行い測定値の平均値を採用した。ここで反応停止剤は、硫酸 (和光純薬工業社製) を精製水で希釈して調製した 0.5 M 硫酸、又はクエン酸一水和物 (ナカライテスク社製) 0.25 M、0.5 M、1 M、1.5 M、2 M 水溶液を使用し、各反応停止剤に用いられた硫酸又はクエン酸の反応液における終濃度は、硫酸が 0.245 M、クエン酸が 0.123 M、0.245 M、0.490 M、0.735 M、0.980 M であった。

【0043】

その結果を図 1 に示す。すなわち図 1 は、0.5 M 硫酸 (図 1 中 ●) 又は各濃度のクエン酸水溶液 (図 1 中、0.25 M (×)、0.5 M (○)、1 M (□)、1.5 M (◇)、2 M (△)) の添加による反応停止後の反応液の吸光度と経過時間との関係を示す図である。図 1 に示すとおり、反応停止を目的として 0.5 M 硫酸、又は各濃度のクエン酸水溶液を添加したところ、添加直後から反応液の吸光度上昇がみられなくなった。このことから、クエン酸は硫酸と同様、ペルオキシダーゼによる呈色反応を停止できることが示された。今回用いた最も希薄なクエン酸水溶液 (濃度 0.25 M) であっても添加後のペルオキシダーゼによる呈色反応は進まず当該反応を停止できることが確認された。一方、硫酸による反応停止後の反応液と比較した各クエン酸水溶液による反応停止後の反応液の 450 nm における吸光度は、クエン酸終濃度が低い場合には低く、クエン酸の終濃度が高くなるにつれて高くなり、0.5 M 硫酸による反応停止後の反応液と同等の吸光度を得るには 2 M 以上のクエン酸水溶液の添加、すなわち終濃度 1 M 以上のクエン酸の添加が必要であることが判明した。

【0044】

更に驚くべきことに、吸光度 4 付近を示す本測定条件において、図 1 に示すとおり硫酸による反応停止条件では反応停止後の反応液が退色し吸光度の低下が観測されたことと比較し、クエン酸による反応停止条件ではいずれのクエン酸濃度条件においても退色が抑制され、吸光度の安定性が顕著に改善されたことが判明した。また、硫酸による反応停止条件で反応停止後に見られた沈殿物はクエン酸による反応停止条件では見られなかった。

【0045】

実施例 2 0.5 M 硫酸による反応停止後の反応液と同等の吸光度が得られるクエン酸水溶液濃度の同定

実施例 1 と同様の試験を行い、反応停止直後の反応液の 450 nm における吸光度を測定した。反応は 4 連で行い、測定値の平均値を表 1 に示した。ここで反応停止剤は 0.5 M 硫酸、又は 2 M、2.25 M、2.4 M、3 M となるクエン酸一水和物水溶液を使用した。また、各反応液における硫酸又はクエン酸の終濃度は、硫酸が 0.245 M、クエン酸が 0.980 M、1.103 M、1.176 M、1.471 M であった。表 1 に示されるように、終濃度 0.980 ~ 1.471 M の範囲で実質的に 0.5 M 硫酸添加による反応を停止条件と同様の測定値を得た。

【0046】

【表 1】

表 1

反応停止剤	濃度 (M)	反応液における終濃度 (M)	450 nmにおける吸光度
硫酸	0.5	0.245	3.773
クエン酸水溶液	2	0.980	3.529
	2.25	1.103	3.857
	2.4	1.176	3.836
	3	1.471	3.817

10

【0047】

表 1 に示すとおり 2 M 以上のクエン酸水溶液添加条件において、0.5 M 硫酸添加による反応停止後の反応液と同等の吸光度が安定して得られることが判明した。したがって以降の実施例ではクエン酸を含む反応停止剤として 50 w/v % クエン酸一水和物水溶液を用いることとした。50 w/v % クエン酸一水和物水溶液は同 2.38 M に相当する。

【0048】

実施例 3 ペルオキシダーゼによる呈色反応の安定性の評価

TaKaRa Procollagen type I C-peptide (PIP) EIA Kit (Precoated) (タカラバイオ社製) を用いて以下の試験を行った。キット添付のペルオキシダーゼ標識抗 PIP モノクローナル抗体液を 100 μ L ずつキット添付の抗 PIP モノクローナル抗体プレートの各ウェルに添加した後、あらかじめ調製した各濃度の PIP 液をマイクロピペットで 20 μ L ずつ各ウェルに添加し、37 で 3 時間反応した。PIP 液の投入はすみやかに (5 分以内) 行った。次に反応液を捨て、PBS で 4 回洗浄後、キット添付の TMB Z 溶液を 8 連ピペットで 100 μ L ずつ各ウェルに添加し、室温 (20 ~ 30) で 15 分間反応させた。次に反応停止剤を 100 μ L ずつ、TMB Z 溶液を入れた順番に各ウェルに添加し反応を停止させた後よく混和し、反応停止直後、1 時間後、3 時間後に 450 nm における吸光度を測定した。各測定の間、反応停止後の反応液は室温に静置した。反応は 2 連で行い、測定値の平均値を採用した。ここで反応停止剤には 0.5 M 硫酸、又は 50 w/v % クエン酸一水和物水溶液を使用した。また、各反応液における硫酸又はクエン酸の終濃度は、硫酸が 0.25 M、クエン酸が 1.19 M であった。

20

30

【0049】

その結果を図 2 及び図 3 に示す。すなわち図 2 は、0.5 M 硫酸添加による反応停止直後 (図 2 中○)、1 時間後 (図 2 中□)、3 時間後 (図 2 中) のペルオキシダーゼによる呈色反応液の 450 nm における吸光度と PIP 濃度との関係を示す図である。図 3 は、50 w/v % クエン酸添水溶液加による反応停止直後 (図 3 中●)、1 時間後 (図 3 中■)、3 時間後 (図 3 中) のペルオキシダーゼによる呈色反応液の 450 nm における吸光度と PIP 濃度との関係を示す図である。図 2 から明らかなように、0.5 M 硫酸添加による反応停止後の反応液は、特に PIP 濃度 640 ng/mL 以上の条件において退色が著しく、経時的な吸光度低下の度合いが高く、データの信頼性が損なわれた。一方でクエン酸添加による反応停止後の反応液は、図 3 から明らかなように、反応停止 3 時間後であっても反応停止直後の吸光度カーブを維持していた。このことから本発明によるクエン酸を有効成分として含む反応停止剤を用いたことによって、ペルオキシダーゼによる呈色反応停止後の反応液の呈色安定性が飛躍的に向上することが明らかとなった。このことは測定の精度が向上し、かつ測定の時間的条件の制限が改善される効果を生んだことを示す。

40

50

【 0 0 5 0 】

また、0.5 M 硫酸添加による反応停止後の反応液は、PIP 濃度が 640 ng/mL 以上の条件において、沈殿の発生が観察された。一方 50 w/v % クエン酸水溶液添加による反応停止後の反応液では PIP 濃度 2560 ng/mL であっても沈殿が発生せず正常に吸光度測定が可能であった。このことは本発明によるクエン酸を有効成分として含む反応停止剤を用いることによって、従来 PIP 濃度 640 ng/mL 以下と制限されていた当該キットの測定可能範囲が広がるという利点が得られたことを示す。

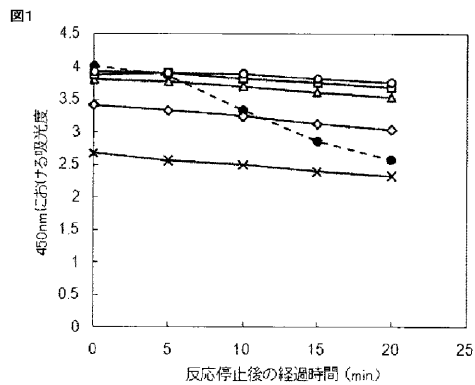
【産業上の利用可能性】

【 0 0 5 1 】

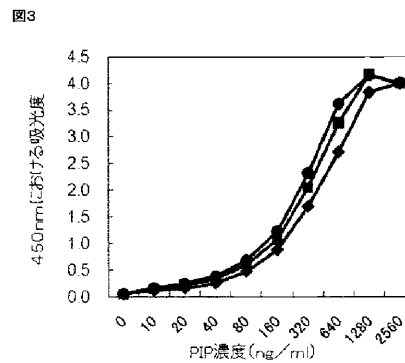
本発明により、ペルオキシダーゼ活性の測定の感度あるいは精度を向上することができる。したがって本発明は、免疫生化学分野、遺伝子工学分野、応用生命科学分野、及び医学分野において有用である。

10

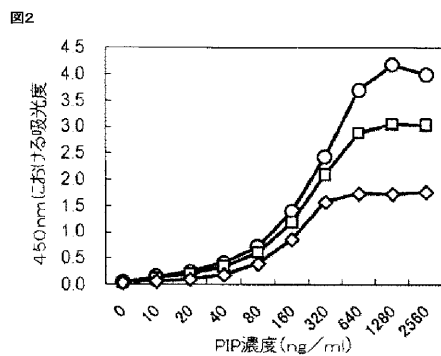
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/072343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/02(2006.01)i, C12N9/99(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, G01N33/535(2006.01)i

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)
C12N9/02, C12N9/99, G01N33/531, G01N33/535

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/131379 A2 (BASF AG.), 14 December 2006 (14.12.2006), page 17, lines 9 to 10 & EP 1894001 A2 & JP 2008-542774 A & US 2009/123377 A1	1-11
A	WO 90/013561 A1 (BOOTS CO. PLC.), 15 November 1990 (15.11.1990), page 25, line 12 & EP 470136 A1 & JP 04-506003 A & EP 470136 B1 & US 5380656 A & US 5468480 A	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ 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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 September, 2012 (13.09.12)Date of mailing of the international search report
25 September, 2012 (25.09.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/072343

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/096116 A2 (ACTELION PHARM LTD.), 11 November 2004 (11.11.2004), page 67, line 25 & EP 1622564 A2 & US 2006/223795 A1 & JP 2006-525259 A	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/072343

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Since the invention of claim 1 of the present application has been publicly known (for example, see p. 17, 1.9-10 in WO 2006/131379 A2), there is no same or corresponding special technical feature among the inventions of claims 1-11 of the present application.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 7 2 3 4 3									
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N9/02(2006.01)i, C12N9/99(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, G01N33/535(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N9/02, C12N9/99, G01N33/531, G01N33/535											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2012年										
日本国実用新案登録公報	1996-2012年										
日本国登録実用新案公報	1994-2012年										
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	WO 2006/131379 A2 (BASF AG) 2006.12.14, p.17, 1.9-10 & EP 1894001 A2 & JP 2008-542774 A & US 2009/123377 A1	1-11									
A	WO 90/013561 A1 (BOOTS CO PLC) 1990.11.15, p.25, 1.12 & EP 470136 A1 & JP 04-506003 A & EP 470136 B1 & US 5380656 A & US 5468480 A	1-11									
A	WO 2004/096116 A2 (ACTELION PHARM LTD) 2004.11.11, p.67, 1.25 & EP 1622564 A2 & US 2006/223795 A1 & JP 2006-525259 A	1-11									
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。											
<table border="0"> <tr> <td> * 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 </td> <td> の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献 </td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献						
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 13.09.2012		国際調査報告の発送日 25.09.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 吉森 晃	4 B 3 6 3 3 電話番号 03-3581-1101 内線 3448								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 7 2 3 4 3

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

本願請求項1に係る発明は、公知であった（例えば、WO 2006/131379 A2のp. 17, 1.9-10を参照）のだから、本願請求項1～11に係る発明の間に、同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

フロントページの続き

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

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	停止过氧化物酶反应的方法和反应终止剂		
公开(公告)号	JPWO2013038936A1	公开(公告)日	2015-03-26
申请号	JP2013533612	申请日	2012-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	宝酒造公司		
申请(专利权)人(译)	TakaraBio公司		
[标]发明人	中川一夫 上萩京子 浅田起代蔵		
发明人	中川 一夫 上萩 京子 浅田 起代蔵		
IPC分类号	C12N9/02 C12N9/99 G01N33/531 G01N33/535		
CPC分类号	C12Q1/28		
FI分类号	C12N9/02 C12N9/99 G01N33/531.B G01N33/535		
F-TERM分类号	4B050/KK06 4B050/LL03		
优先权	2011199101 2011-09-13 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种停止过氧化物酶反应的方法，该方法包括将柠檬酸加入到包含过氧化物酶和四烷基联苯胺或其盐的过氧化物酶反应溶液中，使得最终浓度优选为0.125M以上。根据本发明，可以提高过氧化物酶活性的测定的灵敏度或准确度，另外，可以得到反应停止工作的效果和反应停止剂的安全性的提高，因此，本发明可以应用于免疫生物化学领域。它在基因工程，应用生命科学和医学领域很有用。

(19) 日本国特許庁(JP)		再 公 表 特 許(A1)		(11) 国際公開番号 WO2013/038936	
発行日 平成27年3月26日(2015.3.26)		(43) 国際公開日 平成25年3月21日(2013.3.21)			
(51) Int. Cl.		F 1		テーマコード(参考) 4 B 0 5 0	
C 1 2 N 9/02 (2006.01)		C 1 2 N 9/02			
C 1 2 N 9/99 (2006.01)		C 1 2 N 9/99			
G 0 1 N 33/531 (2006.01)		G 0 1 N 33/531		B	
G 0 1 N 33/535 (2006.01)		G 0 1 N 33/535			
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)			
出願番号 特願2013-533612 (P2013-533612)		(71) 出 願 人 302019245 タカラバイオ株式会社			
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/072343		(74) 代理人 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 100095832			
(22) 国際出願日 平成24年9月3日(2012.9.3)		(72) 発明者 中川 一夫 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラ バイオ株式会社内			
(31) 優先権主張番号 特願2011-199101 (P2011-199101)		(72) 発明者 上萩 京子 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラ バイオ株式会社内			
(32) 優先日 平成23年9月13日(2011.9.13)		(72) 発明者 浅田 起代蔵 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラ バイオ株式会社内			
(33) 優先権主張国 日本国(JP)		Fターム(参考) 4B050 KK06 LL03		最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 ペルオキシターゼ反応の停止方法及び反応停止剤					