

(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2007-333723**(P2007-333723A)**

(43) 公開日 平成19年12月27日(2007.12.27)

(51) Int. Cl.

G 0 1 N 33/531 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/531

B

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 28 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2007-24437 (P2007-24437)
 (22) 出願日 平成19年2月2日 (2007.2.2)
 (31) 優先権主張番号 特願2006-135032 (P2006-135032)
 (32) 優先日 平成18年5月15日 (2006.5.15)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 504258527
 国立大学法人 鹿児島大学
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (72) 発明者 松山 航
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
 国立大学法人鹿児島大学内

(54) 【発明の名称】 抗体希釈用組成物

(57) 【要約】

【課題】免疫学的分析の精度を上げることができる抗体希釈用組成物を提供する。

【解決手段】抗体希釈用組成物に寒天、カラジーン又はそれらの混合物を含有する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

寒天、カラジーン又はそれらの混合物を含有することを特徴とする、免疫分析の精度を向上させるための及び/又は免疫分析における非特異的な検出を抑制するための抗体希釈用組成物。

【請求項2】

上記カラジーンがカラジーンであることを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。

【請求項3】

さらに糖及びゼラチンを含有することを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。 10

【請求項4】

塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤から成る群より選択される1以上の成分を含有することを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。

【請求項5】

上記寒天の濃度が0.1~5重量%であることを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。

【請求項6】

上記寒天の濃度が0.2~3重量%であることを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。 20

【請求項7】

上記カラジーンの濃度が0.01~5重量%であることを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。

【請求項8】

上記カラジーンの濃度が0.03~2重量%であることを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。

【請求項9】

上記糖がショ糖であることを特徴とする、請求項3記載の抗体希釈用組成物。

【請求項10】

上記糖の濃度が0.0017~0.83モル濃度であることを特徴とする、請求項3記載の抗体希釈用組成物。 30

【請求項11】

上記ゼラチンの濃度が0.01~2重量%であることを特徴とする、請求項3記載の抗体希釈用組成物。

【請求項12】

上記塩が塩化ナトリウムであることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

【請求項13】

上記塩の濃度が10mM~2Mであることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

【請求項14】

上記キレート剤がエチレンジアミン四酢酸であることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。 40

【請求項15】

上記キレート剤の濃度が1mM~100mMであることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

【請求項16】

上記緩衝液がトリスであることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

【請求項17】

上記緩衝液の濃度が10mM~1Mであることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

【請求項18】

上記非イオン系界面活性剤がTween 20又はTriton X-100であることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

【請求項19】

上記非イオン系界面活性剤の濃度が0.01～1容量%であることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

【請求項20】

請求項1～19のいずれか1項記載の抗体希釈用組成物を使用することを特徴とする免疫学的分析方法。

【請求項21】

上記免疫学的分析がウエスタンブロッティング又は免疫染色であることを特徴とする、請求項20記載の方法。 10

【請求項22】

請求項1～19のいずれか1項記載の抗体希釈用組成物と抗体とを含む免疫学的分析用キット。

【請求項23】

上記免疫学的分析がウエスタンブロッティング又は免疫染色であることを特徴とする、請求項22記載の免疫学的分析用キット。

【請求項24】

以下の工程：

(i)塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤からなる群より選択される1以上の成分を含む水中の混合液を攪拌する工程； 20

(ii)工程(i)で生じた混合液を加温下でインキュベートする工程；

(iii)前記混合液を冷却する工程；及び

(iv)カラジーンを添加して攪拌する工程；

を含む、抗体希釈用組成物の製造方法。

【請求項25】

上記工程(i)の水中の混合液がさらにゼラチンを含むことを特徴とする、請求項24記載の方法。

【請求項26】

上記工程(ii)において、インキュベーションの温度を35～40とすることを特徴とする、請求項24記載の方法。 30

【請求項27】

上記工程(iii)において、混合液を4～30に冷却することを特徴とする、請求項24記載の方法。

【請求項28】

上記工程(iv)において、カラジーンと共に糖を添加して攪拌することを特徴とする、請求項24に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】 40

本発明は、免疫学的分析の精度を上げることができる抗体希釈用組成物、その製造方法及び使用方法、並びに抗体希釈用組成物を含む免疫学的分析用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

免疫染色は、検体(例えば、血液や細胞の溶解液等)中に目的のタンパク質又は目的の抗体が存在するか否かを調べる方法であり、免疫学や分子生物学等の幅広い分野の研究で用いられている。また、当該免疫染色により、目的のタンパク質の量や活性化の有無を調べることができる。

【0003】

免疫染色では、使用する抗体や血清等の実験材料をバッファーで希釈して使用する。免 50

疫染色において、目的のタンパク質を検出する上で最も問題となることは、目的のタンパク質に対応するバンド以外の非特異的なバンドが出現する現象である。この現象は、「バックグラウンドがあがる」とも呼ばれる。

【0004】

そこで、従来より、このような非特異的なバンドの出現を防ぐべく、例えばブロッキング溶液(例えば、ブロッカー(登録商標)Catalog number:UK-B25(大日本住友製薬株式会社製))を使用する方法、あるいは市販のバッファー(例えば、DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components Catalog number:S3022(Dako Cytomation社製))を使用して抗体を希釈する方法がある。

【0005】

しかしながら、疫染色において、これら従来の方法を用いても、非特異的なバンドが出現することが多い。

【0006】

そこで、疫染色における非特異的なバンドの出現を抑制する方法や試薬が望まれている。

【0007】

一方、特許文献1には、疫学的測定に用いる疫反応を促進するための組成物が開示されている。

【0008】

また、特許文献2には、抗原を安定化するための緩衝液が開示されている。

さらに、特許文献3には、タンパク及びペプチドのための安定化溶液が開示されている。

【0009】

しかしながら、これまでに、寒天又はカラジーン(carrageenan)を含有する抗体希釈用組成物の、疫分析の精度を向上させる目的及び/又は疫分析における非特異的な検出を抑制する目的での使用は知られていなかった。

【0010】

【特許文献1】国際公開第2005/121790号パンフレット

【特許文献2】特表2001-517799号公報

【特許文献3】特表平10-500704号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、上述した実情に鑑み、疫学的分析の精度を向上させるための及び/又は疫学的分析における非特異的な検出を抑制するための抗体希釈用組成物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、寒天又はカラジーンを含有する抗体希釈用組成物を使用することで、疫学的分析の精度を上げることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

本発明は以下を包含する。

(1) 寒天、カラジーン又はそれらの混合物を含有することを特徴とする、疫分析の精度を向上させるための及び/又は疫分析における非特異的な検出を抑制するための抗体希釈用組成物。

(2) 上記カラジーンがカラジーンであることを特徴とする、(1)記載の抗体希釈用組成物。

(3) さらに糖及びゼラチンを含有することを特徴とする、(1)記載の抗体希釈用組成物。

10

20

30

40

50

(4) 塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤から成る群より選択される1以上の成分を含有することを特徴とする、(1)記載の抗体希釈用組成物。

(5) 上記寒天の濃度が0.1~5重量%であることを特徴とする、(1)記載の抗体希釈用組成物。

【0014】

(6) 上記寒天の濃度が0.2~3重量%であることを特徴とする、(1)記載の抗体希釈用組成物。

(7) 上記カラジーンの濃度が0.01~5重量%であることを特徴とする、(1)記載の抗体希釈用組成物。

(8) 上記カラジーンの濃度が0.03~2重量%であることを特徴とする、(1)記載の抗体希釈用組成物。

10

(9) 上記糖がショ糖であることを特徴とする、(3)記載の抗体希釈用組成物。

(10) 上記糖の濃度が0.0017~0.83モル濃度であることを特徴とする、(3)記載の抗体希釈用組成物。

【0015】

(11) 上記ゼラチンの濃度が0.01~2重量%であることを特徴とする、(3)記載の抗体希釈用組成物。

(12) 上記塩が塩化ナトリウムであることを特徴とする、(4)記載の抗体希釈用組成物。

(13) 上記塩の濃度が10mM~2Mであることを特徴とする、(4)記載の抗体希釈用組成物。

20

(14) 上記キレート剤がエチレンジアミン四酢酸であることを特徴とする、(4)記載の抗体希釈用組成物。

(15) 上記キレート剤の濃度が1mM~100mMであることを特徴とする、(4)記載の抗体希釈用組成物。

【0016】

(16) 上記緩衝液がトリスであることを特徴とする、(4)記載の抗体希釈用組成物。

(17) 上記緩衝液の濃度が10mM~1Mであることを特徴とする、(4)記載の抗体希釈用組成物。

30

(18) 上記非イオン系界面活性剤がTween 20又はTriton X-100であることを特徴とする、(4)記載の抗体希釈用組成物。

(19) 上記非イオン系界面活性剤の濃度が0.01~1容量%であることを特徴とする、(4)記載の抗体希釈用組成物。

(20) (1)~(19)のいずれかに記載の抗体希釈用組成物を使用することを特徴とする免疫学的分析方法。

【0017】

(21) 上記免疫学的分析がウエスタンブロッティング又は免疫染色であることを特徴とする、(20)記載の方法。

(22) (1)~(19)のいずれかに記載の抗体希釈用組成物と抗体とを含む免疫学的分析用キット。

40

(23) 上記免疫学的分析がウエスタンブロッティング又は免疫染色であることを特徴とする、(22)記載の免疫学的分析用キット。

(24) 以下の工程：

(i) 塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤からなる群より選択される1以上の成分を含む水中の混合液を攪拌する工程；

(ii) 工程(i)で生じた混合液を加温下でインキュベートする工程；

(iii) 前記混合液を冷却する工程；及び

(iv) カラジーンを添加して攪拌する工程；

を含む、抗体希釈用組成物の製造方法。

50

(25) 上記工程(i)の水中の混合液がさらにゼラチンを含むことを特徴とする、(24)記載の方法。

【0018】

(26) 上記工程(ii)において、インキュベーションの温度を35 ~ 40 とすることを特徴とする、(24)記載の方法。

(27) 上記工程(iii)において、混合液を4 ~ 30 に冷却することを特徴とする、(24)記載の方法。

(28) 上記工程(iv)において、カラジーンと共に糖を添加して攪拌することを特徴とする、(24)記載の方法。

【発明の効果】

10

【0019】

本発明に係る抗体希釈用組成物によれば、非特異的な検出を抑制し、それによって免疫学的分析の精度を上げることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る抗体希釈用組成物は、寒天、カラジーン又はそれらの混合物を含有する組成物である。本発明に係る抗体希釈用組成物は、免疫学的分析に使用する抗体を希釈するために使用する。本発明に係る抗体希釈用組成物を使用すれば、免疫学的分析の精度を上げることができる。

20

【0021】

具体的には、免疫学的分析において、目的のタンパク質(抗原)以外のタンパク質の非特異的な検出を抑制することができる。例えば、ウエスタンブロッティング又は免疫染色において本発明に係る抗体希釈用組成物を使用することで、非特異的なバンドの出現を抑制することができる。

【0022】

本発明の組成物には、寒天又はカラジーン以外に、塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤から成る群より選択される1以上の成分、特に好ましくはこれら全ての成分を含有する。その他、例えば、アジ化ナトリウム、グリセロール、ウシ血清アルブミン(BSA)、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、ゼラチン、糖等を混合液中に含有させてもよい。ゼラチン及び糖を含有することが特に好ましい。本発明に使用し得る糖は、例えばショ糖、セルロースが挙げられ、特にショ糖を含むことが好ましい。糖の添加は、カラジーン溶解性を高めるのに有効である。また、ゼラチンの添加は本組成物の汎用性の向上に効果的である。その際、混合液中の糖の濃度は0.0017~0.83モル濃度、好ましくは0.005~0.33モル濃度となるように調整する。混合液中のゼラチンの濃度は0.01~2重量%、好ましくは0.05~1重量%となるように調整する。また、本発明の組成物の成分の混合に使用する水として、例えば、2回蒸留水(D2W)、蒸留水、滅菌水等を使用することができる。

30

【0023】

使用する寒天としては、例えば、特級粉末寒天、粉末寒天、粉寒天、糸寒天、角寒天等が挙げられ、特に特級粉末寒天が好ましい。混合液中の寒天の濃度は0.1~5重量%、好ましくは0.2~3重量%となるように調製する。

40

【0024】

使用するカラジーンは、カラジーン、カラジーン及びカラジーンが挙げられ、特にカラジーンを使用することが好ましい。混合液中のカラジーン濃度は0.01~5重量%、好ましくは0.03~2重量%である。

【0025】

一方、塩としては、その形態は限定されないが、例えば塩化ナトリウム(NaCl)、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム等が挙げられ、特にNaClが好ましい。混合液中の塩の濃度は10mM~2M、好ましくは100mM~1.5Mとなるように調製する。

50

【0026】

キレート剤としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸(HEDTA)、ジヒドロキシエチルエチレンジアミン二酢酸(DHEDDA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、EDTA金属塩等が挙げられ、特にEDTAが好ましい。EDTAを使用する際は、例えばpH7.0~8.5、特にpH8のものを使用することが好ましい。混合液中のキレート剤の濃度は1mM~100mM、好ましくは3mM~50mMとなるように調製する。

【0027】

また、緩衝液としては、例えばトリス(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン；以下、「Tris」という)、グリシン、フタル酸、クエン酸、コハク酸、酢酸、リン酸、ホウ酸、炭酸、グッドバッファー(MES、PIPES、MOPS、HEPES、ピストリス等)等が挙げられ、特にTrisが好ましい。Trisを使用する際は、例えばpH7.0~8.0、特にpH7.4のものを使用することが好ましい。混合液中の緩衝液の濃度は10mM~1M、好ましくは30mM~600mMとなるように調製する。

10

【0028】

さらに、非イオン系界面活性剤としては、例えばTween 20(Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate(ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート))、Triton X-100(Octylphenolpoly(ethylene glycolether)(オクチルフェノールポリ(エチレングリコールエーテル))、Tween 80、Brij 35、Triton X-114、Nonidet P-40(NP-40)、Octyl b-glucoside等が挙げられ、特にTween 20又はTriton X-100が好ましい。混合液中の非イオン系界面活性剤の濃度は0.01~1容量%、好ましくは0.03~0.6容量%となるように調製する。

20

【0029】

本発明の別の態様では、本発明の抗体希釈用溶液の製造方法が提供される。

寒天を含有する本発明の抗体希釈用組成物の製造方法では、先ず寒天を含有する混合液を攪拌する。攪拌においては、温度は、例えば10~30、好ましくは15~20とする。攪拌速度は、例えば200~1500rpm、好ましくは600~800rpmとする。また攪拌時間は例えば1~6時間、好ましくは1~2時間とする。

【0030】

次いで、攪拌後の混合液をインキュベートする。インキュベーションにおいて、温度は例えば35~40、好ましくは37とする。また、インキュベーション時間は、例えば5~24時間、好ましくは8~12時間とする。

30

【0031】

以上に説明した方法により、本発明に係る、寒天を含有する抗体希釈用組成物を製造することができる。

【0032】

カラジーンを含有する本発明の抗体希釈用組成物の製造方法は、(i)塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤からなる群より選択される1以上の成分を含む水中の混合液を攪拌する工程；(ii)工程(i)で生じた混合液を加温下でインキュベートする工程；(iii)前記混合液を冷却する工程；及び(iv)カラジーンを添加して攪拌する工程を含む。

【0033】

上記工程(i)で、先ずカラジーン及び糖(含有する場合)を除く全ての成分(例えば、ゼラチン、塩、キレート剤、緩衝液、非イオン系界面活性剤等)を含む水中の混合液を攪拌する。攪拌時の温度は、例えば10~30、好ましくは15~20とする。攪拌速度は、例えば200~1500rpm、好ましくは600~800rpmとする。また攪拌時間は例えば1~6時間、好ましくは1~2時間とする。次いで、上記工程(ii)で攪拌後の混合液をインキュベートする。インキュベーションにおいて、温度は例えば35~40、好ましくは37とする。また、インキュベーション時間は、例えば5~24時間、好ましくは8~12時間とする。インキュベーション後、工程(iii)でこの混合液を4~30、好ましくは4~20、最も好ましくは4~12まで冷却し、次いで工程(iv)でカラジーンを加えて攪拌する。工程(iv)の攪拌速度は、例えば200~1500rpm、好ましくは600~800rpmとし、攪拌時間は、例えば1~

40

50

6時間、好ましくは1~2時間とする。以上に説明した方法により、本発明に係る、カラジーンを含む抗体希釈用組成物を製造することができる。

【0034】

本発明の好ましい態様では、上記工程(i)の混合液はゼラチンを含む。その際、混合液中に含まれるゼラチンの濃度は0.01~2重量%、好ましくは0.05~1重量%となるように調整する。これによって、本組成物の汎用性が向上する。

【0035】

本発明の別の好ましい態様では、工程(iii)においてカラジーンと共に糖を添加して攪拌する。添加する糖の量は、0.0017~0.83モル濃度、好ましくは0.005~0.33モル濃度である。これにより、本発明の溶解速度が増し、混合液中でのカラジーンの十分な溶解を達成することができる。

10

【0036】

なお、本発明に係る抗体希釈用組成物を免疫学的分析で使用する際には、例えば、D2W、蒸留水、滅菌水等の水を使用して適宜希釈したものを使用してもよい。

【0037】

使用時の抗体希釈用組成物における寒天又はカラジーンの濃度は、例えば0.1~0.5重量%、好ましくは0.2~0.3重量%、特に好ましくは0.28重量%とする。

【0038】

また、使用時の抗体希釈用組成物における塩の濃度は、例えば50mM~200mM、好ましくは100mM~150mM、特に好ましくは120mMとする。

20

【0039】

さらに、使用時の抗体希釈用組成物におけるキレート剤の濃度は、例えば1mM~8mM、好ましくは3mM~5mM、特に好ましくは4mMとする。

【0040】

使用時の抗体希釈用組成物における緩衝液の濃度は、例えば10mM~80mM、好ましくは30mM~60mM、特に好ましくは50mMとする。

【0041】

また、使用時の抗体希釈用組成物における非イオン系界面活性剤の濃度は、例えば0.01~1容量%、好ましくは0.03~0.06容量%、特に好ましくは0.05容量%とする。

【0042】

本発明に係る抗体希釈用組成物は、免疫学的分析に使用する抗体の希釈に使用する。本発明に係る抗体希釈用組成物を用いて希釈する抗体としては、特に限定されないが、例えばモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体フラグメント(例えば、Fab、F(ab')₂)、抗血清及び腹水(モノクローナル抗体含有)等が挙げられる。また、標識抗体(例えば、蛍光標識抗体、酵素標識抗体)の希釈にも、本発明に係る抗体希釈用組成物を使用することができる。抗体希釈倍率としては、例えば、2倍、5倍、10倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、5000倍、10000倍等が挙げられる。

30

【0043】

このように希釈された抗体を使用することで、免疫学的分析の精度を上げることができる。ここで、免疫学的分析としては、例えば免疫染色、免疫細胞染色、免疫組織染色、酵素免疫測定(例えば、ELISA、EIA)、放射免疫測定、蛍光抗体法及びフローサイトメトリーが挙げられる。例えば、ウエスタンブロッティング終了後のメンブレンに対して、あるいは生物学的組織又は細胞の免疫学的分析において、本発明の抗体希釈用組成物で希釈した一次抗体及び/又は二次抗体を用いて発色又は免疫染色することで、非特異的な検出を抑制することができる。また、本発明に係る抗体希釈用組成物で希釈した抗体を用いて免疫学的に発色又は染色するときには、従来より使用されるブロッキング溶液を使用する必要がない。さらに、本発明に係る抗体希釈用組成物は、抗体保存に使用することもできる。

40

【0044】

さらに、本発明に係る抗体希釈用組成物は、抗体と共に免疫学的分析用キットとして提供することができる。当該キットでは、本発明に係る抗体希釈用組成物と抗体とは、同じ

50

容器又は別々の容器に入れて提供することができる。またその際、抗体は上記例示の抗体を含む。

【実施例】

【0045】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0046】

実施例1：本発明に係る、寒天を含有する抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング

〔材料及び方法〕

10

1. 抗原及び抗体

抗原には、 1×10^8 個のCOS-1細胞 lysate(以下、「タンパクA」という)及び 1×10^8 個のMCF-7細胞 lysate(以下、「タンパクB」という)を使用した。

【0047】

抗体には、Cell Signaling社製マウスモノクローナル抗Phospho-Estrogen Receptor (Ser118)抗体(#2511)を使用した。

【0048】

2. 本発明に係る寒天含有抗体希釈用組成物の作製

以下のようにして、本発明に係る、寒天を含有する抗体希釈用組成物を作製した。

まず、5M NaCl 240ml、0.5M EDTA(pH8) 80ml、1M Tris(pH7.4) 500ml、Tween 20 5ml及び特級粉末寒天(和光純薬工業株式会社製)28gを混合し、D2Wで合計1Lとした。

20

【0049】

次いで、この混合液を17において700rpmの速度で1時間攪拌した。攪拌後の混合液を、37で10時間インキュベートし、使用時の10倍濃度の抗体希釈用組成物を作製した。さらに、同組成物をD2Wにて1倍濃度に薄め、抗体希釈用組成物とした。

【0050】

3. 電気泳動、ウエスタンブロッティング及び発色

以下のようにして電気泳動、ウエスタンブロッティング及び発色を行った。

3-1. 電気泳動及びウエスタンブロッティング

タンパクA 10 μ l及びタンパクB 10 μ lを、それぞれサンプルバッファー(20%グリセロール、6% SDS、10% 2-メルカプトエタノール)10 μ lと混合し、10分間95でインキュベートした。

30

【0051】

冷却後、これら2種のサンプル20 μ lを、10% Tris-Glycineポリアクリルアミドゲル(Invitrogen社製)にアプライして、電気泳動を15mAで90分間行った。

【0052】

電気泳動後、電気泳動を行ったゲルからHybond-ECL Membrane(Amersham社製)へタンパク質をトランスファーした。トランスファーは、膜の面積 \times 1mAで60分間行った。

【0053】

3-2. 従来方法を用いたウエスタンブロッティング

40

第3-1節のウエスタンブロッティング後に得られた膜を、TBS(0.1% Tween-20含有)で洗浄し、その後、発色に供した。

【0054】

従来方法を用いた場合では、洗浄後の膜をブロッキングバッファー(ブロックエース：大日本住友製薬株式会社製)中に浸し、37で1時間インキュベートした(ブロッキング)。

【0055】

ブロッキング後、膜をTBS(0.1% Tween-20含有)で洗浄し、続いて一次抗体反応を行った。一次抗体として、Dako Cytomation社製DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components(Catalog number:S3022)で1000倍に希釈したマウスモノクローナル抗Ph

50

ospho-Estrogen Receptor (Ser118)抗体を用いた。一次抗体反応は、4 で10時間のインキュベーションにより行った。

【0056】

一次抗体反応後、膜をTBS(0.1% Tween-20含有)で洗浄し、二次抗体反応を行った。二次抗体として、Dako Cytomation社製DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Componentsで1000倍希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体(Amersham社製)を用いた。二次抗体反応は、20 で15分間のインキュベーションにより行った。

【0057】

二次抗体反応後、膜をTBS(0.1% Tween-20含有)で洗浄し、Amersham社製ECL-plusキットを用いて、膜を発色させた。発色後、膜をAmersham社製のHyperfilmECLに露光して解析した。

10

【0058】

3-3. 本発明に係る抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング

第2節で作製した抗体希釈用組成物を使用する場合には、第3-1節のウエスタンブロッティング後に得られた膜を、TBS(0.1% Tween-20含有)で洗浄した後、ブロッティングを行わずに、一次抗体反応を直接行った。一次抗体として、第2節で作製した抗体希釈用組成物で1000倍希釈したマウスモノクローナル抗Phospho-Estrogen Receptor (Ser118)抗体を使用した。一次抗体反応は、4 で10時間のインキュベーションにより行った。

【0059】

一次抗体反応後、膜をTBS(0.1% Tween-20含有)で洗浄し、二次抗体反応を行った。二次抗体として、第2節で作製した抗体希釈用組成物で1000倍希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体(Amersham社製)を用いた。二次抗体反応は、20 で15分間のインキュベーションにより行った。

20

【0060】

二次抗体反応後、膜をTBS(0.1% Tween-20含有)で洗浄し、Amersham社製ECL-plusキットを用いて、膜を発色させた。発色後、膜をAmersham社製のHyperfilmECLに露光して解析した。

【0061】

〔結果〕

上記のように、従来方法で行ったウエスタンブロッティング(第3-2節)の結果と本発明に係る抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング(第3-3節)の結果を図1に示す。図1において、Mは分子量マーカー(kDa)を示す。また、矢印で示すバンドは、目的のタンパク質(Phospho-Estrogen Receptor (Ser118))のバンドである。

30

【0062】

図1に示すように本発明に係る抗体希釈用組成物を使用したウエスタンブロッティングでは、従来方法に比べてはるかに非特異的バンドの出現を抑えていた。

【0063】

実施例2：本発明に係る、カラジーン含有する抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング

〔材料及び方法〕

40

1. 抗原及び抗体

抗原には、上記タンパク質A及びB、並びに 1×10^8 個のTHP-1細胞lysate(以下、「タンパク質C」という)を使用した。

【0064】

抗体には、タンパク質A及びBについてはCell Signaling社製マウスモノクローナル抗Phospho-Estrogen Receptor (Ser118)抗体(#2511)を使用し、タンパク質Cについてはラビットポリクローナル抗DDR1抗体(Santa-Cruz社sc-532)を使用した。

【0065】

2. 本発明に係るカラジーン含有抗体希釈用組成物の作製

以下のようにして、本発明に係る、カラジーン含有する抗体希釈用組成物を作製し

50

た。

【0066】

先ず、200mM NaCl 11.7g、40mM EDTA(pH8.0) 80ml、500mM Tris(pH7.4) 500ml、0.05% Tween 20 0.5ml、0.1%ゼラチン1gを混合し、D2Wで総量1Lとした。この混合液を800rpmで2時間、16 で攪拌し、その後、37 で10時間インキュベートした。次いで、この混合液を室温まで冷やし、0.3重量%のショ糖に続いて0.1重量%のカラジーン(和光純薬工業株式会社035-09693)を添加して800rpmで2時間攪拌することにより、カラジーンを含有する抗体希釈用組成物を完成させた。

【0067】

3. 電気泳動、ウエスタンブロッティング及び免疫染色

10

図2は、上記のようにして製造したカラジーン含有抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。

【0068】

図2A~Bに示されるウエスタンブロッティングは、実施例1に記載の方法に従って行った。タンパク質Cに関するウエスタンブロッティング(図2B)については、一次抗体としてラビットポリクローナル抗DDR1抗体を150倍に希釈したものをを用いた。

【0069】

図2Cは、カラジーンを含む本発明の抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング結果と、カラジーンを含まない本発明の抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング結果との比較を示す。

20

【0070】

図2Cに示される実験において、電気泳動からトランスファーまでは実施例1に記載される方法で行った。カラジーン無含抗体希釈用組成物を用いる方法では、トランスファー後、カラジーン無含抗体希釈用組成物でマウスモノクローナル抗アクチン抗体(Santa-Cruz社sc-8432)を200倍に希釈し、4 で10時間のインキュベーション後に洗浄し、カラジーン無含抗体希釈用組成物で1000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体で二次抗体反応を行い、実施例1に記載の方法で発色させた。カラジーン含有抗体希釈用組成物を用いる方法では、カラジーン無含抗体希釈用組成物に代えてカラジーン含有抗体希釈用組成物を用いる点を除いて、上記と同様の方法で行った。

【0071】

30

図2Dに示される実験では、実施例1に記載のサンプルバッファー20 μ lにHuman brain lysate (IMGEX Corporation #40141)、Human Spinal Cord lysate(GENETX, Inc. #GTX15372)を10 μ gずつ混合し、実施例1に記載される方法で電気泳動からトランスファーまで行った。トランスファー後、従来方法では、実施例1に記載の方法で洗浄した後にブロッキングを行い、里吉病(この病気では脳や脊髄に対する抗体が血清中に産生される)の患者から取得した血清をDako社のAntibody Diluent with Background Deducing Components (#S3022)で2倍に希釈し、4 で10時間インキュベーションした後に洗浄し、Dako社のAntibody Diluent with Background Deducing Componentsで1000倍に希釈したHRP標識抗ヒトIgG抗体で二次抗体反応を行い、実施例1に記載の方法で発色させ解析した。一方、カラジーン含有抗体希釈用組成物を用いた方法では、上記トランスファーの後、ブロッキングは行わずカラジーン含有抗体希釈用組成物で患者血清を2倍に希釈し、4 で10時間インキュベーションした後に洗浄し、カラジーン含有抗体希釈用組成物で1000倍に希釈したHRP標識抗ヒトIgG抗体によって二次抗体反応を行い、実施例1に記載の方法で発色させ解析した。

40

【0072】

[結果]

図2A、B及びDに示すように、本発明に係る、カラジーンを含有する抗体希釈用組成物を使用したウエスタンブロッティングでは、従来方法に比べてはるかに非特異的バンドの出現を抑えていた。また図2Cから、本発明に係る抗体希釈用組成物の上記効果が、カラジーン存在と有意に関連していることがわかる。

50

【0073】

実施例3：本発明に係る、カラジーン含有する抗体希釈用組成物を使用した肺組織の免疫組織染色

器質化肺炎の肺組織を、標準的なプロトコールに従って、ホルマリン固定後に脱水処理を行い、その後パラフィンにて包埋し、4 μmの厚さでプレパラートに薄切し、それをキシレンを用いて脱パラフィンを行った。そのプレパラートを2% H₂O₂メチルエーテルで10分間インキュベートし脱ペルオキシダーゼ反応を行った。その後、PBSで洗浄した。

【0074】

従来の方法では、洗浄後のプレパラートを4% BSA及び1%馬血清入りのPBSで10分間ブロッキング反応を行い、その後Dako社のAntibody Diluent with Background Reducing Componentsで150倍に希釈したラビットポリクローナル抗DDR1抗体(Santa-Cruz社sc-532)と共に4℃で10時間インキュベーションして一次抗体反応を行った。その後、PBSで洗浄しDako社のAntibody Diluent with Background Reducing Componentsで1000倍に希釈したビオチン標識抗ラビットIgG抗体(VECTOR社BA-1000)で二次抗体反応を行い、PBSで洗浄した後、VECTOR社のVECTASTAIN ABC Kit Standard (PK6100)で三次反応を行い3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライドで発色させた。

【0075】

本発明に係る、カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用する方法では、洗浄後ブロッキングは行わず、カラジーン含有抗体希釈用組成物で150倍に希釈したラビットポリクローナル抗DDR1抗体(Santa-Cruz社sc-532)と共に4℃で10時間インキュベーションして一次抗体反応を行った。その後、PBSで洗浄し、カラジーン含有抗体希釈用組成物で1000倍に希釈したビオチン標識抗ラビットIgG抗体(VECTOR社BA-1000)で二次抗体反応を行い、PBSで洗浄した後、VECTOR社のVECTASTAIN ABC Kit Standard (PK6100)で三次反応を行い3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライドで発色させた。

【0076】

[結果]

上記のように、従来方法で行った免疫組織染色の結果と本発明に係るカラジーン含有抗体希釈用組成物を用いた免疫組織染色の結果を図3に示す(A:従来方法、B:カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用、C:一次抗体にラビットIgGを使用したnegative control(カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用)、D:ヘマトキシリンエオジン染色)。図3において、茶色に染まっている部分が陽性である。図3からわかるように、通常の希釈液を使用すると全体が茶色に染まって判断し辛いのに対し、本発明の抗体希釈用組成物を用いると陽性部分が非常にクリアであることがわかる。

【0077】

実施例4：本発明に係る、カラジーン含有する抗体希釈用組成物を使用した腎組織の免疫組織染色

急性進行性糸球体腎炎の腎組織について、一次抗体にヤギポリクローナル抗TRAILレセプター3抗体(R&DSystem社、AF630)、二次抗体にビオチン標識抗ヤギIgG抗体(VECTOR社BA-5000)を用いて実施例3と同様にして免疫組織染色を行った。

【0078】

[結果]

従来方法で行った免疫組織染色の結果と本発明に係るカラジーン含有抗体希釈用組成物を用いた免疫組織染色の結果を図4に示す(A:従来方法、B:カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用、C:一次抗体にヤギIgGを使用したnegative control(カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用)、D:ヘマトキシリンエオジン染色)。図4において、茶色に染まっている部分が陽性である。図4からわかるように、通常の希釈液を使用する方法に比べ、本発明の抗体希釈用組成物を用いた方法により、陽性部が顕著にクリアになることが分かる。

【図面の簡単な説明】

【0079】

10

20

30

40

50

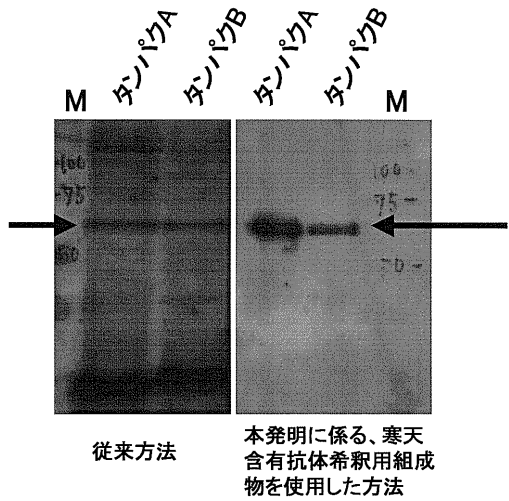
【図1】図1は、本発明に係る、寒天を含有する抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロットリングの結果を示す。

【図2】図2は、本発明に係る、カラジーンを含有する抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロットリングの結果を示す。

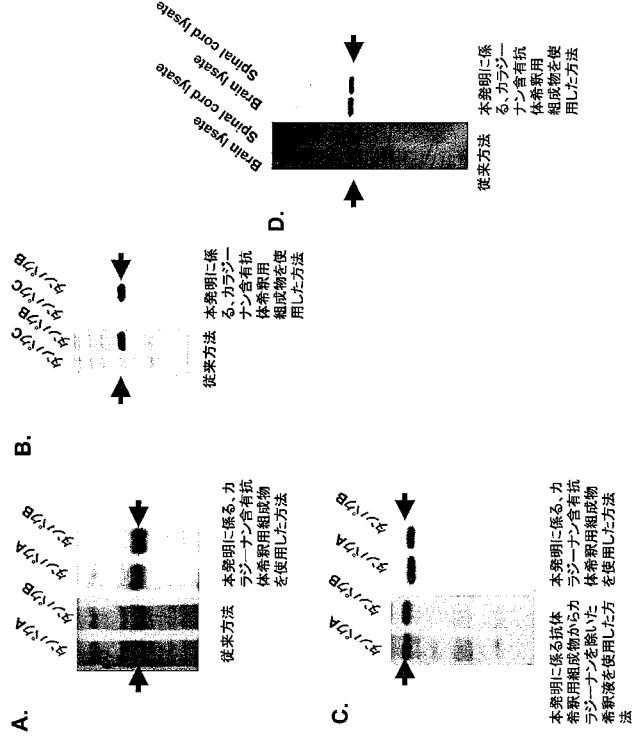
【図3】図3は、本発明に係る、カラジーンを含有する抗体希釈用組成物を用いた肺組織の免疫組織染色の結果を示す（A:従来方法、B:カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用、C:一次抗体にラビットIgGを使用したnegative control（カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用）、D:ヘマトキシリンエオジン染色）。

【図4】図4は、本発明に係る、カラジーンを含有する抗体希釈用組成物を用いた腎組織の免疫組織染色の結果を示す（A:従来方法、B:カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用、C:一次抗体にヤギIgGを使用したnegative control（カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用）、D:ヘマトキシリンエオジン染色）。

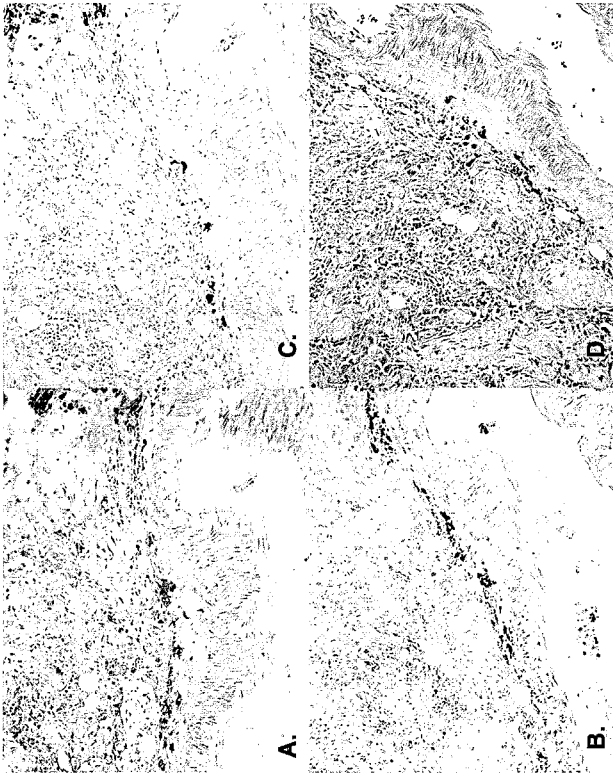
【図1】



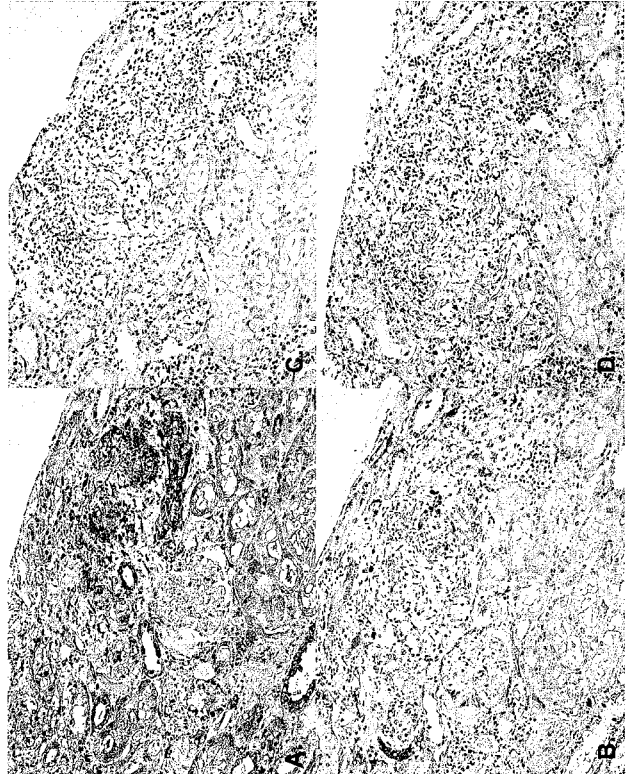
【図2】



【 図 3 】



【 図 4 】



专利名称(译)	抗体稀释组合物		
公开(公告)号	JP2007333723A	公开(公告)日	2007-12-27
申请号	JP2007024437	申请日	2007-02-02
申请(专利权)人(译)	国立大学法人鹿儿岛大学		
[标]发明人	松山航		
发明人	松山航		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/531.B		
优先权	2006135032 2006-05-15 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供抗体稀释组合物，可以提高免疫分析的准确性。
 ŽSOLUTION：抗体稀释组合物含有植物明胶，角叉菜胶或它们的混合物。Ž

【 图 2 】

