

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 125766

(P2003 - 125766A)

(43)公開日 平成15年5月7日(2003.5.7)

| (51) Int.Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-コ-ト [*] (参考) |
|--------------------------|------|---------------|---------------------------|
| C 1 2 N 15/02 | ZNA | C 0 7 K 16/44 | 4 B 0 2 4 |
| C 0 7 K 16/44 | | C 1 2 P 21/08 | 4 B 0 6 4 |
| C 1 2 N 5/10 | | G 0 1 N 33/53 | M 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 P 21/08 | | 33/566 | 4 H 0 4 5 |
| G 0 1 N 33/53 | | C 1 2 N 15/00 | ZNA C |

審査請求 未請求 請求項の数 19 O L (全 11数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 326705(P2001 - 326705)

(22)出願日 平成13年10月24日(2001.10.24)

(71)出願人 000151243
株式会社東レリサーチセンター
東京都中央区日本橋室町3丁目1番8号

(71)出願人 599172656
財団法人 日本宇宙フォーラム
東京都港区浜松町一丁目29番6号

(71)出願人 000119933
宇宙開発事業団
東京都港区浜松町2丁目4番1号

(74)代理人 100059959
弁理士 中村 稔 (外9名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗5 - メチル - 2 ' - デオキシシチジン抗体および5 - メチル - 2 ' - デオキシシチジンの測定法

(57)【要約】

【課題】 5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する特異性の高い抗体、そのような抗体を産生するハイブリドーマの効率的な作製方法を提供すること、および、5-メチル-2'-デオキシシチジンを含むメチル化DNAに対する特異的かつ高感度の直接競合酵素免疫法を提供すること。

【解決手段】 ミエローマ細胞と脾臓細胞との融合を電気融合法によって行なうことを特徴とする5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する特異性の高い抗体を産生するハイブリドーマ作製方法、それによって作成されたハイブリドーマ。および、前記5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する特異性の高い抗体またはそのフラグメントを使用することを特徴とする、メチル化DNAの直接競合酵素免疫測定法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 脾臓細胞とミエローマ細胞との細胞融合を電気融合法によって行なうことを特徴とする、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体を産生するハイブリドーマの作製方法。

【請求項2】 電気融合法が脾臓細胞とミエローマ細胞との混合物に10V/cm～80V/cmの電圧を1～20秒間かける工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 電気融合法が脾臓細胞とミエローマ細胞との混合物に電圧1kV/cm～5kV/cm、パルス幅10～100μ秒間の高電圧パルスをかける工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 H鎖可変領域が配列番号1に記載したアミノ酸配列を含む、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体。

【請求項5】 L鎖可変領域が配列番号2に記載したアミノ酸配列を含む、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体。

【請求項6】 H鎖可変領域が配列番号1に記載したアミノ酸配列を含み、L鎖可変領域が配列番号2に記載したアミノ酸配列を含む、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体。

【請求項7】 請求項4～6のいずれか1項に記載の抗体のフラグメントであって、5-メチル-2'-デオキシシチジンに結合し得る抗体フラグメント。

【請求項8】 請求項7に記載の抗体フラグメントをコードする核酸分子。

【請求項9】 5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体をコードする核酸であって、配列番号1に記載したアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む前記核酸分子。

【請求項10】 5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体をコードする核酸であって、配列番号2に記載したアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む前記核酸分子。

【請求項11】 5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体をコードする核酸であって、配列番号1および配列番号2に記載したアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む前記核酸分子。

【請求項12】 受託番号FERM P-18269で特定されるハイブリドーマ。

【請求項13】 請求項12に記載のハイブリドーマが産生する抗体。

【請求項14】 請求項13に記載の抗体のフラグメント。

【請求項15】 請求項1～3のいずれか1項に記載の方法によって作成されるハイブリドーマが産生する、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体。

【請求項16】 請求項1～3のいずれか1項に記載の方法によって作製されるハイブリドーマを培養し、前記

ハイブリドーマの培養上清から抗体を回収することを特徴とする、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体の製造方法。

【請求項17】 請求項12に記載のハイブリドーマを培養し、前記ハイブリドーマの培養上清から抗体を回収することを特徴とする、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体の製造方法。

【請求項18】 請求項4～6若しくは請求項13のいずれか1項に記載の抗体または請求項7若しくは請求項14に記載の抗体フラグメントを用いることを特徴とする、メチル化DNAの免疫化学的測定方法。

【請求項19】 直接競合阻害ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)である、請求項18に記載の免疫化学的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する特異性の高い抗体を産生し得るハイブリドーマの効率的な作製方法に関する。また、本発明は5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体、およびそのフラグメントに関する。本発明はさらに前記抗体もしくはフラグメントを用いたメチル化DNAを検出するための免疫化学的測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】シトシンのC-5位におけるDNAメチル化は脊椎動物、植物、いくつかの真菌類における様々なエピジェネティック現象に関与する分子機構である。DNAメチル化は哺乳類の正常な発生に必須であり、遺伝子発現調節、X染色体不活性化、ゲノムインプリンティング、内在性レトロウイルス不活性化などに重要な役割を果たしている。通常、個体の染色体DNAメチル化パターンは安定であるが、哺乳類の個体発生において2回、着床後の初期発生時と生殖系発生時に、染色体全般にわたる大規模なDNAメチル化パターンの再構築が起こる。また腫瘍形成と異常なDNAメチル化パターンは深い相関関係がある。これらの調節機構は興味深いが多くは不明であった。DNAメチル化分野の研究の進展を阻んできた一因としてこの現象を簡便に検出し、さらにそのメチル化割合を測定する手法の欠如が大きかった。

【0003】メチル化DNAの検出および/または定量的ためにこれまで用いられてきた手法にはDNAメチル化酵素を用いる方法と抗体を用いる方法がある。酵素を用いる方法は配列既知の遺伝子のみにも有用であり、染色体上のメチル化部位を直接検出することはできない。一方抗体を用いる方法は染色体上のメチル化部位を直接検出できるが、直接競合阻害ELISA法によりメチル化割合を簡便に測定できる抗体は得られていなかった。免疫化学測定法は抗体が抗原を特異的に認識する抗原抗体反応に基づいて抗原の検出を行う方法であり、その優れた精度、簡便性、迅速性、経済性から近年注目を集めている。免

疫化学的測定法においては非常に多量の標識法、例えば酵素、放射性トレーサー、化学発光、蛍光、金属原子、ゾル、安定遊離基、ラテックス、バクテリオファージが適用されてきた。

【0004】免疫測定法の内でも酵素を使用する酵素免疫測定法は特に優れたものとして広く使用されるに至った。酵素免疫測定法についての優れた論評がTijssen P, "Practice and theory of enzyme immunoassays" in Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Elsevier Amsterdam New York, Oxford ISBN 0-7204-4200-1(1990)により提供されている。一般に酵素免疫測定法は競合法と非競合法に大別され、さらに競合法は間接法と直接法に分けられる。直接法はステップ数が少なく、簡便であり、メチル化DNAに対する競合酵素免疫測定法として必要性が高かったにもかかわらず、直接競合酵素免疫測定(直接競合ELISA)のための適切な抗体はもとより、酵素標識体も得られていなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、5-メチル-2'-デオキシシチジンに結合する特異性の高い抗体もしくはそのフラグメント(断片)を提供することを目的とする。本発明は、また5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する特異性の高い抗体を産生するハイブリドーマを効率的に作製する方法を提供することを目的とする。本発明はさらに、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する特異性の高い抗体およびそのフラグメントを使用することを含む5-メチル-2'-デオキシシチジンの免疫化学的測定法を提供することを目的とする。特に本発明は、前記抗体およびそのフラグメントを使用することを含む5-メチル-2'-デオキシシチジンの直接競合阻害ELISAを提供することを目的とする。

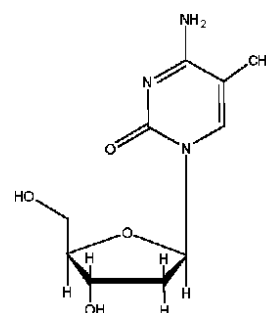
【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは脾臓細胞とミエローマ細胞との細胞融合を電気融合法によって行なうことにより、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対して特異性の極めて高い抗体を効率よく作製することができることを見出した。また、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対して特異性の極めて高いこの抗体とアルカリフォスファターゼ標識ハプテンを組み合わせることにより5-メチル-2'-デオキシシチジンの免疫測定法、特に5-メチル-2'-デオキシシチジンの直接競合酵素免疫測定法(直接競合阻害ELISA法)を完成した。さらにこのことはメチル化DNAの免疫測定法、特にメチル化DNAの直接競合阻害ELISA法を開発し得ることを示している。すなわち、本発明は、脾臓細胞とミエローマ細胞との細胞融合を電気融合法によって行なうことを特徴とする、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対して特異的な抗体を産生するハイブリドーマの作製方法、および、そのようにして作成されたハイブリドーマ並びにそのハイブリドーマの産生する抗体である。特に、本発明は、受託番号FERM P-1* 50

*8269で特定されるハイブリドーマおよびそのパイブリドーマが産生する、式(I)で示される5-メチル-2'-デオキシシチジンおよびこれを含むDNAに対する特異性の極めて高い抗体である。また、本発明は、前記ハイブリドーマを培養することによる、5-メチル-2'-デオキシシチジンおよびこれを含むDNAに対する特異性の極めて高い抗体の製造方法である。更に、本発明は、前記抗体またはそのフラグメントを使用することを特徴とする、5-メチル-2'-デオキシシチジンの免疫化学測定法、特に直接競合酵素免疫測定法である。

【0007】

【化1】



(I)

【0008】

【発明の実施の形態】本発明は5-メチル-2'-デオキシシチジンに対して極めて特異性の高い抗体、その抗体を産生するハイブリドーマの作製方法およびそのハイブリドーマ、この抗体と適切に標識されたハプテン、例えばアルカリフォスファターゼ標識ハプテンを組み合わせることを特徴とする5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する直接競合酵素免疫測定法である。以下、本発明において使用しえる抗原、ハイブリドーマおよび抗体の作製方法、および免疫化学的測定法について説明するが、これらの調製および測定は当業者には公知の方法、例えば続生化学実験講座、免疫生化学研究法(日本生化学会編)等に記載された一般的方法に従って行うことができる。

【0009】5-メチルシチジンと高分子化合物との結合体の作製

本発明の抗体を作製する場合は、5-メチルシチジンは適当な高分子化合物に結合させて免疫用抗原として使用することが好ましい。好ましい高分子化合物の例としては、スカシ貝のヘモシアニン(以下「KLH」と言う)、卵白アルブミン(以下「OVA」と言う)、ウシ血清アルブミン(以下「BSA」と言う)、ウサギ血清アルブミン(以下「RSA」と言う)などがある。KLHおよびBSAが特に好ましい。5-メチルシチジンと高分子化合物との結合は、例えば、Erlangerらによって記載された公知の方法(Proc. Natl. Acad. Sci., 52, 68-74(1964))によって行うことができる。この方法では、5-メチルシチジンを過ヨウ素酸で酸化し、生成したアルデヒド基とキャリアタンパクのアミノ基をpH9付

近で反応させる。次に水素化ホウ素ナトリウムで還元した後、純水を外液として透析し免疫源とする。

【0010】一方サクシニレートを保護基とする以下の方法でも合成できる。例えば、5-メチル2'-デオキシシチジンの4-アミノ基をアセチル化により保護してからリボース環の5'-水酸基を無水コハク酸でサクシニル化した後、4-アミノ基のアセチル基を脱保護してハプテンとする。得られたハプテンをKLH、OVA、BSA等のキャリアタンパク質に結合させて免疫源とすることができる。また、上記と同様の方法により、酵素等の標識物質を5-メチルシチジンに結合させたものを、免疫学的測定方法において使用することができる。標識物質の例としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、³²P、¹²⁵I等の放射性物質、化学発光物質などが挙げられる。

【0011】モノクローナル抗体の作製

前述したような5-メチルシチジンと高分子化合物との結合体を使用して、以下のような方法により本発明のモノクローナル抗体を作製することができる。一般に、モノクローナル抗体の作製は以下のような工程を含む。

(a) 免疫用抗原として使用する5-メチルシチジンと高分子化合物との結合体を作製する工程、(b) 動物へ免疫する工程、(c) 血液を採取、アッセイ、及び抗体産生細胞を調製する工程、(d) ミエローマを調製する工程、(e) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合とハイブリドーマの選択的培養を行なう工程、(f) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングと細胞クローニングを行なう工程、(g) ハイブリドーマの培養または動物へのハイブリドーマの移植によるモノクローナル抗体の調製を行なう工程、(h) 調製されたモノクローナル抗体の反応性を測定する工程。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するための方法は、例えば、ハイブリドーマ テクニクス (Hybridoma Techniques)、コールド スプリング ハーバラボラトリーズ (Cold Spring Harbor Laboratory, 1980年版)、細胞組織化学 (山下修二ら、日本組織細胞化学会編; 学際企画、1986年) に記載されている。

【0012】以下、上記工程についてより詳しく説明する。工程(a)、(b)において、5-メチルシチジンと高分子化合物との結合体を使用して、慣用化された方法により本発明の抗体を動物体内に生じさせることができる。この目的は例えば、5-メチルシチジン-KLH結合体をリン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、フロイント完全アジュバント又は不完全アジュバント、あるいはミョウバン等の補助剤と混合したものを、免疫用抗原として動物を免疫することによって達成され得る。免疫される動物としては当該分野で常用されるものをいずれも使用でき、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が含まれる。免疫の際の投与法は、皮下注射、腹腔内注

射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射のいずれでもよいが、皮下注射または腹腔内注射が好ましい。免疫は1回又は適当な間隔で、好ましくは1週間ないし5週間の間隔で複数回行うことができる。次に免疫化した動物から血液を採取し、そこから分離した血清を用い、5-メチル-2'-デオキシシチジンと反応するポリクローナル抗体の存在を評価することができる。なお、上記工程は5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗血清またはポリクローナル抗体を得るためにも利用できる。抗血清として使用する場合は、前述の免疫化した動物からの血清自体を利用することができる。更に必要に応じて当業者に知られた一般的な方法に従って、上記抗血清から抗体画分を精製分離してポリクローナル抗体として使用することができる。

【0013】工程(c)における抗体産生細胞はリンパ球であり、これは一般には脾臓、胸腺、リンパ節、末梢血液又はこれらの組み合わせから得ることができるが脾細胞が最も一般的に用いられる。従って、最終免疫後、抗体産生が確認されたマウスより抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、脾細胞を調製する。工程(d)で用いるミエローマ細胞としては、特に限定されず、ハイブリドーマ作製のために一般的に使用する細胞を利用することができる。そのような細胞には、Balb/Cマウス由来ミエローマ細胞株のP3/X63-Ag 8(X63)(Nature, 256, 495-497(1975))、P3/X63-Ag 8.U1(P3U1)(Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7(1987))、P3/NSI-1-Ag 4-1(NS-1)(Eur. J. Immunol., 6, 511-519(1976))、Sp 2/0-Ag 14(Sp 2/0)(Nature, 276, 269-270(1978))、F0(J. Immunol. Meth., 35, 1-21(1980))、MPC-11、X63.653、S194等のミエローマ株化細胞、あるいはラット由来の210.RCY3.Ag 1.2.3.(Y3)(Nature, 277, 131-133,(1979))が含まれるが、これらに限定されない。上述した株化細胞をウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)またはイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)で継代培養し、融合当日に約 3×10^5 個以上の細胞数を確保することが好ましい。

【0014】工程(e)において細胞融合は、一般には、例えばミルスタイン(Milstein)らの方法(Methods in Enzymology, 73, 3(1981))等に準じて行われる。現在最も一般的に行われているのはポリエチレングリコール(PEG)を用いる方法(PEG法)である。PEG法については、例えば、細胞組織化学、山下修二ら(上述)に記載されている。しかしながら、本発明においては、電気処理による方法(電気融合法)を採用することが特に好ましい(大河内悦子ら、実験医学 5.1315-19, 1987)。電気融合法を用いることによって、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する特異性および親和性の高い抗体を産生するハイブリドーマを効率的に作成することができる。融合の際の細胞の使用比率は一般的に使用され

る値でよく、例えばミエローマ細胞に対して脾細胞を3倍から10倍程度用いればよい。電気融合は例えば以下のようにして行なうことができる。まず、最初にミエローマ細胞と脾臓細胞の混合液に弱い電圧をかけ誘電電気泳動を起して細胞同士を接触させる（いわゆるパールチェーンを形成させる）。この時の電圧は好ましくは10~80V/cm、より好ましくは20~50V/cm、通電時間は好ましくは1~20秒、より好ましくは3~10秒である。次に、その状態で高電圧パルスをかけ、その衝撃により接触した細胞同士を融合させる。この時の電圧は好ましくは1~5kV/cm、より好ましくは2~4kV/cm、パルス幅は好ましくは10~100μ秒、より好ましくは20~50μ秒である。

【0015】抗体分泌能および増殖能を獲得したハイブリドーマ群は一般的な方法に従って選択することができる。例えば、ミエローマ細胞株としてヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを使用した場合、例えば上述のDMEMやIMDMにヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを添加して調製したHAT培地の使用により行うことができる。

【0016】工程(f)において、選択されたハイブリドーマ群を含む培養上清の一部をとり、例えば後述するELISA法により、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体活性を測定する。さらに、測定により5-メチル-2'-デオキシシチジンに反応する抗体を産生することが判明したハイブリドーマの細胞クローニングを行う。この細胞クローニング法としては、限界希釈により1ウェルに1個のハイブリドーマが含まれるように希釈する方法「限界希釈法」；軟寒天培地上に撒きコロニーをとる方法；マイクロマニピュレーターによって1個の細胞を取り出す方法；セルソーターによって1個の細胞を分離する「ソータークローン法」等が挙げられる。限界希釈法が簡単でありよく用いられる。抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によりクローニングを1~4回繰り返して安定して抗体価の得られたものを、本発明の抗5-メチル-2'-デオキシシチジンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。本発明のハイブリドーマは通常用いられる一般的な培地、例えば、10%ウシ胎児血清(FCS)を含むDMEMまたはIMDM等によって培養することができる。本発明のハイブリドーマの培養は、例えば二酸化炭素濃度5~7%程度及び37(100%湿度の恒温器中)で培養することが好ましい。

【0017】(g)および(h)の工程において、抗体を調製するための大量培養はフォローファイバー型の培養装置等によって行うのが好ましい。または、同系統のマウス(例えば、上述のBalb/c)あるいはNu/Nuマウスの腹腔内でハイブリドーマを増殖させ、腹水液より抗体を調製することも可能である。これらにより得られた培養上清液あるいは腹水液を抗5-メチル-2'-デ

オキシシチジンモノクローナル抗体として使用することができるが、さらに透析、硫酸アンモニウムによる塩析、ゲル濾過、凍結乾燥等を行い、抗体画分を集め精製することにより抗5-メチル-2'-デオキシシチジンモノクローナル抗体を得ることができる。さらに、精製が必要な場合には、イオン交換カラム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、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの慣用されている方法を組み合わせることにより実施できる。これらの抗体精製方法は当業者にはよく知られたものである。以上のようにして得られた抗5-メチル-2'-デオキシシチジンモノクローナル抗体は、例えばELISA法などの公知の方法を使用して、サブクラス、抗体価等を決定することができる。

【0018】抗体による5-メチル-2'-デオキシシチジンの測定

5-メチル-2'-デオキシシチジンは本発明の抗体を用いて、放射性同位元素免疫測定法(RIA法)、ELISA法(Engvall, E., Methods in Enzymol., 70, 419-439(1980))、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、凝集法、オクタロニー(Ouchterlony)等の、一般に抗体の検出に使用されている種々の方法(「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30頁-第53頁、昭和57年3月5日)を使用して測定することができる。感度、簡便性等の観点からELISA法が好ましい。

【0019】5-メチル-2'-デオキシシチジンの測定は、各種の免疫化学アッセイ法、例えば各種ELISA法を用いて行うことができる。より具体的には、例えば、以下の(a)~(d)のような工程を含む間接競合阻害ELISA法により行うことができる：

(a) 抗原(5-メチルシチジンと高分子化合物との結合体)を担体に固相化する工程、(b) 抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な物質、例えば抗原とは無関係のタンパク質によりブロッキングする工程、

(c) 各種濃度の5-メチル-2'-デオキシシチジンを含む試料及び抗体を加え、該抗体を前記固相化抗原および5-メチル-2'-デオキシシチジンに競合的に結合させて、固相化抗原-抗体複合体および5-メチル-2'-デオキシシチジン-抗体複合体を生成させる工程、(d) 固相化抗原-抗体複合体の量を測定することにより、予め作成した検量線から試料中の5-メチル-2'-デオキシシチジンの量を決定する工程。

【0020】工程(a)において、抗原を固相化する担体としては、特別な制限はなく、ELISA法において常用されるものをいずれも使用することができる。例えば、ポリスチレン製の96穴マイクロタイタープレートを用いることができる。抗原を担体に固相化させるには、例えば、抗原を含む緩衝液を担体上加え、単にインキュベーションすればよい。緩衝液としては公知のものが使用でき、例えば、145mM NaClを含む10mMのPBSが使用でき

る。緩衝液中の抗原の濃度は広い範囲から選択できるが、通常0.01 µg/mlから100 µg/ml程度、好ましくは0.05 µg/mlから5 µg/mlである。また、担体として96ウェルのマイクロタイタープレートを使用する場合には、300 µl/ウェル以下で20 µl/ウェルから150 µl/ウェル程度が望ましい。抗原変性しない限りインキュベーションの条件にも特に制限はないが、4 程度で一晩のインキュベーションが好ましい。なお他の5-メチル-2'-デオキシシチジン類似化合物も上記アッセイにおいて固相化抗原として使用することも可能である。

【0021】工程(b)におけるブロッキングは、抗原(5-メチルシチジンと高分子化合物との結合体)を固相化した担体において、5-メチルシチジン部分以外に後で添加する抗体が吸着され得る部分が生じることを防ぐ目的で行われる。ブロッキング剤として、例えば、BSAやスキムミルク溶液を使用できる。あるいは、ブロックエース(「Block Ace」、大日本製薬、コードNo. UK-25B)等のブロッキング剤として市販されているものを使用することもできる。具体的には、例えば、抗原を固相化した部分に、ブロックエースを適量加え、約4 で、一晩インキュベーションした後、緩衝液で洗浄することによりブロッキングを行なうことができる。ここで使用する緩衝液としては、特に制限はないが、例えば、10mM PB(pH7.2)、0.8%(w/v)NaCl、0.02%(w/v)KCl、0.02%(v/v)Tween20の組成のものが適している。

【0022】次いで工程(c)において、5-メチル-2'-デオキシシチジンを含む試料と抗体を固相化抗原と接触させ、抗体を固相化抗原及び5-メチル-2'-デオキシシチジンと反応させることにより、固相化抗原-抗体複合体及び5-メチル-2'-デオキシシチジン-抗体複合体を生成させる。この際、抗体としては、第一抗体として本願発明の5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する抗体を加え、更に第二抗体として標識酵素を結合した第一抗体に対する抗体を順次加えて反応させる。第一抗体は緩衝液に溶解して添加する。反応は、例えば37 程度で約1時間行えばよい。反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、固相化抗原に結合しなかった第一抗体を除去する。この反応に用いる試薬としては、例えば10mM PB(pH7.2)、0.8%(w/v)NaCl、0.02%(w/v)KClの組成のものを利用することができる。

【0023】次いで第二抗体を添加する。例えば第一抗体としてマウスモノクローナル抗体を用いる場合、酵素(例えば、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ等)を結合した抗マウス-ヤギ抗体を用いるのが適当である。担体に結合した第一抗体に約500~10000倍、好ましくは最終吸光度が4以下、より好ましくは0.5~3.0となるように希釈した第二抗体を反応させる。希釈には緩衝液を用いる。限定されるわけではないが、反応は約37 で約1時間行い、反応後、緩衝液で洗浄する。以上の反応により、第二抗体が第一抗体に結合する。ま

た、標識した第一抗体を用いてもよく、その場合、第二抗体は不要である。

【0024】次いで工程(d)において担体に結合した第二抗体の標識物質と反応する発色基質溶液を加え、吸光度を測定することによって検量線から5-メチル-2'-デオキシシチジンの量を算出することができる。第二抗体に結合する酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、例えば、過酸化水素、並びに3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンまたは -フェニレンジアミン(以下「OPD」という)を含む発色基質溶液を使用することができる。反応は、例えば、発色基質溶液を加え約25 で約20分間インキュベーションすることによって行なうことができ、その後、2Nの硫酸を加えることにより酵素反応を停止させてよい。OPDを使用する場合は492nmの吸光度を測定し、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを使用する場合450nmの吸光度を測定することによって、5-メチル-2'-デオキシシチジンの量を算出することができる。

【0025】一方、第二抗体に結合する酵素としてアルカリホスファターゼを使用する場合には、例えばp-ニトロフェニルリン酸を基質として発色させ、2NのNaOHを加えて酵素反応を止め、415nmでの吸光度を測定する方法が適している。5-メチル-2'-デオキシシチジンを添加しない反応溶液の吸光度に対して、5-メチル-2'-デオキシシチジンを添加して抗体と反応させた溶液の吸光度の減少率を阻害率として計算する。既知の濃度の5-メチル-2'-デオキシシチジンを添加した反応液の阻害率により予め作成しておいた検量線を用いて、試料中の5-メチル-2'-デオキシシチジンの濃度を算出できる。

【0026】また、本発明のモノクローナル抗体は、例えば以下に述べるような(a)~(d)の工程を含む、直接競合阻害ELISA法において使用することができる。

(a)本発明のモノクローナル抗体を、担体に固相化する工程、(b)抗体が固相化されていない担体表面を抗原と無関係な物質、例えば抗原と無関係なタンパク質により、ブロッキングする工程、(c)各種濃度の5-メチル-2'-デオキシシチジンを含む試料、及び、5-メチルシチジンと酵素を結合させた酵素結合ハプテンを担体に固相化した抗体と反応させる工程、(d)固相化抗体-酵素結合ハプテン複合体の量を測定することにより、あらかじめ作成した、検量線から試料中の5-メチル-2'-デオキシシチジンの量を決定する工程。

【0027】工程(a)においてモノクローナル抗体を固相化する担体としては、特別な制限はなくELISA法において常用されるものを用いることができ、例えば、96ウェルのマイクロタイタープレートが挙げられる。モノクローナル抗体の固相化は、例えばモノクローナル抗体を含む緩衝液を担体上にのせ、インキュベーションすることによって行うことができる。緩衝液の組成・濃度は前述の間接競合阻害ELISA法と同様でよい。工程(b)

におけるブロッキングは、抗体を固相化した担体において、後に添加する試料中の5-メチル-2'-デオキシシチジンおよび酵素結合ハプテンが抗原抗体反応とは無関係に吸着される部分が生じることを防ぐ目的で行われる。ブロッキング剤及びその方法は、前述の間接競合阻害ELISA法と同様のものを使用できる。

【0028】工程(c)において用いる酵素結合ハプテンの調製は5-メチルシチジンを酵素に結合する方法であれば、特に制限はなく、いかなる方法で行ってもよい。調製した酵素結合ハプテンは5-メチル-2'-デオキシシチジンを含む試料と混合する。なお、酵素等の標識物質に結合させるハプテンとしては、間接競合阻害ELISA法における固相化抗原の場合と同様に、抗体作製に使用した5-メチルシチジンのみならず、他の5-メチル-2'-デオキシシチジン類似化合物も酵素に結合させるハプテンとして使用可能である。この工程において、5-メチル-2'-デオキシシチジンを含む試料及び酵素結合ハプテンを抗体固相化担体に接触させ、5-メチル-2'-デオキシシチジンと酵素結合ハプテンとの競合阻害反応により、これらと固相化担体との複合体を生成させる。5-メチル-2'-デオキシシチジンを含む試料は適当な緩衝液で希釈して使用するのが好ましい。反応時間は、例えば室温にて、およそ1時間でよい。反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、固相化抗体と結合しなかった酵素結合ハプテンを除去する。洗浄は、例えばPBSを使用することができる。

【0029】さらに工程(d)において酵素結合ハプテンの酵素に反応する発色基質溶液を前述の間接競合阻害ELISA法と同様に加え、吸光度を測定することにより、検量線から5-メチル-2'-デオキシシチジンの量を算出することができる。本発明の抗体は、上述したような直接競合阻害ELISA法で5-メチル-2'-デオキシシチジンの量を0.1~100 µg/mlの範囲で測定できる(実施例3、図1を参照せよ)。

【0030】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を制限するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができることは言うまでもなく、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

【0031】

【実施例】実施例1. 抗体の作製

(1) 免疫用抗原の作製

まず5-メチルシチジンとKLHとの複合体を以下のようにErlangerらの方法により作製した。5-メチルシチジン6.6mgを0.1M過ヨウ素酸0.5mlに溶解し、室温20分反応させた。1Mエチレングリコール0.03mlを加え反応を停止させた。反応液をKLH 20mg/2ml蒸留水に添加し5% K₂CO₃約0.1mlでpH9~9.5に調節した。45分間攪拌した後水素化ホウ素ナトリウム15mgを添加した後18時間静置した。1M

ギ酸0.5mlで反応を停止させた後1MアンモニアでpHを8.5に調節した。純水を外液として二晩透析し免疫源とした。このようにして得られた5-メチルシチジン-KLH複合体を免疫用抗原として用いた。

【0032】(2)スクリーニング用抗原の作製
スクリーニング用抗原として(1)と同様の方法により5-メチルシチジン-BSA複合体を得た。

【0033】(3)免疫感作
免疫用抗原として(1)において得られた5-メチルシチジン-KLH複合体について、それぞれマウスに免疫をおこなった。免疫用抗原100 µgをPBS 100 µlに溶解し、等量のプロイント完全アジュバントと混合した後、Balb/cマウスに接種した。17日後にプロイント不完全アジュバントを用いて調製した免疫用抗原を前記と同様の操作によりマウスに追加免疫をおこなった。また、41日後にはPBSに溶解した免疫抗原をマウスに追加免疫した。このマウスから血清を調製した。

【0034】(4)抗血清による測定
(3)で調製した抗血清の力価を(2)で調製したスクリーニング用抗原を用いた間接競合阻害ELISA法によって評価した。まず、(2)で調製した5-メチルシチジン-BSA複合体の溶液(0.1 µg/ml)を100 µl/ウェルにて96ウェルプレートにコーティングした。洗浄の後、4倍に希釈したブロックエース(「Block Ace」:大日本製薬、コードNo.UK-25B)でブロッキングし、各種濃度の5-メチル-2'-デオキシシチジンあるいはその類似化合物を含むPBS溶液50 µlおよび希釈抗血清50 µlをウェルに入れ、37 °Cにて1時間反応させた。反応終了後、0.05% Tween20-PBSにて1回洗浄の後、PBSを用いて5000倍希釈したペルオキシダーゼ結合抗マウスIgGヤギ抗体(Cappel社製)を100 µlずつ各ウェルに添加し、37 °Cにて1時間反応させた。さらに反応終了後、0.05% Tween20-PBSにて2回洗浄し、0.4mg/mlのOPD、及び0.04%過酸化水素を含む0.05Mリン酸クエン酸緩衝液(pH4.5)を100 µlずつ各ウェルに入れ、室温にて20分間放置し、発色させた。反応後、2N硫酸100 µlを各ウェルに加え、反応を停止させた後、490nmの吸光度を測定した。

【0035】(5)ハイブリドーマ細胞の作製
(4)の結果に基づき血清中の抗5-メチル-2'-デオキシシチジン抗体の活性が高くなったマウスの脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞(P3U1)とを以下の手順に従って、電気融合法にて細胞融合させた。i)脾臓細胞の調製前記の通り免疫したマウスから脾臓を無菌的に摘出し、脾臓細胞懸濁液を調製した。摘出した脾臓はRPMI培地中で脂肪を取り除いた後、注射器で培地を注入し細胞をほぐした。脾臓の両端をはさみで切り落とし中の細胞を軽くたたくようにして脾臓から培地中に取り出した。培地中の細胞を良くほぐしてからステンレスメッシュを通し脾臓細胞懸濁液とした。

【0036】ii)細胞融合

マウス2匹当たりミエローマ細胞、P3X63Ag8U.1を約 10^8 個用意した。i)で調製した脾臓細胞(10^8 細胞/ml)1mlとミエローマ細胞(2×10^7 細胞/ml)1mlを24ウェルプレート中で混合した。該混合液の細胞を細胞融合装置(SSH-2、島津製)にて電氣的に融合させた。まず、電圧40Vで10秒間通電し、細胞を接触させてパルチェーンを形成させた。次に、電圧2.3kV/cm、パルス幅40 μ 秒の高電圧パルスをかけて細胞を融合させた。得られた融合細胞をFBSを10%含むHAT培地に懸濁した。該細胞懸濁液を96穴プレート(Nunc製)に1ウェルあたり0.1mlずつ分注した。HAT培地にはメルカプトエタノール 5×10^{-5} M、1mMピルビン酸を予め添加しておいた。該細胞懸濁液が分注された96穴プレートを5%CO₂存在下、37 $^{\circ}$ Cで10日間培養した。出現したコロニーを順次継代し細胞の選択に必要な量の培養上清を得た。

【0037】iii)融合細胞の選択とクローニング

前記の操作により増殖可能な融合細胞を選抜した。該融合細胞の培養上清を用いて、ELISA法により5-メチルシチジンに対する抗体が産生されていることを確認した。まず5-メチル-2'-デオキシシチジン-OVAコンジュゲートを140mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄および1.8mM KH₂PO₄(pH7.4)を含有する溶液(以下、PBS溶液と記す。)で、2 μ g/mlとなるように希釈し、コーティング液を調製した。該コーティング液をポリスチレン製の96穴マイクロタイタープレートに、1ウェルあたり50 μ lずつ分注した後、4 $^{\circ}$ Cで一晩保温した。コーティング液を除去した後、各ウェルに300 μ lのPBS溶液を添加し、ウェル内部を洗浄した。次にPBS溶液を除去した各ウェルにブロッキング溶液(ブロックエース、大日本製薬製)を1ウェルあたり200 μ l添加した後、室温で2時間保温してブロッキングを行った。

【0038】ブロッキング液を除去後、各ウェルに0.05% Tween20を含有するPBS溶液(以下、洗浄液と記す。)300 μ l添加し、ウェル内部を洗浄した。洗浄液を除去した後、前記融合細胞の培養上清を1ウェルあたり50 μ l添加し、室温で1時間保温した。該抗原抗体反応液を除去した後、1ウェルあたり300 μ lの洗浄液を添加し、ウェル内部を洗浄する。次いで、ペルオキシダーゼで標識した抗マウスIgG(Cappel社製)を1ウェルあたり50 μ l添加し、室温で1時間保温した。抗マウスIgG溶液を除去し、1ウェルあたり300 μ lの洗浄液を添加し、ウェル内部を洗浄した。前記操作をさらに2回繰り返して、洗浄液を除去した後、ペルオキシダーゼの基質オルトフェニレンジアミン/過酸化水素水溶液(OPDA 10mg/25ml:30%H₂O₂ 2 μ l/25ml)を1ウェルあたり100 μ l添加し、マイクロタイタープレートをアルミホイルで被覆し、室温で20分間保温した。保温の後、2N硫酸を1ウェルあたり50 μ l添加し、ペルオキシダーゼ反応を停止した。各ウェルの発色を分光光度計(Bio-Rad、Model 3550 microplate reader)を用いて、490nmおよび

595nmの吸光度を測定し、両者の差を算出した(以下、490-595nmと記す。)。融合細胞の培養上清を種々の倍率で希釈した溶液を用いて上記のELISA法を行い、同一希釈率で大きい490-595nmを示す融合細胞を選抜した。これにより5-メチル-2'-デオキシシチジンに対して高い親和性を示す融合細胞を得た。上記のようにして得られた融合細胞クローンに対して限界希釈法によるクローニングを行ってモノクローナルハイブリドーマクローンを得た。このようにして得られた、クローンの一つである、クローン1D8は平成13年3月22日に経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所(現、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター)に寄託され、受託番号FERM P-18269が与えられている。

【0039】実施例2.ハイブリドーマ1D8が産生する抗体のL鎖およびH鎖の可変領域

ハイブリドーマ1D8よりmRNAを調製し、cDNA合成、PCRを経てL鎖のV領域(可変領域)(VL)およびH鎖のV領域(VH)の遺伝子を得た。この二つの遺伝子を(Gly-Gly-Gly-Ser)3配列を持つリンカーでつなげてscFv遺伝子としファージミドpCANTAB 5Eに挿入し、大腸菌TG1株に感染させた。ファージレスキュー、パニングを経て免疫源である5-メチルシチジン-OVAコンジュゲートに親和性を持つM13ファージを得た。このファージの表面に表現されているscFv遺伝子の配列を確認した。この結果よりH鎖V領域、L鎖V領域の塩基配列および、各領域に対応するアミノ酸配列が決定された。H鎖V領域、L鎖V領域のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号1および配列番号2として配列表に記載した。

【0040】実施例3.直接競合阻害ELISA法による5-メチル-2'-デオキシシチジンの測定

(1)5-メチルシチジンとALPとの結合体作製

5-メチルシチジン8.85mgを0.1M過ヨウ素酸0.691mlに溶解し、室温20分反応させた。1MEチレングリコール0.04mlを加え反応を停止させた。反応液をALP 2.5mg/0.25ml蒸留水に添加し5% K₂CO₃約0.1mlでpH9~9.5に調節した。45分間攪拌し、水素化ホウ素ナトリウム20.7mgを添加した後18時間静置した。1Mギ酸0.4mlで反応を停止させた後1MアンモニアでpHを8.5に調節した。純水を外液として二晩透析し精製ALP結合5-メチルシチジンを得た。

【0041】(2)直接競合阻害ELISA

実施例1(5)で得られたハイブリドーマ細胞(1D8)をマウスの腹腔に移植し、10~15日後に得られた腹水を採取し、硫酸分画法によりモノクローナル抗体を精製した。この操作によって、抗5-メチル-2'-デオキシシチジン抗体1D8を用いて以下の試験法にて5-メチル-2'-デオキシシチジンを測定した。モノクローナル抗体溶液(1D8抗体10 μ g/ml)を100 μ l/ウェルで96ウェルプレートに加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置し、翌日4倍希釈したブ

ロックエースでブロッキングした後、5-メチル-2'-デオキシシチジン及び実施例6で作製した適度に希釈されたALP結合5-メチルシチジンを含むPBS溶液を50 μ l/ウェル加え、37 $^{\circ}$ C 1時間静置した。反応終了後、0.05% Tween20-PBSにて2回洗浄の後、2mg/mlの4-ニトロフェニルリン酸を含む緩衝液(0.15M グリシン-NaOH緩衝液(pH10.3), 1mM MgCl₂, 0.1mM ZnCl₂, 0.25g/l OVA)を100 μ lずつ各ウェルにいれ室温にて30分間放置し、発色させた。反応後、1N NaOH 100 μ lを各ウェルに加え、反応を停止させた後、405nmの吸光度を測定した。結果を図10に示す。直接競合阻害ELISA法においても、5-メチル-2'-デオキシシチジンを測定することができ、その好ましい測定範囲は5-メチル-2'-デオキシシチジン約0.1 μ g*

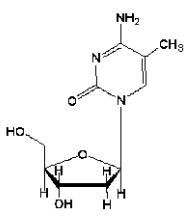
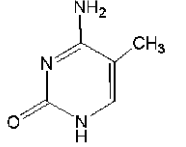
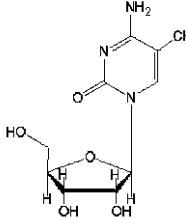
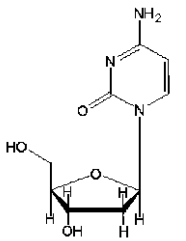
* /ml ~ 約100 μ g/mlであることが分かった。

【0042】実施例4. ハイブリドーマクローン1D8が産生するモノクローナル抗体の評価

本発明のモノクローナルについて実施例2と同様の方法を用いて5-メチル-2'-デオキシシチジンおよび他の類似化合物に対する反応性について調べた。その結果を表1に示す。本発明のモノクローナル抗体は、他の類似化合物である5-メチルシチジンとは13%、5-メチルシトシンとは15%の交差反応性を示したが、2'-デオキシシチジンには反応性しなかった。(表1)。

【0043】

【表1】

| 化合物名 | 構造 | IC ₅₀ [ppm] | 反応性[%] |
|-------------------|---|------------------------|--------|
| 5-メチル-2'-デオキシシチジン |  | 3.0 | 100 |
| 5-メチルシトシン |  | 20 | 15 |
| 5-メチルシチジン |  | 23 | 13 |
| 2'-デオキシシチジン |  | >1000 | <0.3 |

【0044】

【発明の効果】本発明により、5-メチル-2'-デオキシシチジンに対する特異性の高い抗体およびその抗体を産生するハイブリドーマの作製方法が提供される。本発明によって提供される抗体の一つは、上述したような直接競合阻害ELISA法で5-メチル-2'-デオキシシチジンの量を

約0.1~約100 μ g/mlの範囲で測定できる。また、本発明の抗体は他の類似化合物である5-メチルシチジンとは13%、5-メチルシトシンとは15%の交差反応性を示し得るが、2'-デオキシシチジンには結合しない。従って、本発明により、5-メチル-2'-デオキシシチジンを極めて特異的に検出し得る免疫化学測定系、特に直接競合阻害ELIS

A法によるアッセイ系を組むことができるようになる。
 さらにこのことはメチル化DNAに対する免疫化学測定
 系、特に直接競合阻害ELISA法を開発し得ることを示し

ている。
 【0045】
 【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Space Forum
 TORAY Research Center, Inc.
 National Space Development Agency
 of Japan

<120> Anti 5-methyl-2'-deoxycy
 tidine antibodies and the method for
 determination of 5-methyl-2'-deox
 ycytidine DNA

<130> Y110211

<140>
 <141>
 <160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly
 Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile
 Lys Tyr Thr Pro Phe Leu
 50 55 60
 Glu Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn
 Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp
 Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asn Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Tyr Trp
 Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 111

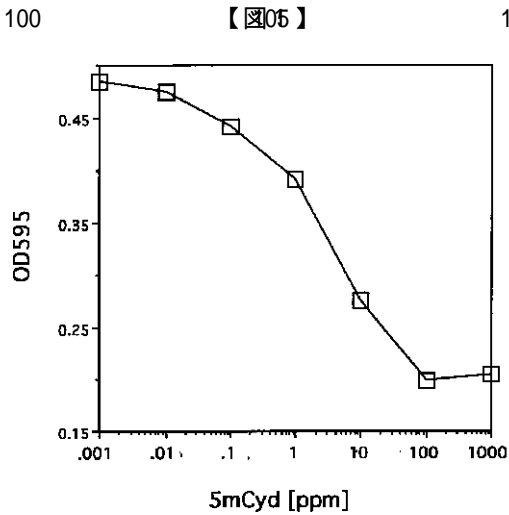
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 Phe Thr Pro Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 Tyr Cys Glu His Ile Arg 20

【図面の簡単な説明】 85 *競合阻害ELISA法による5-メチル-2'-デオキシシチジ

【図1】図1は、本発明の抗マクロファージ抗体の直線性 Gly Thr の測定を示す。

Lys Leu Glu Ile Lys
 100 110



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ 識別記号 F I テーコード (参考)
 G 0 1 N 33/566 C 1 2 N 5/00 B

(72)発明者 香川 康浩 Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA01 DA20
 東京都中央区日本橋室町3丁目1番8号 GA05 HA15
 株式会社東レリサーチセンター内 4B064 AG27 CA20 CC24 DA13

(72)発明者 渡辺 和明 4B065 AA91X AA91Y AB05 AC14
 東京都中央区日本橋室町3丁目1番8号 BA08 CA25 CA46
 株式会社東レリサーチセンター内 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76
 EA50 FA72 FA74

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 抗5-甲基-2-脱氧胞苷抗体和5-甲基-2-脱氧胞苷的测定方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003125766A | 公开(公告)日 | 2003-05-07 |
| 申请号 | JP2001326705 | 申请日 | 2001-10-24 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 日本空间论坛 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 东丽研究中心有限公司 日本空间论坛 宇宙开尧事业团 | | |
| [标]发明人 | 香川康浩 渡边和明 | | |
| 发明人 | 香川 康浩 渡边 和明 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/566 | | |
| FI分类号 | C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.C C12N5/00.B C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A C12N5/00.102 C12N5/20 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA01 4B024/DA20 4B024/GA05 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

解决的问题：为了提供对5-甲基-2-脱氧胞苷具有高特异性的抗体，有效产生这种抗体的杂交瘤的方法以及5-甲基-2-脱氧胞苷为包含甲基化DNA的特异性和高度敏感的直接竞争酶免疫测定。解决方案：产生杂交瘤的方法，该杂交瘤产生对5-甲基-2-脱氧胞苷具有高特异性的抗体，其特征在于通过电融合方法进行骨髓瘤细胞和脾细胞的融合，并通过该方法产生。杂交瘤。一种用于甲基化DNA的直接竞争酶免疫测定法，其包括使用对5-甲基-2-脱氧胞苷具有高特异性的抗体或其片段。

