

(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2004-161685
(P2004-161685A)

(43) 公開日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
CO7K 14/46	CO7K 14/46	4H045
CO7K 16/18	CO7K 16/18	
GO1N 33/53	GO1N 33/53	D
GO1N 33/543	GO1N 33/543	521
GO1N 33/545	GO1N 33/545	A
審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-330226 (P2002-330226)	(71) 出願人	593025712 株式会社ビーエル 静岡県沼津市西沢田108
(22) 出願日	平成14年11月14日 (2002.11.14)	(71) 出願人	501028541 株式会社フロンティア・サイエンス 北海道石狩市新港西1丁目777番地12号
		(74) 代理人	100091502 弁理士 井出 正威
		(72) 発明者	原 彰彦 北海道函館市港町3-1-1 北海道大学 水産学部内
		(72) 発明者	難波 靖治 静岡県沼津市西沢田108 株式会社ビーエル内
		最終頁に続く	

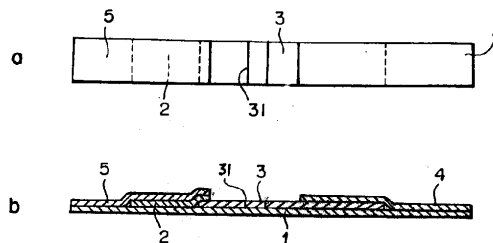
(54) 【発明の名称】 卵黄関連蛋白およびその用途

(57) 【要約】

【課題】メダカ由来の新規な雌特異卵黄関連蛋白 (YRP) およびそれに対する抗体が提供することにより、ピテロジェニンを検出する従来の環境ホルモンの測定系の代替法を提供する。

【解決手段】メダカ由来の雌特異卵黄関連蛋白であって、ゲル濾過による分子量が実質的に460kDaであり、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が実質的に130kDaである卵黄関連蛋白、および、それに対する抗体、および、当該抗体を用いた上記卵黄関連蛋白の各種の免疫学的測定法。

【選択図】 図8



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

メダカ由来の雌特異卵黄関連蛋白であって、ゲル濾過による分子量が実質的に 460 kDa であり、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が実質的に 130 kDa であることを特徴とする卵黄関連蛋白。

【請求項 2】

請求項 1 の卵黄関連蛋白に対する抗体。

【請求項 3】

請求項 1 の卵黄関連蛋白に対する第一の抗体を担体に固定し、被験試料を前記担体に接触させて該被験試料中に含まれる前記卵黄関連蛋白を担体に固定された前記第一の抗体に捕捉させた後、前記卵黄関連蛋白に対する第二の抗体を適当な標識物質で標識して前記担体と接触させることにより、前記第二の抗体を担体に捕捉された前記卵黄関連蛋白に捕捉させ、担体に捕捉された第二の抗体を検出することにより前記被験試料中の卵黄関連蛋白を検出する免疫学的測定法。

10

【請求項 4】

請求項 1 の卵黄関連蛋白に対する第一の抗体を予め所定位置に固定せしめて形成された捕捉部位を備える膜担体を用意し、前記卵黄関連蛋白に対する第二の抗体と所定量の被験試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記膜担体にてクロマト展開せしめ、前記被験試料中に含まれる蛋白と第二の抗体との複合体を前記捕捉部位に捕捉させることにより前記卵黄関連蛋白を検出することを特徴とするイムノクロマトグラフィー測定法。

20

【請求項 5】

前記第二の抗体は金属コロイドまたはラテックスで標識されている請求項 4 に記載の測定法。

【請求項 6】

前記膜担体がニトロセルロース膜である請求項 4 に記載の測定法。

【請求項 7】

前記第一および第二の抗体は抗血清である請求項 4 に記載の測定法。

【請求項 8】

請求項 1 の卵黄関連蛋白に対する第一の抗体と、前記卵黄関連蛋白に対する第二の抗体と、膜担体とを少なくとも備え、前記抗体の何れか一方は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記抗体の他方は適当な標識物質で標識され、かつ、前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されてなる前記卵黄関連蛋白検出用イムノクロマト法テストストリップ。

30

【請求項 9】

前記標識物質が金コロイドまたはラテックスである請求項 8 に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項 10】

前記膜担体がニトロセルロース膜である請求項 8 に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項 11】

前記第一および第二の抗体は抗血清である請求項 8 に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

40

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、エストロゲンによって誘導される新規な蛋白質およびその用途に関し、さらに詳細には、メダカから分離された新規な蛋白質およびその用途に関する。

【従来技術】**【0002】**

卵生脊椎動物では、卵母細胞は、卵黄蛋白前駆物質であるピテロジェニンを取り込むこと

50

によって急速に成長する (Wallace RA, 1985. In: Browder, editor. *Developmental Biology*. New York: Plenum Press. Vol. 1, p127-177.)。

【0003】

ビテロジェニン (Vg) は、エステラジオール - 17 (E2) の刺激により雌動物の肝臓内で合成される糖脂質蛋白であり、雌特異蛋白として血中に分泌される。血流中のビテロジェニンは、受容体を介したエンドサイトーシスにより卵母細胞に取り込まれ、酵素により2つの主要な卵黄蛋白質、すなわち、リポビテリン (lipovitellin) とホスピチン (phosvitin) に開裂する。これらの卵黄蛋白質は胚を成長させるための栄養素として役立つ。

10

【0004】

複数の形態のビテロジェニンが広範囲の卵生脊椎動物において既に確認されている (Wiley HS et al. 1981. *J Biol Chem* 256: 8626-8634.; Wang S-Y et al. 1983. *Biochemistry* 22: 6206-6212.; Wang H et al. 2000. *Gene* 256: 303-310.)。硬骨魚では、ティラピア (*Oreochromis aureus*) (Lee BH et al. 1994. *Biochem Mol Biol Int* 34: 75-83.)、マミチヨグ (*Fundulus heteroclitus*) (LaFleur GJ et al. 1995. In: Goetz F, Thomas P, editors. *Reproductive Physiology of Fish*. Austin, TX: The University of Texas at Austin. p336-338.)、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) (Wang H et al. 2000. *Gene* 256: 303-310.)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) (Trichet V et al. 2000. *Mol Gen Genet* 263: 828-837.) およびハドック (モンツキダラ *Melanogrammus aeglefinus*) (Reith M et al. 2001. *J Exp Zool* 291: 58-67.) など、ビテロジェニン遺伝子が2つ以上存在しており、このことは、多くの魚類が数種のビテロジェニン遺伝子を持つことを示唆している。

20

【0005】

ニジマスにはビテロジェニンをコードする遺伝子が20個存在する。しかし、それらの配列の97%は同一であるため、蛋白質としては区別がつかない。したがって、複数のビテロジェニン遺伝子が発現しているとしても、蛋白質として異なる形態のビテロジェニンが複数存在することにはならない。現在のところ、翻訳蛋白として2つの異なるビテロジェニンがティラピア (*Oreochromis* 属) (Ding JL et al. 1989. *Comp Physiol Biochem* 93B: 363-370.; Lee KBH et al. 1992. *J Exp Zool* 264: 100-106.; Kishida M et al. 1993. *Fish Physiol Biochem* 12: 171-182.; Buerano C et al. 1995. *J Exp Zool* 273: 59-69.) およびヒラメ (マツカワ *Veraspermoseri*) (Matsubara T et al. 1999. *Dev Biol* 213: 18-32.) において検出されている。

30

40

【0006】

マツバラ他 (Matsubara T et al. 1999. *Dev Biol* 213: 18-32.) は、遠洋性卵を産むヒラメにおける2種のビテロジェニンの特徴を、N末端のアミノ酸配列と特異的抗体を用いて明らかにしている。ヒラメの2種のビテロジェニン (VgA および VgB) は、類似の分子量 (ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) において168kDa および175kDa) を有するが、卵の水和の過程において異なった役割を果たしている。

【0007】

50

Vg A由来の卵黄蛋白質は、水和する際に遊離アミノ酸に分解され、浸透圧の上昇により卵に浮力を与えることがあるが、他方、Vg B由来の卵黄蛋白質は比較的大きなペプチドとして残り、栄養素として胚に使用される。

【0008】

ヒラメとは対照的に、遠洋性卵を産まないティラピアの2種のビテロジェニン(VTG-200およびVTG-130)は異なる分子量(SDS-PAGEで200kDaおよび130kDa)を有する。これらの2種のビテロジェニンは血漿から精製され、その生体内および生体外におけるエストラジオール-17(E2)による誘導は既に研究されている(Kishida M et al. 1993. Fish Physiol Biochem 12: 171-182.; Takemura A et al. 2001. Comp Biochem Physiol 129A: 641-651.)。しかしながら、これらの卵黄形成、排卵および発生の過程における役割は未だ全く知られていない。 10

【0009】

数種の魚類では、卵膜(または漿膜)の蛋白の前駆物質が、雌特異蛋白として血流中に見出されている(Hamazaki T et al. 1985. J Exp Zool 235: 269-279.; Hyllner S J et al. 1991. J Endocrinol 131: 229-236.)。この前駆物質はコリオジェニン(Chg)と呼ばれ、その産生はエストロゲンによって制御される(Murata K et al. 1994. Gen Comp Endocrinol 95: 232-239.; Shimizu M et al. 2000. J Fish Biol 57: 170-181.)。魚の卵膜蛋白の起源は種間で様々であるが、或る魚種でビテロジェニン(Vg)とコリオジェニン(Chg)がどのようにエストロゲンにより制御され、卵の成熟過程に利用されるかを理解することは非常に興味深いことである。 20

【0010】

メダカ(Oryzias latipes)では、ビテロジェニン(Vg)とコリオジェニン(Chg)の何れもが卵以外を起源としており、これらの雌特異蛋白の各種特性が研究されている(Yamagami K. 1996. Zool Sci 13: 331-340.)。また、メダカにエストロゲンを投与すると、ビテロジェニンおよびコリオジェニンが豊富な腹水の蓄積が誘導される。かかる特徴にゆえに、メダカは、肝臓由来の雌特異蛋白による卵発生を研究するための格好のモデルとされている。 30

【0011】

ハラ他(Hara A et al. 1983. Comp Biochem Physiol 76A: 135-141.)は、FS-1, 2および3と称される3つの雌特異蛋白をメダカの血清中から免疫化学的に検出した。FS-2とFS-3は、雌特異蛋白であり、卵黄蛋白質に対する抗血清と免疫反応し、エストロゲン投与により誘導されることから、ビテロジェニンの評価基準を満たす。

【0012】

ハマザキ他(Hamazaki T S et al. 1987. J Exp Zool 242: 333-341.)は、エストラジオール-17(E2)を投与されたメダカの腹水からビテロジェニンを精製し、その分子量とアミノ酸組成が他の魚のものと類似することを報告している。 40

【0013】

【非特許文献1】Wallace R A. In: Browder, editor. Developmental Biology. New York: Plenum Press. 1985. Vol. 1, p 127-177.

【非特許文献2】Wiley H S et al. J Biol Chem 1981. 256: 8626-8634.

【非特許文献3】Wang S-Y et al. Biochemistry 1983. 22: 6206-6212.

【非特許文献4】Wang H et al. Gene 2000. 256: 303 - 310.

【非特許文献5】Lee BH et al. Biochem Mol Biol Int 1994. 34: 75 - 83.

【非特許文献6】LaFleur GJ et al. In: Goetz F, Thomas P, editors. Reproductive Physiology of Fish. Austin, TX: The University of Texas at Austin. 1995. p336 - 338.

【非特許文献7】Trichet V et al. Mol Gen Genet 2000. 263: 828 - 837.

【非特許文献8】Reith M et al. J Exp Zool 2001. 291: 58 - 67.

【非特許文献9】Ding JL et al. Comp Physiol Biochem 1989. 93B: 363 - 370.

【非特許文献10】Lee KBH et al. Exp Zool 1992. 264: 100 - 106.

【非特許文献11】Kishida M et al. Fish Physiol Biochem 1993. 12: 171 - 182.

【非特許文献12】Buerano C et al. J Exp Zool 1995. 273: 59 - 69.

【非特許文献13】Matsubara T et al. Dev Biol 1999. 213: 18 - 32.

【非特許文献14】Takemura A et al. Comp Biochem Physiol 2001. 129A: 641 - 651.

【非特許文献15】Hamazaki T et al. J Exp Zool 1985. 235: 269 - 279.

【非特許文献16】Hyllner SJ et al. J Endocrinol 1991. 131: 229 - 236.

【非特許文献17】Murata K et al. Gen Comp Endocrinol 1994. 95: 232 - 239.

【非特許文献18】Shimizu M et al. J Fish Biol 2000. 57: 170 - 181.

【非特許文献19】Yamagami K. Zool Sci 1996. 13: 331 - 340.

【非特許文献20】Hara A et al. Comp Biochem Physiol 1983. 76A: 135 - 141.

【非特許文献21】Hamazaki TS et al. J Exp Zool 1987. 242: 333 - 341.

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

このピテロジェニン、繁殖期におけるサイズ、相対量および外見からFS-3に相当すると考えられ、FS-1およびFS-2については未だ同定されていない。したがって、本発明は、メダカにおける他の雌特異蛋白を同定し、その特徴を明らかにすることを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

上記目的の下に鋭意研究した結果、本発明者らは、卵黄抽出物に対する抗血清と免疫反応する成分を検出した。この成分は、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)における分子量が130kDaであり、抗原性および分子量の点でも以前に報告されたピテロジェニンおよびコリオジェニンと異なるものである。

10

20

30

40

50

【0016】

かくして、本発明の第1局面によれば、メダカ由来の雌特異卵黄関連蛋白であって、ゲル濾過による分子量が実質的に460kDaであり、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が実質的に130kDaであることを特徴とする卵黄関連蛋白が提供される。

【0017】

本発明において、ゲル濾過による分子量は、例えば、スーパーローズ6 (Superose 6) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) などを用いて0.02Mのトリス-塩酸 (Tris-HCl; pH 8.0、2% NaCl、0.1% NaN₃) により30ml/hr、フラクションサイズ0.5mlの条件下に適当な分子量マーカーとの対比で測定することができ、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) における分子量は、例えば、7.5%ゲルを用いて適当な分子量マーカーとの対比で測定することができ、「実質的に」とは、適当な分子量マーカーとの対比で測定されたことを意味する。

10

【0018】

本発明の卵黄関連蛋白は抗原性を有している。したがって、本発明の卵黄関連蛋白に対する各種の抗体は公知の方法により容易に取得できる。かくして、本発明の第二の局面によれば、本発明の卵黄関連蛋白に対する抗体が提供される。

【0019】

当該各種抗体を用いることにより、本発明の卵黄関連蛋白を免疫学的測定法によって容易に測定できる。かくして、本発明の第三の局面によれば、上記卵黄関連蛋白に対する第一の抗体を担体に固定し、被験試料を前記担体に接触させて該被験試料中に含まれる前記卵黄関連蛋白を担体に固定された前記第一の抗体に捕捉させた後、前記卵黄関連蛋白に対する第二の抗体を適当な標識物質で標識して前記担体と接触させることにより、前記第二の抗体を担体に捕捉された前記卵黄関連蛋白に捕捉させ、担体に捕捉された第二の抗体を検出することにより前記被験試料中の卵黄関連蛋白を検出する免疫学的測定法が提供される。

20

【0020】

さらに、本発明の第四の局面によれば、上記卵黄関連蛋白に対する第一の抗体を予め所定位置に固定せしめて形成された捕捉部位を備える膜担体を用意し、前記卵黄関連蛋白に対する第二の抗体と所定量の被験試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記膜担体にてクロマト展開せしめ、前記被験試料中に含まれる蛋白と第二の抗体との複合体を前記捕捉部位に捕捉させることによって前記卵黄関連蛋白を検出することを特徴とするイムノクロマトグラフィー測定法が提供される。

30

【0021】

さらに、本発明の第四の局面によれば、上記卵黄関連蛋白に対する第一の抗体と、前記卵黄関連蛋白に対する第二の抗体と、膜担体とを少なくとも備え、前記抗体の何れか一方は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記抗体の他方は適当な標識物質で標識され、かつ、前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されてなる前記卵黄関連蛋白検出用イムノクロマト法テストストリップが提供される。

40

【0022】

【発明の実施の形態】

本発明の卵黄関連蛋白 (以下 YRP とも言う) は、雌のメダカに特異的な蛋白であり、雌メダカの血液、腹水などの体液から分離・精製できる。YRP はエステラジオール-17 (E2) などのエストロゲンを投与することによって腹水に大量に蓄積されることから、エストロゲン投与された雌メダカの腹水から分離・精製することが好ましい。

【0023】

体液からのYRPの精製は、常法にしたがって行うことができる。例えば、腹水をリン酸緩衝食塩水などと混合して遠心分離し、さらに、透析、カラムクロマトグラフィー、限外

50

濾過、ゲル濾過などの各種精製法を組み合わせることにより行える。透析は、各種の塩類水溶液を用いて行うことができ、塩類水溶液としてはリン酸カリ水溶液が好ましい。カラムクロマトグラフィーに用いられる充填剤としては、ヒドロキシアパタイトが好ましい。カラムクロマトグラフィーの操作条件は、カラムの充填剤の種類、充填層の系および長さ、YRPの濃度、不純物の種類および濃度などに応じて、適宜、決定される。溶出液としては、通常は、リン酸カリウム水溶液が好適に使用されるが、リン酸カリウム水溶液以外の溶出液を使用することを妨げない。なお、溶出はステップワイズ法によることが好ましい。ゲル濾過に使用されるゲルとしては、スーパーローズ6 (Superose 6) (ファルマシア、ウプサラ、スエーデン Pharmacia, Uppsala, Sweden) などが挙げられる。

10

【0024】

YRPは、アプロチニンなどの適当な助剤を所望により添加し、-35のような低温で凍結または凍結乾燥して保存できる。

【0025】

YRPは、ピテロジェニンと同様に、エストロゲンによって誘導される雌特異蛋白であり、環境ホルモンに曝露された雄メダカにおいても誘導される。また、YRPは、ピテロジェニンよりも、エストロゲンおよびそれに類似の環境ホルモンに対する感受性が高いと考えられる。したがって、メダカの抗YRP抗体を用いてメダカのYRPを測定することにより、高感度の環境ホルモン免疫測定系を構築できる。免疫測定系としては、例えば、ELISA測定系やイムノクロマトグラフィー測定法が挙げられ、これらの測定法に基づく各種免疫学的測定キットを作成することにより、メダカ血中のYRPの検出を容易に行うことができる。抗YRP抗体は、公知の方法に従い、YRPを用いて動物を免疫し、その抗血清を得ることにより容易に調製できる。

20

【0026】

イムノクロマトグラフィー測定法は、公知のイムノクロマト法テストストリップの構成に準拠して容易に実施できる。一般に、イムノクロマト法テストストリップは、抗原の第一の抗原決定基にて抗体抗原反応可能な第一の抗体と、前記抗原の第二の抗原決定基にて抗体抗原反応可能で且つ標識された第二の抗体と、膜担体とを少なくとも備え、前記第一の抗体は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の抗体は前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されて構成される。具体的には、例えば、図8に示されるイムノクロマト法テストストリップが挙げられる。第一および第二の抗体は何れもポリクローナル抗体(抗血清)であってもよく、また、何れか一方または両方がモノクローナル抗体であってもよい。

30

【0027】

図8において、数字1は粘着シート、2は含浸部材、3は膜担体、31は捕捉部位、4は吸収用部材、5は試料添加用部材を示している。図示の例では、膜担体3は、幅5mm、長さ36mmの細長い帯状のニトロセルロース製メンブレンフィルターで作成されている。該膜担体3には、そのクロマト展開開始点側の末端から7.5mmの位置に、第一の抗体が固定され、検体の捕捉部位31が形成される。図示の例では、膜担体3は、ニトロセルロース製メンブレンフィルターを用いているが、被験試料に含まれる検体をクロマト展開可能で、かつ、上記捕捉部位31を形成する抗体を固定可能なものであれば、いかなるものであってもよく、他のセルロース類膜、ナイロン膜、ガラス繊維膜なども使用できる。

40

【0028】

含浸部材2は、第二の抗体を含浸せしめた部材からなる。当該第二の抗体は、適当な標識物質で予め標識される。図示の例では、含浸部材2として、5mm×15mmの帯状のガラス繊維不織布を用いているが、これに限定されるものではなく、例えば、セルロース類布(濾紙、ニトロセルロース膜等)、ポリエチレン、ポリプロピレン等の多孔質プラスチック布類なども使用できる。

【0029】

第二の抗体の標識物質としては、使用可能なものであればいかなる物質であってもよく、

50

呈色標識物質、酵素標識物質、放射線標識物質などが挙げられる。このうち、捕捉部位31での色の变化を肉眼で観察することにより迅速かつ簡便に判定できる点から、呈色標識物質を用いることが好ましい。呈色標識物質としては、金コロイド、白金コロイド等の金属コロイドの他、赤色および青色などのそれぞれの顔料で着色されたポリスチレンラテックスなどの合成ラテックスや、天然ゴムラテックスなどのラテックスが挙げられ、このうち、金コロイドなどの金属コロイドが特に好ましい。当該含浸部材2は、標識された第二の抗体の懸濁液を前記ガラス繊維不織布等の部材に含浸せしめ、これを乾燥させることなどによって作製できる。

【0030】

図8に示されるように、膜担体3を粘着シート1の中程に貼着し、該膜担体3のクロマト展開の開始点側(すなわち図8の左側、以下「上流側」と記す、また、その逆の側、すなわち図8の右側を、以下「下流側」と記す)の末端の上に、含浸部材2の下流側末端を重ね合わせて接続するとともに、この含浸部材2の上流側部分を粘着シート1に貼着して本発明のイムノクロマト法テストストリップを作成できる。さらに、必要に応じて、含浸部材2の上面に試料添加用部材5の下流側部分を載置するとともに、該試料添加用部材5の上流側部分を粘着シート1に貼着してもよく、また、膜担体3の下流側部分の上面に吸収用部材4の上流側部分を載置するとともに、該吸収用部材4の下流側部分を粘着シート1に貼着せしめることもできる。

10

【0031】

試料添加用部材5としては、例えば、多孔質ポリエチレンおよび多孔質ポリプロピレンなどのような多孔質合成樹脂のシートまたはフィルム、ならびに、濾紙および綿布などのようなセルロース製の紙または織布もしくは不織布を用いることができる。吸収用部材4は、液体をすみやかに吸収、保持できる材質のものであればよく、綿布、濾紙、およびポリエチレン、ポリプロピレン等からなる多孔質プラスチック不織布等を挙げることができるが、特に濾紙が最適である。

20

【0032】

さらに、市販品の場合、図8のイムノクロマト法テストストリップは、試料添加用部材5と捕捉部位31の上方にそれぞれ被験試料注入部と判定部が開口された適当なプラスチック製ケース内に収容されて提供される。

【0033】

かくして、適当な展開溶媒中に所定量の生体試料を混合してクロマト展開可能な混合液を被験試料として得た後、当該混合液を図8に示されるイムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材5上に注入すると、該混合液は、該試料添加用部材5を通過して含浸部材2において、標識された第二の抗体と混合する。その際、該混合液中に検体が存在すれば、抗原抗体反応により検体と第二の抗体との複合体が形成される。この複合体は、膜担体3中をクロマト展開されて捕捉部位31に到達し、そこに固定された第一の抗体と抗原抗体反応して捕捉される。このとき、標識物質として金コロイドなどの呈色標識物質が使用されていれば、当該呈色標識物質の集積により発色するので、直ちに、検体の有無を判定することができる。

30

【0034】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は当該実施例に限定されるものではない。

なお、実施例中の実験操作は、下記に従った。

40

【0035】

抗血清の調製

メダカ腹水及び卵抽出物に対する抗血清(抗腹水及び抗卵抽出物抗体)は市販の製品を用いた。

メダカのピテロジェニンとYRPに対する抗血清は、1mgの精製蛋白質全量をフロイノン完全アジュバント(Iatron; Tokyo, Japan)に乳化して、ウサギ

50

に皮内注射して得た。注射は1週間間隔で4回行った。抗血清は、最後の注射の1週間後に、耳の静脈から採取した。幾らかの交差反応が、ピテロジェニンに対する抗血清はY R Pとの間で、Y P Rに対する抗血清はピテロジェニンとの間で存在したので、ピテロジェニンおよびY R Pに対する特異的抗血清は、それらを精製されたY R Pおよびピテロジェニンのそれぞれに吸収させることにより調製した。

【0036】

電気泳動

レムリの方法 (Laemmli UK, 1970, Nature 227: 680-685.) に従い、3%のスタッキングゲルおよび7.5%または5~22.5%のグラジエント分離ゲルを用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により行った。サンプルは、2% SDS、10%グリセロールを含有する等量のサンプル緩衝液 (必要に応じ5%の2-メルカプトエタノールを含有) で、100、10分間処理した。50mMトリス (Tris)、400mMグリシンおよび0.1% SDSを含有する溶液中で、スタッキングゲルでは16mA、分離ゲルでは24mAにて、プロモフェノールブルー染料先端がゲルの底に達するまで泳動を行った。ゲルは、40%エタノール-10%酢酸溶液中の0.1%クーマシー (Coomassie) ブリリアントブルーR250 (CBB; Bio-Rad) により1時間染色し、20%エタノール-5%酢酸-2.5%グリセロール溶液で、一晚、脱色した。場合により、ゲルは、市販キット (Atto; Tokyo, Japan) を使用した銀染色により可視化した。

10

20

【0037】

分子量の測定はプレシジョン マーカー (Precision marker; Bio-Rad) を使用して行った。

【0038】

リポ蛋白質、糖蛋白質およびリン蛋白質を染色する際には、3%スタッキングゲルと7.5%分離ゲルを用いたPAGE (native-PAGE) を行った。サンプルは40%蔗糖と混合し、SDS-PAGEと同じ操作条件で、50mMトリス (Tris)-400mMグリシンの溶液中で泳動させた。リポ蛋白質はスーダンブラックB (Merck; Darmstadt, Germany) で染色した。糖蛋白質はZacharius およびZellの方法 (Zacharius RM, Zell TE, 1969, Anal Biochem 30: 148-152.) に従い、過ヨウ素酸-シッフ試薬 (Merck) で染色した。リン蛋白質はCuttingおよびRothの方法 (Cutting JA, Roth TF, 1973, Anal Biochem 54: 386-394.) により、メチル グリーン (Nacalai Tesque; Kyoto, Japan) で染色した。

30

【0039】

ウェスタンブロット法

SDS-PAGEによって分離した蛋白質を、Towbinらの方法 (Towbin H et al, 1979, Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354.) によって、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad) の上に電気ブロットした。その後、膜を30分間振盪しつつトリス (Tris)-緩衝食塩水 (20mMトリスおよび500mM NaCl, pH 7.5; 以下「TBS」という) 中の5%スキムミルクでブロックした。次いで、この膜を、TBSで1:500-4000に希釈した1次抗血清とともに、室温で2時間インキュベートし、0.05% Tween (Tween) 20を含有するTBSで5分間の洗浄を2回、TBSでの洗浄を1回行った。次いで、この膜を、2次抗体としての西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ウサギIgG (Bio-Rad) とともに室温で1時間インキュベートした。上記と同様に洗浄した後、抗原-抗体反応を、HRP発色試薬 (0.06%の4-クロロ-1-ナフトールおよび0.02%の過酸化水素を含有するTBS) により可視化した。

40

【0040】

50

実施例 1 (魚とホルモンの投与)

市販のメダカ稚魚を、天然の光周期および環境温度の下に水槽に入れて数週間馴致した。魚には、1日に1回、市販飼料を与えた。魚が成熟したときに、雄および雌のそれぞれから、尾を切りマイクロヘマトクリットピペット (Drummond; Broomall, PA) で血液を採取した。これを 4500 g (g は重力の加速度。以下同様) で5分間遠心分離して血清を取得し、使用するまで -35 にて保存した。また、飼育中の雌から卵を採取した。

【0041】

ホルモン投与のため、ハラ他 (Hara A et al. 1983. Comp Biochem Physiol 76A: 135-141.) に記載されているように、10 エステラジオール-17 (E2) を含有する飼料を魚に与えた。E2 投与の結果、腹水が蓄積した。この腹水をシリンジで採取し、アプロチニン (Takara; Shiga, Japan) を 0.84 TIU/ml 添加した後、使用するまで -35 で保存した。

【0042】

得られた雌と雄の血清及び腹水を電気泳動にかけ、泳動パターンを比較した。その結果を、図1に示す。図1において、「male serum」、「female serum」および「ascites」はそれぞれ、「雄の血清」、「雌の血清」および「腹水」を示す。

【0043】

図1(a)は、ゲルを銀染色した結果を示し、図1(b)は、ウエスタンブロット法によりゲルをニトロセルロース膜に転写し、卵抽出物に対する抗血清を用いて免疫染色した結果を示す。なお、電気泳動は、およそ 0.1 L の血清と腹水を非還元条件のもとで 7.5 % のゲルを用いて行った。ウエスタンブロット法において、卵抽出物に対する抗血清は 4000 倍希釈して一次抗体として使用した。矢印はビテロジェニン (Vg) と本発明の卵黄関連蛋白 (YRP) の移動位置を示し、20

【0044】

図1において、矢印 Vg は 220 kDa のバンドを示し、矢印 YRP は 130 kDa のバンドを示す。これらのバンドは、雌の血清および腹水中にのみ検出され、雄の血清中には検出されなかった。220 kDa のバンドはメダカのビテロジェニン (Hamazaki TS et al. 1987. J Exp Zool 242: 333-341.) として知られている。しかし、130 kDa のバンドは、従来、確認されてない雌特異蛋白であり、それが卵抽出物に対する抗血清と免疫反応することから、卵黄関連蛋白 (YRP) と考えられる。30

【0045】

実施例 2 (腹水からの卵黄関連蛋白の精製)

実施例1で得られた腹水 4 ml (蛋白量 58 mg/ml) を、等量の 0.01 M のリン酸緩衝食塩水 (PBS) (pH 7.0、0.084 TIU のアプロチニンを含む) と混合し、4500 g で10分間、遠心分離した。精製された腹水を 0.05 M リン酸カリウム (以下 KP と記すこともある) 溶液 (pH 6.8、0.0375 TIU/ml のアプロチニンを含む) で透析し、2.5 x 8 cm のヒドロキシアパタイトカラム (Bio-Rad; Hercules, CA) に注入し、4 にてヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを実施した。100 ml/hr の流速でステップワイズ法により KP の濃度を下げることにより蛋白を溶出させた。図2(a)にその溶出パターンを示す。図2(a)において斜線領域は、それぞれ、ビテロジェニンおよび YRP のフラクションを示す。40

【0046】

1.2 M の KP で溶出されたビテロジェニンを含むフラクションを、透析チューブを使用した限外濾過によって濃縮し、スーパーロース 6 (Superose 6) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) にかけた。カラムからの溶出は、室温で FPLC システム (Pharmacia) を用い、0.02 M のトリス-塩酸 (Tris-HCl) (pH 8.0、2% NaCl、0.1% の NaN₃ を含む) により通過速度 3 50

0 ml / hr、フラクションサイズ 0.5 ml で行った。図 2 (b) にその溶出パターンを示す。ピテロジェニンは 570 kDa の分子量に対応する主要なピークとして溶出された。ゲル濾過では、ピテロジェニンは 570 kDa の主要なピークとして、上昇部分のシヨルダで溶出された。したがってピークの山が下りきるまでの部分は分析のため、精製されたメダカピテロジェニンとして使用された。

【 0 0 4 7 】

ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより 0.1 M の K P で溶出された Y R P を含むフラクションを、セントリコン プラス Centricon Plus - 20 (Millipore ; Bedford , MA) を使用して、20 分間、1800 g で遠心分離することで濃縮した。次いで、アプロチニン 0.02 T I U を添加後、Y R P フラクションをスーパーローズ 6 を用いたゲル濾過によって分離した。Y R P はメインピークとして溶出された。これを、同じカラムを使用して再クロマトグラフィーすることによりさらに精製した。図 2 (c) にその溶出パターンを示す。精製された Y R P の分子量はゲル濾過において 460 kDa であった。

10

【 0 0 4 8 】

実施例 3 (精製されたピテロジェニンおよび Y R P の抗原性の比較)

実施例 2 で精製されたピテロジェニンおよび Y R P の抗原性を比較するために、腹水に対する抗血清 (a - A S) を用い、1% アガロースゲル中で Ouchterlony の方法 (Ouchterlony O . 1953 . Acta Path Microbiol Scand 32 : 231 - 240 .) に従い、二重免疫拡散法を行った。その結果

20

【 0 0 4 9 】

図 3 から明らかなように、ピテロジェニンおよび Y R P は、それぞれ、抗血清 (a - A S) に対して、単一の沈降素線を形成し、これらの線は互いに交差した。したがって、ピテロジェニンおよび Y R P は互いに異なる抗原性を持つことが示された。

【 0 0 5 0 】

実施例 4 (ピテロジェニン及び Y R P の非還元条件下および還元条件下における性状の対比)

実施例 1 で得られた腹水、実施例 2 で精製されたピテロジェニン及び Y R P 、並びに、卵抽出物を、非還元条件 (左パネル) と還元条件 (右パネル) で SDS - PAGE にかけて対比した。なお、サンプル (10 - 17 g) は 7.5% ゲルによって分離し、クマシーブリリアントブルー R - 250 により染色した。その結果を図 4 に示す。なお、図 4 中、左パネルは非還元条件 (2 M E (-) : 2 - メルカプトエタノール未処理) における結果を示し、右パネルは還元条件 (2 M E (+) : 2 - メルカプトエタノール処理) における結果を示す。矢印は精製されたピテロジェニン及び Y R P 、並びに、卵抽出物の分子量を示す。

30

【 0 0 5 1 】

図 4 から、SDS - PAGE において、精製されたピテロジェニンおよび Y R P は、それぞれ、非還元条件下および還元条件下のいずれにおいても、220 kDa および 130 kDa で主要なバンドを形成することがわかる。

40

【 0 0 5 2 】

実施例 5 (ピテロジェニン及び Y R P の物性の対比)

実施例 2 で精製されたピテロジェニンおよび Y R P を、7.5% ゲルを用いた SDS を含まないネイティブ - PAGE (native - PAGE) により分離し、クマシーブリリアントブルー R - 250 (蛋白検出用) 、スーダンブラック B (脂質検出用) 、過ヨウ素酸 - Schiff (糖検出用) およびメチルグリーン (リン検出用) のそれぞれで染色した。結果を図 5 に示す。図 5 中、矢印 V g はピテロジェニンの移動位置を示し、矢印 Y R P は Y R P の移動位置を示し、パネル「CBB」はクマシーブリリアントブルー R - 250 による結果、パネル「SB」はスーダンブラック B による結果、パネル「Schiff's」は過ヨウ素酸シッフ試薬による結果、パネル「MG」はメチルグリーンによる

50

結果を示す。

【0053】

図5から、ピテロジェニンおよびYRPの両者において、脂質、糖類およびリンが染色されたこと示され、YRPが糖脂質蛋白であることがわかる。

【0054】

さらに、精製されたピテロジェニンおよびYRPのアミノ酸組成(モル%)およびリン含有量(w/w%)を下記の方法で分析した。

【0055】

アミノ酸分析

精製されたピテロジェニンとYRPのそれぞれの凡そ200gをアミノ酸分析のために凍結乾燥した。これを6N HCl中で、110℃で24時間、加水分解した。そして、ピテロジェニンとYRPのアミノ酸組成を、日立Model KAL-3自動アミノ酸分析計(日立;東京、日本)で測定した。

10

【0056】

リン含有量

精製されたピテロジェニンとYRPのリン含有量を、サンプルの調製法を修正した以外GamsstおよびTryの方法(Gamsst O, Try K. 1980. Scand J Clin Lab Invest 40:483-486.)に従い測定した。すなわち、精製されたピテロジェニンとYRPのそれぞれ約500gを凍結乾燥した後、0.2Mの重炭酸アンモニウム溶液で透析し、150Lの2N NaOHに再溶解した。これに150Lの2N HClを添加した後、4500gで20分間、遠心分離した。その後、上清の100Lを新しいチューブに移し、リン含有量を測定した。分析結果を表1に示す。

20

【0057】

【表1】

	Vg	YRP
Asp	8.91	9.66
Thr	5.00	6.25
Ser	10.29	6.26
Glu	11.13	12.02
Gly	4.02	6.02
Ala	9.30	8.12
Cys/2	0.85	0.57
Val	6.84	7.06
Met	2.41	3.34
Ile	6.10	5.05
Leu	9.75	8.74
Tyr	3.26	4.35
Phe	3.18	4.61
Lys	7.38	6.51
His	2.01	2.21
Arg	4.97	3.73
Pro	4.59	5.48
Try	-	-
phosphorus	1.20	0.04

10

20

【0058】

表1によれば、YRPにおいてセリンが比較的低い含有率であったことを除けば、ピテロジェニンとYRPの間ではアミノ酸組成は似ており、また、YRPのリン含有量はピテロジェニンのものの1/30であることが示された。

30

【0059】

実施例6（ピテロジェニン及びYRPの抗原性の対比）

実施例1で得られた腹水、実施例2で精製されたピテロジェニンおよびYRP、並びに、卵抽出物を、非還元条件下で5～22.5%グラジエントゲルを用いて電気泳動を行うことにより分離し、ウエスタンブロット法に従い、ニトロセルロース膜へ転写し、ピテロジェニンに対する抗体の2000倍希釈液、および、YRPに対する抗体の500倍希釈液の夫々を用いてインキュベートし、免疫染色した。その結果を図6に示す。図6中、矢印に隣接する数字は免疫反応による染色バンドの分子量を示し、パネル「anti-Vg」（左パネル）は抗ピテロジェニン抗体を用いた結果を示し、パネル「anti-YRP」（右パネル）は抗YRP抗体を用いた結果を示し、レーン「ascites」は腹水、レーン「Vg」はピテロジェニン、レーン「YRP」はYRP、レーン「egg ext.」は「卵抽出物」の結果を示す。

40

【0060】

図6から、抗ピテロジェニン抗体はピテロジェニンを認識するが、腹水中のYRPおよび精製されたYRPを認識しなかった。また、抗ピテロジェニン抗体は卵抽出物中の分子量120、96、67および36kDaのバンドを認識した。これに反し、抗YRP抗体は、YRPを認識したが、腹水中のピテロジェニンおよび精製されたピテロジェニンの何れも認識しなかった。また、卵抽出物中の29kDaのバンドは抗YRP抗体と免疫反応した。以上から、ピテロジェニンおよびYRPは免疫学的に互いに異なることが示された。

50

また、Y R PはE 2投与によるメダカの腹水からだけでなく、飼育されている雌メダカの血清にも存在することが確認された。したがって、Y R PはE 2投与による人為物ではない。その上、ウエスタンブロット法において抗-Y R P抗体は卵抽出物と交叉反応性を示した。これらを総合すると、E 2投与により発現される腹水中のY R Pは雌特異蛋白であり、卵黄蛋白質と抗原性を共にすると考えられる。

【0061】

実施例7 (ピテロジェニンおよびY R Pの雌特異性の検討)

実施例1で得られた雄血清およびメス血清のそれぞれを、非還元条件下で7.5%ゲルを用いて電気泳動を行うことにより分離し、ウエスタンブロット法に従い、ニトロセルロース膜へ転写し、ピテロジェニンに対する抗体の2000倍希釈液、および、Y R Pに対する抗体の500倍希釈液の夫々を用いてインキュベートし、免疫染色した。その結果を図7に示す。図7において、パネル「a-Vg」およびパネル「a-Y R P」は、それぞれ、「抗ピテロジェニン抗体」および「抗Y R P抗体」を用いた結果を示し、レーン「male serum」およびレーン「female serum」は、それぞれ、「雄血清」および「雌血清」の結果を示し、矢印は、ピテロジェニン(Vg)およびY R Pの移動位置を示す。

10

【0062】

図7から、ピテロジェニンおよびY R Pは、雌血清中で検出されたが、雄血清中では検出されないことがわかる。したがって、Y R Pは雌特異蛋白であることが示された。

20

【0063】

実施例8 (金コロイド標識抗Y R P抗体溶液の作成)

(1) 抗Y R P抗体の調製

上記の方法によって得られた抗血清を、さらに、常法によりプロテインG吸着体を用いたIgG精製を行い、抗Y R P抗体とした。

【0064】

(2) 金コロイド溶液の調製

加熱によって沸騰させた超純水99mlに、1%(v/w)塩化金酸水溶液1mlを加え、さらに、その1分後に1%(v/w)クエン酸ナトリウム水溶液1.5mlを加えて加熱し5分間沸騰させた後、室温に放置して冷却した。次いで、この溶液に200mM炭酸カリウム水溶液を加えてpH9.0に調製し、これに超純水を加えて全量を100mlとして金コロイド溶液を得た。

30

【0065】

(3) 金コロイド標識抗Y R P抗体溶液の調製

上記で得られた抗Y R P抗体の蛋白換算重量1 μ g(以下、抗体の蛋白換算重量を示すとき、単に、その精製蛋白質の重量分析による重量数値で示す)と上記の金コロイド溶液1mlとを混合し、室温で2分間静置してこの抗体のこごとくを金コロイド粒子表面に結合させた後、金コロイド溶液における最終濃度が1%となるように10%ウシ血清アルブミン(以下、「BSA」と記す)水溶液を加え、この金コロイド粒子の残余の表面をこごとくこのBSAでブロックして、金コロイド標識抗Y R P抗体(以下、「金コロイド標識抗体」と記す)溶液を調製した。この溶液を遠心分離(5600 \times G、30分間)して金コロイド標識抗体を沈殿せしめ、上清液を除いて金コロイド標識抗体を得た。この金コロイド標識抗体を10%サッカロース・1%BSA・0.5%トリトン(Triton)-X100を含有する50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に懸濁して金コロイド標識抗体溶液を得た。

40

【0066】

実施例9 (Y R P測定用クロマト法テストストリップの作成)

(1) Y R Pと金コロイド標識抗体との複合体の捕捉部位

幅5mm、長さ36mmの細長い帯状のニトロセルロース膜をクロマトグラフ媒体のクロマト展開用膜担体として用意した。

【0067】

50

抗 Y R P 抗体 2 . 0 m g / m l が含有されてなる溶液 0 . 5 μ l を、このクロマト展開用膜担体におけるクロマト展開開始点側の末端から 7 . 5 m m の位置にライン状に塗布して、これを室温で乾燥し、Y R P と金コロイド標識抗体との複合体の捕捉部位とした。

【 0 0 6 8 】

(2) 金コロイド標識抗体含浸部材

5 m m \times 1 5 m m の帯状のガラス繊維不織布に、実施例 1 で得られた金コロイド標識抗体溶液 3 7 . 5 μ l を含浸せしめ、これを室温で乾燥させて金コロイド標識抗体含浸部材とした。

【 0 0 6 9 】

(4) クロマト法テストストリップの作成

上記クロマト展開用膜担体、上記標識抗体含浸部材の他に、被験試料注入部材として綿布と、吸収用部材として濾紙を用意した。そして、これらの部材を用いて、図 8 を参照して上述したクロマト法テストストリップを作成した。

【 0 0 7 0 】

実施例 1 0 (被験試料中の抗 Y R P 抗体の検出)

実施例 2 で得られた精製 Y R P を生理食塩水で希釈して、各濃度に調整し、被験試料とした。そして、被験試料 1 0 0 μ l を実施例 9 で得られたテストストリップの被験試料注入部にマイクロピペットで滴下してクロマト展開し、室温で 1 5 ~ 3 0 分放置後、上記捕捉部位で捕捉された Y R P と金コロイド標識抗体との複合体の捕捉量を肉眼で観察した。捕捉量は、その量に比例して増減する赤紫色の呈色度合いを肉眼で、- (着色なし)、+ (微弱な着色)、++ (明確な着色)、+++ (顕著な着色) の 4 段階に区分して判定した。その結果を表 1 に示した。

【 0 0 7 1 】

また、同様の被験試料について、E L I S A 法で測定した。すなわち、抗 Y R P 抗体を 0 . 1 m o l / L 炭酸緩衝液 (p H 9 . 5) にタンパク濃度 1 0 μ g / m l になるように溶解し、9 6 ウェルのポリスチレン製マイクロタイタープレートの各ウェルに 5 0 μ l 入れ、室温で一晩静置した。0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含むリン酸生理食塩緩衝液で 3 回洗浄した後、上記で調製された各濃度の試料を 5 0 μ l 各ウェルに入れ、3 7 $^{\circ}$ C 3 時間静置した。3 回洗浄した後、P O D (ペルオキシダーゼ) 標識抗 Y R P 抗体のタンパク濃度 1 m g / m l 溶液を 5 0 μ l 入れ、各ウェルを洗浄後、ペルオキシダーゼ発色キット S T の構成成分である T M B Z 液 (株式会社タウンズの製品) を 1 0 0 μ l を加え 2 5 $^{\circ}$ C で 2 0 分反応させた後、2 N 硫酸を 1 0 0 μ l ずつ加え、反応を停止させ、各ウェルの色度をマイクロプレートリーダーで測定した。測定波長は 4 5 0 n m であった。結果を表 2 に示す。

【 0 0 7 2 】

【表 2】

精製 YRP 濃度	イムノクロマトキット	ELISA 測定値 (ABS)
0 ng/ml	—	0.001
5 ng/ml	—	0.043
10 ng/ml	+	0.705
20 ng/ml	++	1.370
50 ng/ml	+++	2.021

【 0 0 7 3 】

表 2 から、クロマトストリップ捕捉部による判定結果は、E L I S A 法による判定結果と同等であり、したがって、本発明の測定法は、メダカの Y R P の検出に有用であることが示された。

【 0 0 7 4 】

【 発明の 効果 】

本発明によれば、メダカ由来の新規な雌特異卵黄関連蛋白 (Y R P) およびそれに対する抗体が提供される。本発明の雌特異卵黄関連蛋白 (Y R P) は、ピテロジェニンと同様にエストロゲンによって誘導されるので、ピテロジェニンを検出する従来の環境ホルモンの測定系の代替法を構成するのに有用である。また、本発明の雌特異卵黄関連蛋白 (Y R P) は、ピテロジェニンよりもエストロゲンに対する感受性が高いと考えられるため、従来の環境ホルモン測定系よりも感度の高い測定系を提供でき、さらには、E L I S A やイムノクロマトグラフィーなどの各種の免疫学的測定法に応用できる。

【 図面の簡単な説明 】

10

【 図 1 】メダカの雄の血清 (レーン「 m a l e s e r u m 」) および雌の血清 (レーン「 f e m a l e s e r u m 」) ならびに腹水 (レーン「 a s c i t e s 」) の電気泳動パターンを示す写真であり、(a) は、ゲルを銀染色した結果を示し、(b) は、ウエスタンプロット法により卵抽出物に対する抗血清を用いて免疫染色した結果を示す。

【 図 2 】(a) はメダカの腹水のヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる溶出パターンであり、(b) は(a) で得られたピテロジェニンを含むフラクションのゲル濾過による溶出パターンであり、(c) は(a) で得られた Y R P を含むフラクションのゲル濾過による溶出パターンである。

【 図 3 】精製されたピテロジェニン (V g) および Y R P ならびに腹水 (A S : 対照) の、腹水に対する抗血清 (a - A S) を用いた二重免疫拡散法のチャート。

20

【 図 4 】腹水 (レーン「 a s c i t e s 」) 、精製されたピテロジェニン (レーン「 V g 」) および Y R P (レーン「 Y R P 」) 、並びに、卵抽出物 (レーン「 e g g e x t . 」) の S D S - P A G E パターンを示す写真であり、左パネル (2 M E (-)) は非還元条件における結果を示し、右パネル (2 M E (+)) は還元条件における結果を示す。

【 図 5 】精製されたピテロジェニン (レーン「 V g 」) および Y R P (レーン「 Y R P 」) をネイティブ - P A G E (n a t i v e - P A G E) にかき、クーマシーブリリアントブルー R - 2 5 0 (パネル「 C B B 」) 、スーダンブラック B (パネル「 S B 」) 、過ヨウ素酸シッフ試薬 (パネル「 S c h i f f ' s 」) 、メチル グリーンパターン (パネル「 M G 」) によって染色した結果を示す写真。

【 図 6 】腹水 (レーン「 a s c i t e s 」) 、精製されたピテロジェニン (レーン「 V g 」) および Y R P (レーン「 Y R P 」) 、並びに、卵抽出物 (レーン「 e g g e x t . 」) を、非還元条件下で電気泳動した写真であり、ウエスタンプロット法により、ピテロジェニンに対する抗体 (左パネル「 a n t i - V g 」) 、および、 Y R P に対する抗体 (右パネル「 a n t i - Y R P 」) の夫々を用いて免疫染色した結果を示す。

30

【 図 7 】メダカの雄血清 (レーン「 m a l e s e r u m 」) およびメス血清 (レーン「 f e m a l e s e r u m 」) のそれぞれを、非還元条件下で電気泳動した写真であり、ウエスタンプロット法により、ピテロジェニンに対する抗体 (左パネル「 a n t i - V g 」) 、および、 Y R P に対する抗体 (右パネル「 a n t i - Y R P 」) の夫々を用いて免疫染色した結果を示す。

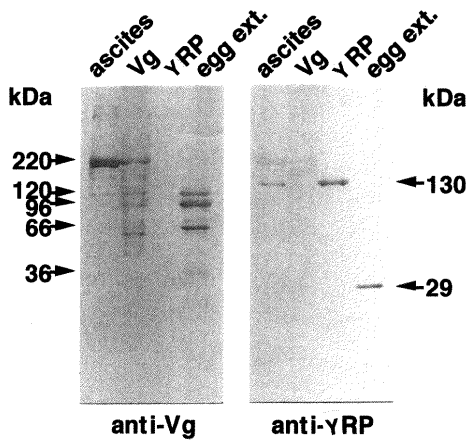
【 図 8 】 a はイムノクロマト法テストストリップの平面図、 b は a で示されたイムノクロマト法テストストリップの縦断面図。

40

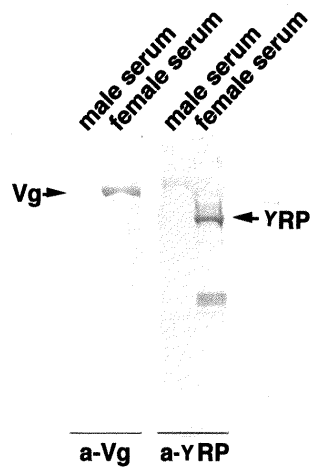
【 符号の説明 】

- 1 粘着シート
- 2 含浸部材
- 3 膜担体
- 3 1 捕捉部位
- 4 吸収用部材
- 5 試料添加用部材

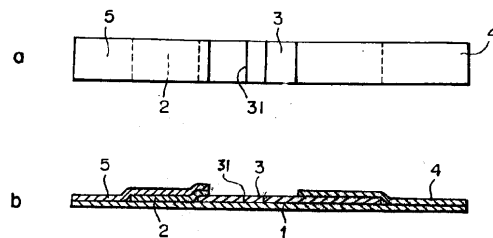
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/553

F I

G 0 1 N 33/553

テーマコード(参考)

(72)発明者 伊藤 敬三

北海道石狩市新港西1丁目777番地12号 株式会社フロンティア・サイエンス内

Fターム(参考) 4H045 AA10 BA10 CA52 DA75 DA86 EA50 HA07

专利名称(译)	蛋黄相关蛋白及其用途		
公开(公告)号	JP2004161685A	公开(公告)日	2004-06-10
申请号	JP2002330226	申请日	2002-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社比尔生命 前沿科学		
申请(专利权)人(译)	株式会社ビーエール 有限公司边缘科学		
[标]发明人	原彰彦 難波靖治 伊藤敬三		
发明人	原 彰彦 難波 靖治 伊藤 敬三		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/46 C07K16/18 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/553		
FI分类号	C07K14/46 C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/543.521 G01N33/545.A G01N33/553		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/CA52 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/HA07		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过提供一种新的源自墨香的女性特异性卵黄相关蛋白（YRP）及其抗体，为环境激素提供一种常规检测系统的替代方法，以检测卵黄蛋白原。源自的雌性与卵黄有关的蛋白质，经凝胶过滤后分子量约为460 kDa，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳的分子量为130 kDa，以及针对该抗体的抗体，以及使用该抗体的蛋黄相关蛋白的各种免疫测定方法。[选择图]图8

