

ユウロピウム標識による 17 α -ヒドロキシprogesteroneの
時間分解蛍光イムノアッセイ
(分担研究 : 現行マススクリーニングシステムの問題点に関する研究)

前田昌子 辻 章夫

要約 先天性副腎過形成症の診断の指標として用いられている乾燥濾紙血液中の17 α -ヒドロキシprogesterone (17-OHP) の測定法としてユウロピウム (Eu³⁺) キレート遅延蛍光を用いる時間蛍光イムノアッセイ (Time Resolved Fluorescence Immunoassay) を確立した。

見出し語 17-OHP, 時間分解蛍光イムノアッセイ, 非放射性イムノアッセイ

研究方法

a) Eu-標識 17-OHP 結合体の調製
17-OHP-4-カルボキシメチルベンゾエーテル (17-OHP-4-CMT) とアルカリホスファターゼ (ALP) を混合酸無水物法で結合させ、常法により、 γ 濾過法で精製する。

このALP-17-OHP 結合体にユウロピウム 標識試薬 (N¹-(p-イソチアネートベンジル)-ジエチルトリアミン-N¹, N², N³, N⁴-四酢酸Eu (III) ; DTTA-Euと略) を加え、 γ 濾過法で精製し、17-OHP-4-CMT-ALP-Eu 標識体を得る。 Fig. 1に標識化反応を示す。

b) 17-OHPのELISA

抗家兎IgG (第2抗体) 固相化マイクロタイターのウェルに乾燥濾紙血液ディスク 0~80 ng/ml,

3 mm径) 1個、抗17-OHP-カルボキシメチルベンゾエーテル (CE T)-BSA抗血清 (80,000 倍希釈液) 100 μ l および17-OHP-4-CMT-ALP-Eu 標識体 (1,000倍希釈液) 100 μ lを加え、4 $^{\circ}$ C で一夜反応する。

次にリン酸緩衝液 (ツイーン含有) で4回洗浄し各ウェルに蛍光増強試薬 (Enhancer, アルファ提供 2-ナフトリフロアセトン, トリ-n-オクチルフォスフィンオキไซด์ およびトリトン x-100 含有) 250 μ lを加え、Arcus 1230蛍光光度計で測定する。

結果および考察

Euと17-OHP-4-CMT-ALPとの比は γ 濾過で精製後の免疫活性のあるフラクション (フラクション No. 13~15) で11.2~12.2 であり、十分Euで標識された結合体を得られた。

昭和大学薬学部薬品分析化学教室

(School of Pharmaceutical Sciences,
Showa University)

ムアッセイのシステムをFig. 2に示す。

種々の条件検討の結果得られた最適条件下での標準曲線の例をFig. 3に示した。標準曲線の各点でのC.V%は1.2 ~ 6.9%であった。

Eu 標識体は非特異的な吸着が強く、したがって結合型/遊離型分離の際の洗浄操作は3分間振とうしながら4回行ない、非特異的な吸着の低下をはかった。

市販のELISA 法(富士ビオ(株)提供)との相関は $R = 0.969$, $Y = 0.74x + 7.0$ ($n = 36$) と良好であり(Fig. 4)、本法もCAHのマスクリングに適用可能と思われる。

ルチン症のマスクリングに時間分解蛍光法のシステム(DELFIACAT)が用いられている施設もあり、Eu キレート標識剤も市販されるようになり、本法の応用が期待される。

Abstract

Direct Solid Phase Time-Resolved Fluorescence Immunoassay of
17 α -Hydroxyprogesterone in Dried Blood Spotted on Filter Paper

Masako Maeda and Akio Tsuji

A dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay of 17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP) in dried blood disc spotted on filter paper based on time-resolved fluorescence is described. The assay is a direct assay, where free 17-OHP and Eu-labeled 17-OHP compete with anti-17-OHP antibody in the anti-rabbit IgG coated on the wall of a microtiter-strip well. The amount of bound europium is inverseley proportional to the amount of 17-OHP in the sample. Separation of bound and free fractions is done by washing the strip well. The fluorescence intensity of europium is measured by time-resolved fluorometry. 17-OHP values obtained by this method agreed well with those obtained by ELISA ($r = 0.969$). The detection limit (1 pg/assay) was almost equivalent to that of chemiluminescent enzyme immunoassays which we developed.

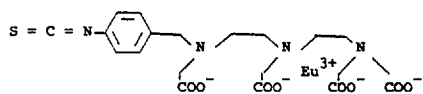
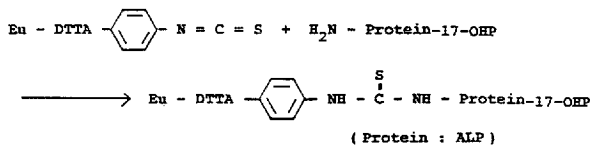


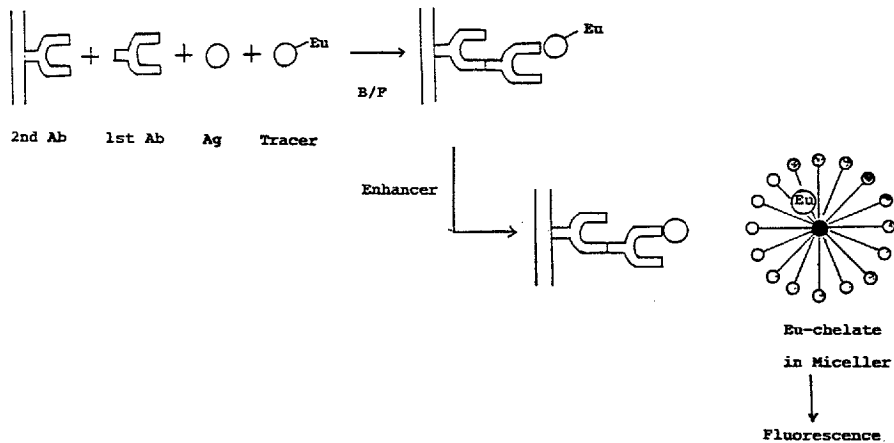
Fig. 1



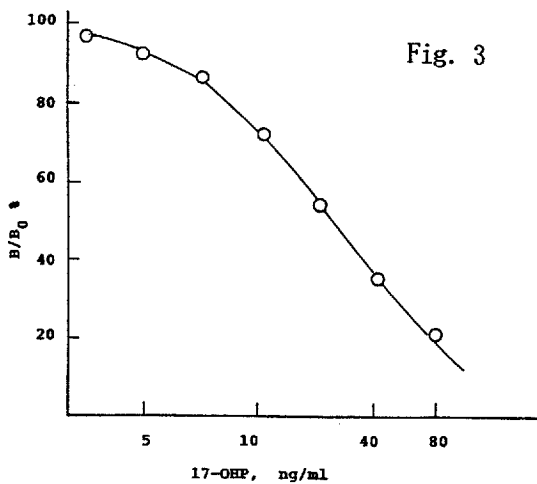
CONJUGATION REACTION BY Eu-DTTA LABELING REAGENT

ASSAY SYSTEM FOR TR-FIA OF 17-OHP

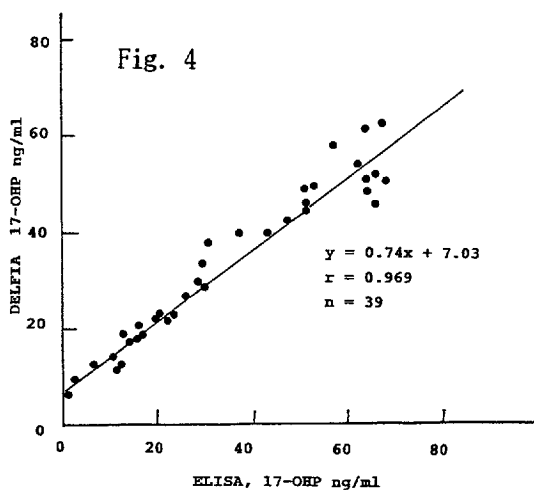
Fig. 2

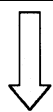


STANDARD CURVE OF 17-OHP BY DELFIA SYSTEM



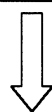
CORRELATION BETWEEN ELISA AND DELFIA FOR 17-OHP





検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約 先天性副腎過形成症の診断の指標として用いられている乾燥濾紙血液中の 17α -ヒドロキシprogesterone (17-OHP) の測定法としてユロピウム (Eu^{3+}) キレート の遅延蛍光を用いる時間蛍光免疫アッセイ (Time Resolved Fluorescence Immunoassay) を確立した。