

発光検出ELISAによるTSHおよび17-ヒドロキシプロゲステロンの測定法
(分担研究 : 代謝疾患、内分泌疾患等のマススクリーニング、進行阻止
および長期管理に関する研究)

前田昌子 辻 章夫

要約 クラウゼン病および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TSH および17-ヒドロキシプロゲステロン(17-OHP)の測定法として化学または生物発光検出ELISA法を確立した。

見出し語 TSH, 17-OHP, 非放射性イムノアッセイ, 化学・生物発光検出

研究方法

a) 酵素標識体の調製

17-OHP-4-カルキシメチルチオエーテル(17-OHP-4-CMT)と酵素を混合酸無水物法で結合させ、常法によりろ過法で精製する。酵素としてはアルカリ性ホスファターゼ(ALP)、西洋ワザビのホスファターゼ(HRP)およびアセチルチナーゼ(AK)を用いた。TSHの場合はこれらの酵素を抗体に標識した。アッセイのシステムは17-OHPの場合は競合法で、TSHはサンドイッチ法で行なった。

b) TSHおよび17-OHPのELISA

TSHおよび17-OHPのELISAのプロトコルをFig. 1に示す。標識酵素の活性測定法はHRPは $\text{H}_2\text{O}_2/\text{p}$ -ヨードフェノール、ALPはAMPPD、BCIP/ルミノール-m-POD、アスコルビン酸-2-リン酸/ルシゲニン法を、AKはアセチルリン酸/ADPから生成するATPをルシフェラーゼ/ルシフェリンで

化学または生物発光検出した。測定は浜松ホニクス(株)製MTPリーダー(パラルディテクティングマイクロタイター読み取器)を用いた。

c) 結果および考察

近年、化学・生物発光検出法が、その高感度性、迅速な反応、広いダイナミックレンジなどから臨床化学の領域で広く用いられるようになってきた。本報告では通常のELISAの検出に化学・生物発光反応を利用して、イメージ画像解析装置MTPリーダーを用いて検出した。

この方法で標識酵素の活性を測定したところ、表1に示すように $10^{-17} \sim 10^{-20}$ モルの検出限界あった。また、ELISAによるTSHや17-OHPの感度もアトモル以下であった。免疫反応時間も従来は4~15時間であったが、

昭和大学薬学部薬品分析化学教室

(School of Pharmaceutical Sciences,
Showa University)

本法では1～2時間で十分満足すべき結果が、種類のおよびの assays が可能になると思われ今後得られた。マスキングへの応用は今後の課題の進展が期待される。
であるが、本法を用いれば3 mmディスク 1個から数

Abstract

Chemi- and Bioluminescent ELISA

Its Application to Neonatal Mass-Screening for CH and CAH

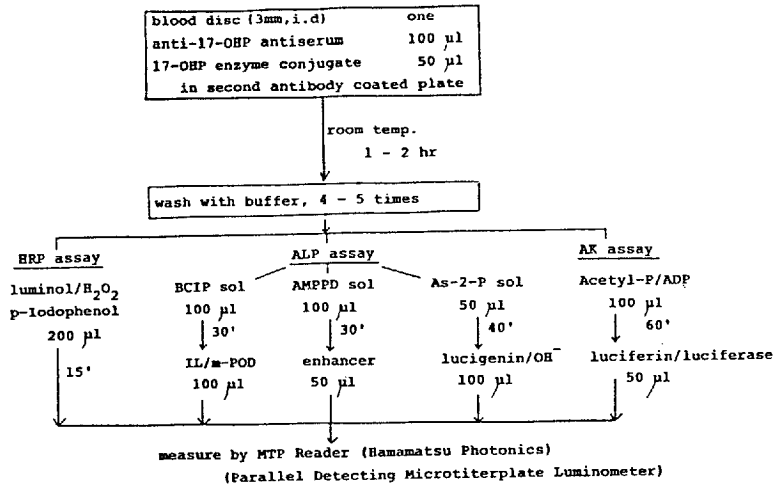
Masako Maeda and Akio Tsuji

Recently, chemiluminescent (CL) and bioluminescent (BL) assays are attractive analytical method in the field of clinical chemistry, because of their high sensitivity, rapid reaction and wide dynamic range. We have developed various CL and BL enzyme immunoassays. In this report, we described the method for chemi- or bioluminescent enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

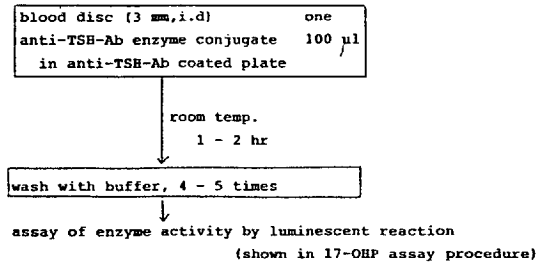
After immune reaction of TSH or 17-OHP in dried blood, enzyme activity bound on the wall of microtiter plate wells was assayed by CL or BL reaction.

The light intensity of all wells was measured simultaneously using Hamamatsu MTP-reader (Parallel Detecting Microtiterplate Luminometer). We used horseradish peroxidase (HRP), alkaline phosphatase (ALP) for enhanced CL-ELISA (ECL-ELISA) and acetatekinase (AK) for BL-ELISA as label enzyme. In the near future, several hormones in one dried blood disc could be assayed by proposed method and it will be applicable to mass-screening.

17-OHP Assay Procedure



TSH Assay Procedure



Detection Limits of Enzymes, TSH, 17-OHP by Variuos Luminescent ELISA

Enzyme	Assay system	Detection Limit mol/assay	Detection Limit of 17-OHP	Detection Limit of TSH
Horseradish peroxidase	p-Iodophenol/Luminol/H ₂ O ₂	2.5x10 ⁻¹⁷ *1	0.1pg	0.01µIU/ml
Alkaline phosphatase	AMPPD	1.0x10 ⁻²⁰ *2	0.05*3	0.004*3
	Ascorbic acid-2-O-phosphate/Lucigenin	1.0x10 ⁻¹⁹	0.1	0.01
	BCIP/Isoluminol/m-POD	1.0x10 ⁻¹⁹	—	0.05
Acetate kinase	Acetyl - phosphate/ADP/Luciferase	6.0x10 ⁻²⁰	0.1	0.01

m-POD : microperoxidase, BCIP : 5-Bromo-4-chloro-3-Imdoryl phosphate, Luciferase : firefly luciferase,
 AMPPD : 3-(2'-spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxetane,
 *1 : Kllicka L.J et al., *2 : Bronstein I et al., *3 : Solution



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 クレチン症および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TSHおよび17-ヒドロキシプロゲステロン(17-OHP)の測定法として化学または生物発光検出 ELISA 法を確立した。