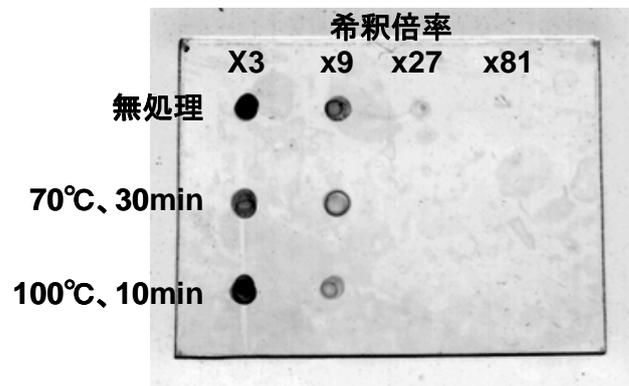


加熱処理によるプロテイングルタミナーゼの免疫反応性の変化

1. 目的：プロテイングルタミナーゼ（PG）について、ヒトが経口接種する際に処理される場合と同等の条件で加熱処理を行い、免疫反応性の変化を調べた。
2. 方法概要：PG を、加熱処理（失活条件である 70°C、30 分処理）、及び煮沸処理（100°C、10 分）を行ったものについて、未処理のものとともにドットブロットウエスタン解析及び ELISA 解析を行った。ウエスタン解析は、薬剤等による変性の影響を避けるためドットブロットウエスタン解析を行った。
3. 結果

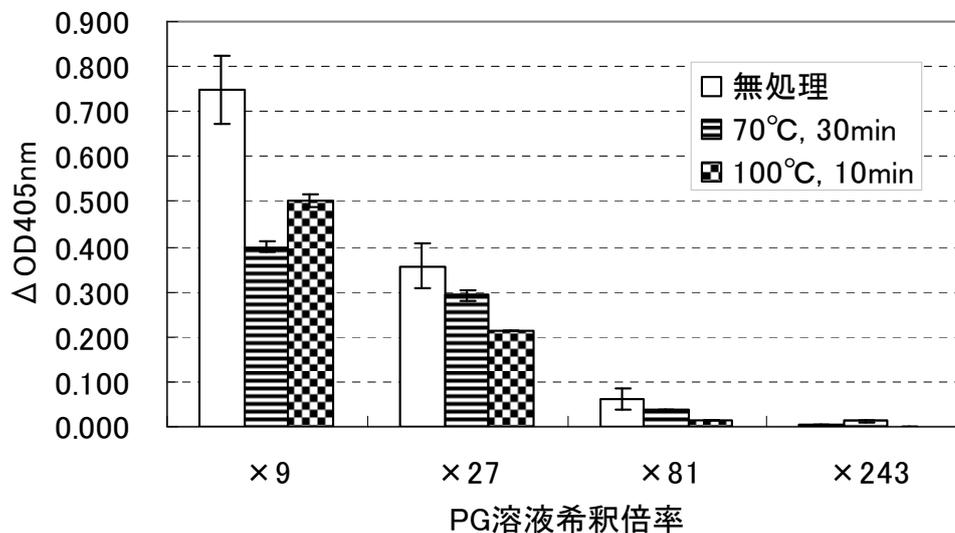
1) ドットブロットウエスタン解析

下図に示すように、加熱、煮沸いずれの処理でも、免疫反応性は低下していた。



2) ELISA 解析

下図に示すように、加熱、煮沸いずれの処理でも、免疫反応性は低下していた。



方法詳細

1. **処理方法** : 本品溶液 (190 μ g-Protein/ml-20 mM リン酸緩衝液、pH6.0) を、蒸留水で3、9、27、81倍希釈し、加熱 (70°C、30分間) 及び煮沸 (100°C、10分間) 処理し、サンプル液とした。

2. **ドットプロットウェスタン解析** : ニトロセルロース膜 (Hybond™ ECL™, Amersham Pharmacia Biotech 製) にサンプル液を 3 μ l ずつドットプロットして室温で乾燥させた後に、ブロックエース原液 (4%(w/v)、雪印/大日本製薬製) を洗浄バッファー (0.05% Tween20 を含む 20 mM リン酸緩衝液、pH6.0) で4倍希釈した液で室温一時間ブロッキング後、洗浄バッファーで2回洗浄した。抗 PG マウス血清を洗浄バッファーで 10,000 倍希釈した液に浸し、室温で一時間振とう後 (一次抗体反応)、洗浄バッファーで2回洗浄した。抗マウス IgG (アルカリホスファターゼ結合、TOYOBO 製) を洗浄バッファーで 10,000 倍希釈した液に浸し室温で一時間振とうした (二次抗体反応)。洗浄バッファーで2回洗浄後、BCIP/NBT Phosphatase Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories 社/フナコシ社製) を用い発色させた。

3. **ELISA 解析** : Protein Detector HRP Microwell Kit (Kirkegaard & Perry Laboratories 社/フナコシ社製) を用いキット添付のプロトコルに従い行った。各サンプル液をコーティング溶液で3倍希釈し、ELISA プレート (SMILON MULTI WELL PLATE [for ELISA] H TYPE PLATE、住友ベークライト社製) に各 100 μ l 分注し室温で一時間固相化した。液を除いた後、300 μ l の 1 x BSA Diluent/Bolocking 溶液を分注し室温で 15 分間ブロッキングし、抗 PG マウス血清を 1 x BSA Diluent/Bolocking 溶液で 10,000 倍希釈した液を 100 μ l 分注し室温で 1 時間静置した (一次抗体反応)。1 x Wash 溶液で 4 回洗浄後、HRP anti-mouse IgG (H+L) from Goat を 1 x BSA Diluent/Bolocking 溶液で 10,000 倍希釈した液を 100 μ l 分注し室温で一時間静置した (二次抗体反応)。1 x Wash 溶液で 5 回洗浄後、100 μ l の基質溶液を分注し発色させた。