

植物ウイルス、ウイロイドの新しい 遺伝子診断法の開発

(研究課題番号08660046)

平成8～9年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 佐野 輝男

(弘前大学農学生命科学部)

研究代表者

佐野 輝男 (弘前大学農学生命科学部、助教授)

研究費

平成8年度	1、700	千円
平成9年度	900	千円
計	2、600	千円

研究発表

(学会誌、他)

Teruo Sano and Akira Ishiguro; A simple and sensitive non-radioactive microplate hybridization for the detection and quantification of picograms of viroid and viral RNA, Arch. Phytopath. Pflanz. Vol.30, 303-312, 1996.

Teruo Sano, Akihiro Nagayama, Toshiya Ogawa, Isao Ishida and Yoshimi Okada; Transgenic potato expressing a double-strand RNA-specific ribonuclease is resistant to potato spindle tuber viroid, Nature Biotechnology, Vol.15, 1290 - 1294, 1997.

Teruo Sano and Akira Ishiguro; Viability and pathogenicity of intersubgroup viroid chimera suggest possible involvement of the terminal right region in replication, Virology, Vol. 240, 238 - 244, 1998.

杉山 悟、佐野輝男; マイクロプレートハイブリダイゼーションによるメロンからのキュウリモザイクウイルスサテライトRNAの検出、北日本病害虫研報、48巻、99-100、1997

(口頭発表)

佐野輝男、石黒亮、御子柴茂郎、新子泰規; マイクロプレートハイブリダイゼーションによる植物ウイルス、ウイロイド病の遺伝子診断、平成8年日本植物病理学会大会 (1996、4)

長山昭博、佐野輝男、小川俊也、大西昇、石田功、岡田吉美; 2本鎖RNA分解酵素 (pac1) 形質転換ジャガイモはウイロイドの感染増殖を抑制する、第19回日本分子生物学会年会 (1996、8)

佐野輝男、平石智信、田中真由美; 病原性の異なるホップ矮化ウイロイド変異株間キメラウイロイドの作出と複製能について、平成8年度日本植物病理学会東北部会 (1996、10)

佐野輝男、後藤深雪、平石智信、田中真由美、石黒亮、村上敦司、浅田敦子、鏡勇吉、四方英四郎; ホップ矮化ウイロイドの構造と病原性: ホップ、ブドウ、スモモ及びカンキツ各変異株のホップでの病原性比較試験 (1)、平成9年日本植物病理学会大会 (1997、4)

長山昭博、佐野輝男、小川俊也、大西昇、石田功、岡田吉美; 2本鎖RNA分解酵素 (pac1) 導入によるジャガイモ spindle tuber ウイロイド抵抗性ジャガイモの作出、平成9年日本植物病理学会大会 (1997、4)

御子柴茂郎、坪井幸恵、佐野輝男、畑谷達児、須田成志; マイクロプレートハイブリダイゼーションによるホップ潜在ウイルスの診断: ELISA法との比較、平成9年度日本植物病理学会東北部会 (1997、10)

古賀聡、佐野輝男; HSVd-CEVd間キメラウイロイドの分子構造と安定性、平成9年度日本植物病理学会東北部会 (1997、10)

目 次

はじめに

- 1、従来の遺伝子診断法の課題
- 2、マイクロプレートハイブリダイゼーション法の現状と課題
- 3、新しいマイクロプレートハイブリダイゼーション法の開発

第1章、マイクロハイブリダイゼーション法 (MPH) の諸条件の検討

- 1- (1)、概略
- 1- (2)、マイクロプレートハイブリダイゼーション操作の簡略化
 - 「検体核酸を最も効率良くマイクロプレート表面に吸着させるにはどうしたらよいか？」
 - 「プレハイブリダイゼーションは省略できる」
 - 「リボヌクレアーゼ処理も省略できる」
 - 「ハイブリダイゼーション液に無駄なものは入っていないか？」
 - 「簡略型MPHプロトコールと今後さらに改良を必要とする点」

第2章、マイクロプレートハイブリダイゼーション法 (MPH) の検出感度

- 2- (1)、概略
- 2- (2)、メンブレンハイブリダイゼーション法との比較：メンブレンを使うか？それともマイクロプレートにするか？また発色反応の至適時間は？
- 2- (3)、電気泳動法との比較 … ウイロイドの場合
- 2- (4)、ELISA法との比較 … ウイルスの場合
- 2- (5)、反応の特異性 … クロスハイブリダイゼーションの問題

第3章、マイクロプレートハイブリダイゼーション法 (MPH) の実施例

- 3- (1)、キュウリモザイクウイルス (CMV) とサテライトRNA の同時検定
- 3- (2)、ホップ矮化ウイロイドの大量検定
- 3- (3)、ホップ潜在ウイルス (HLV) の大量検定

むすび

MPH用プローブの一覧

参考資料 (関連公表文献)

はじめに

1、従来の遺伝子診断法の課題

植物ウイルス、ウイロイド病診断における遺伝子診断法といえば、各病原ウイルス或いはウイロイド特有の遺伝子を核酸ハイブリダイゼーション法の原理に基づいて特異的に検出しようとするもので、1981年 Owens & Diener がドットハイブリダイゼーション法を potato spindle tuber viroid の診断法として報告したのが最初である。以来種々の植物ウイルス、ウイロイド病の診断、同定技術の一つとして植物病理学研究分野で着実に定着しつつあるように思われるが、従来から病害診断分野で広く一般に用いられてきた血清学的手法に比較すると、実用的な診断技術として定着するにはまだまだ特殊な研究室レベルの技術というイメージが強いように感じられる。

では、どうしたらELISA法或いはDIBA法に代表される血清学的診断法のように実用的診断法として広く普及させることが出来るだろうか？また、今まで行われて来た遺伝子診断法のどこが実用的診断技術としての普及の障害となっているのだろうか？検出感度と反応の特異性という点で遺伝子診断法は血清学的手法に劣らず、むしろ優れているといっても過言ではないから診断の信頼性という点では問題ないであろう。まず欠点の第一として、従来の遺伝子診断法は検出感度を上げるためにラジオアイソトープ標識していた点が挙げられるだろう。また第二に、検出の最終段階でX線フィルムに感光させ暗室で現像してプラス/マイナスを判定する方法が一般的であり、暗室操作というマニアックな側面を持つことも一因として挙げられるであろう。さらに第三に、ベラベラしたメンブレンを汚さないように注意しながらピンセットでつまんで種々の操作を施すというのも診断過程のマニュアル化、オートメーション化の障害になっているかもしれない。

幸い、最近 DIG 標識或いはビオチン標識等の非放射性検出技術が進歩してラジオアイソトープに匹敵する検出感度が得られるようになったので、今まで遺伝子診断法実用化の最大の障害であった第一の問題は完全に取り払われたとあってよい状況になった。あとは上記の第二、第三の問題を如何にクリアーし、遺伝子診断法を簡略化することができるかである。

2、マイクロプレートハイブリダイゼーション法の現状と課題

遺伝子診断法即ち核酸ハイブリダイゼーション法を ELISA 法並に行うにはどうすればよいだろうか？核酸ハイブリダイゼーション法をニトロセルロースメンブレンではなく ELISA 法のようにマイクロプレート上で行おうとする概念は既に1980年代の半ばからあり、マイクロプレートハイブリダイゼーション法と呼ばれている。マイクロプレートハイブリダイゼーション法はマイクロプレートの固相表面に核酸を吸着させ標的となる核酸に相補的な標識核酸（プローブ）を用いて検出する方法であり、ウイルス核酸の検出等に有効であるため、現在までいくつかの方法が報告されてきた。

ポリスチレン製のマイクロプレートを使用して標的核酸を特異的に検出する試みは、Nagataら（Nagata et al. 1985；添付論文の引用文献を参照）によって初めて行なわれた。Nagataらはマイクロプレートの固相表面に核酸を吸着させた後、ビオチン標識したDNAプローブを標的核酸と結合させ、アビジン結合 β -galactosidaseを加えてビオチンとアビジンを結合させた。さらに基質として、4-methylumbelliferyl- β -galactosideを加えて360-450 nmの蛍光を計測している。ピコグラム（pg）レベルの高い感度が得られたが、20-50 ng/mlという非常に高濃度のプローブを必要とし、蛍光を測定する特殊な装置も必要であった。その後PCR法が普及すると、標的核酸をPCR又はRT-PCRで増幅させ、その増幅したDNA断片をマイクロプ

レートハイダイゼーションで検出する方法が検討された (Inouye and Hondo, 1990; Nolasco et al. 1993; Gibellini et al. 1993; Sugita et al. 1994; Hataya et al. 1994; Dyster et al. 1994; Nikiforov and Yu-Hui, 1995; 以上添付論文の引用文献を参照)。これらの方法はPCRやRT-PCRによる検出法の欠点であった非特異的な反応を識別することができ感度も非常に高いが、マイクロプレートハイブリダイゼーション法に用いるプローブはいずれもビオチンかジゴキシゲニン標識のDNAプローブであり、高濃度のプローブを用いなければ十分な感度が得られなかった。また、PCRやRT-PCRの過程を経ているので標的核酸の定量に用いることは困難であり、加えてコンタミネーションによる偽陽性が出る可能性も高くなる。さらに、高濃度のプローブやPCR、RT-PCRの際に要する高価な試薬類のため検定コストは必然的に高くなり、大量の検定に用いることは経済的に大きな負担となっていた。

3、新しいマイクロプレートハイブリダイゼーション法の開発

このようにマイクロプレートハイブリダイゼーション法は未だ実用的診断技術とは言い難く、より簡便に特殊な装置を用いずにできるだけ低コストで行えるように改良する必要がある。この研究は複雑なPCRやRT-PCRの過程を経ずに、マイクロプレートハイブリダイゼーション法のみでピコグラム (pg) レベルの標的核酸 (RNA及びDNA) を定量的に検出できる遺伝子診断手法を開発することを目標とした。具体的にはマイクロプレートハイブリダイゼーション法を植物ウイルス病の大量診断方法として広く親しまれてきたELISA法に出来るだけ近づける事を目標にし、その上でELISA法との感度比較を行ない、植物ウイルス、ウイロイド病の実用的診断法としてのマイクロプレートハイブリダイゼーション法の可能性を評価した。

第1章、マイクロハイブリダイゼーション法 (MPH) の諸条件の検討

1- (1)、概略

最初にマイクロプレートハイブリダイゼーション法 (以下MPHと省略する事にする) が診断技術として最も基本的な要件である高い特異性と検出感度を有するかどうか検討した。既にニトロセルロース或いはナイロンメンブレン等を用いた従来型のハイブリダイゼーション法の諸々の検討から、ジゴキシゲニン (DIG) (Boehringer mannheim 社、ドイツ) 標識したRNAプローブが非常に再現性が良く、検出感度もラジオアイソトープにほぼ匹敵することが分かっていたので (Lee et al., 1995; 添付論文の引用文献参照)、まず表1のように、従来型メンブレンハイブリダイゼーション法のプロトコールをそのままMPHに適用し、従来法と比較しながらMPHの検出感度を評価した。ただし、従来型メンブレンハイブリダイゼーション法では発光基質 (CDP-starTM, Tropix 社) を用いてX線フィルムに感光させて結果を得たが、MPHではELISA並を第一に考え、発色基質 (disodium p-nitrophenylphosphate hexahydrate, 和光純薬) を用いた。発色基質の方が検出感度は劣るが、発光基質に比べ非常に安価で且つ高価なX線フィルムを使う必要もなく検定費用のコストダウンにつながる。また肉眼で発色を見ることも出来るし、ELISAの診断設備のある所ならマイクロプレートリーダーで結果を数値化することも可能であろう。マイクロプレートは数社から様々なタイプのものが市販されているが、Hatayaら (1994; 添付論文の引用文献参照) のPCR - マイクロプレートハイブリダイゼーションに習い、Nunc 社製 Immunoplate II -Maxisorp を使用した。

表1、メンブレンハイブリダイゼーション法に基づく
マイクロプレートハイブリダイゼーション法 (MPH) のプロトコール

1、検体試料の変性処理

①変性液 (50%formamide, 6.125%formaldehyde, 1X SSC) 中で試料核酸を68℃15分間加熱変性する (反応系20 μ l)。

2、核酸のマイクロプレートへの吸着

②等量 (20 μ l) の20X SSCを加え、さらに必要に応じて10X SSCで希釈後、1 well 当り 200 μ l ずつ入れて37℃で2時間静置する。このとき液が蒸発しないように上下を空のプレート等ではさみ、小さな湿室に置いておく。この段階で核酸が固相表面に吸着する。

③検体液を捨て洗浄液 (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3 % Tween 20; pH 7.5) 300 μ l で5分3回洗浄する。

3、ハイブリダイゼーション

④プレハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide, 10% dextran sulfate, 0.1% SDS, 0.18 M NaCl, 20 mM sodium cacodylate, 1mM EDTA, 0.12 mg/ml salmon sperm DNA, 0.32 mg/ml yeast tRNA) を1 well 当り200 μ l ずつ分注する。マイクロプレートに蓋をして55℃で1時間静置する。

⑤プレハイブリダイゼーション液を捨て、ハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide, 10% dextran sulfate, 0.1% SDS, 0.18 M NaCl, 20 mM sodium cacodylate, 1mM EDTA, 0.12 mg/ml salmon sperm DNA, 0.32 mg/ml yeast tRNA) にDIG-RNAプローブ (1 μ l プローブ/10 ml ハイブリダイゼーション溶液) を加え、1 well 当り 200 μ l ずつ分注する。マイクロプレートに蓋をして55℃で1晩静置する。

4、洗浄

⑥ハイブリダイゼーション溶液を捨て 2X SSC 300 μ l で10分3回洗浄する。

⑦1 μ l/ml の RNase A を含む 2X SSC 300 μ l を各 well にいれ15分1回洗浄する。

⑧65℃に温めた 0.1X SSC - 0.1% SDS 300 μ l で10分2回洗浄する。

⑨洗浄液 (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3 % Tween 20; pH 7.5) 300 μ l で5分1回洗浄する。

5、検出反応 (DIG - ELISA)

⑩ブロッキング液 (1% blocking reagent / 0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5) を各well に200 μ l ずつ分注し、マイルドミキサーなどで30分ゆっくり攪拌する。

⑪ブロッキング液を捨て、anti-DIG-AP Fab fragments (Boehringer mannheim 社) をブロッキング液で10000倍希釈し、各well に200 μ l ずつ分注し、マイルドミキサーなどで30分ゆっくり攪拌する。

⑫洗浄液 (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3 % Tween 20; pH 7.5) 300 μ l で10分3回洗浄する。

⑬10 mg/10 ml のp-nitrophenylphosphate - 2Na を含む10% ジエタノールアミン緩衝液 pH 9.8 を各well に200 μ l ずつ分注し、湿室に入れて37℃2時間静置する。

⑭2時間後、発色を確認する。或いはマイクロプレートリーダーで波長405nm (A₄₀₅) の吸光値を測定しプラス/マイナスを判定する。

1- (2)、マイクロプレートハイブリダイゼーション操作の簡略化

果たしてPCR等による標的核酸の増幅なしに、検体試料中にわずかしかな存在しないであろうウイルス、ウイロイドの遺伝子をMPHだけで検出することが可能だろうか？まず、既にカンキツエクソコーティスウイロイド (CEVd) に感染していることを確認済みのエトログシトロンから抽出した核酸 (2 M LiCl 可溶性分画) を検定試料とし、DIG標識したCEVdのcRNAをプローブとして表1の手順でMPHを試みた。尚、CEVdのDIG標識cRNAプローブは、CEVdの全長cDNAを含むプラスミドpBS-CEV-4からDIG RNA labeling mixture (Boehringer mannheim 社) とT7 RNAポリメラーゼで転写反応を行ない作製した。

その結果、基質投入後 37℃ 2時間で、CEVd感染樹サンプルでは明瞭な黄色の発色が確認されたのに対し、CEVd非感染樹サンプルでは全く発色は確認されなかった。さらにプレートをそのまま室温に一晩放置したところ、CEVd感染樹サンプルの黄色はさらに濃くなったのに対し、CEVd非感染樹では依然として発色は全く認められず、プラス/マイナスの差は一層歴然となった。

予想以上にMPHの検出感度が優れていることが明らかになったが、ELISAと比較するとハイブリダイゼーションや洗浄等の操作が多く、試薬の組成もかなり複雑である。そこで次に「如何に検出感度を下げずに操作を省略できるか？」また「感度を保つに必要最低限の試薬はどこまでか？」に焦点を絞って、MPHの簡略化を試みた。尚、出来るだけ検出感度の優劣を正確に且つ定量的に評価するため、以下の試験の標的核酸にはプラスミドpBS-CEV-4からT3 RNAポリメラーゼでCEVdプラス鎖の全長に相当するRNAを転写し、分光光度計で紫外外部吸収を測り正確に定量したものを使用した。

「検体核酸を最も効率良くマイクロプレート表面に吸着させるにはどうしたらよいか？」植物ウイルスのほとんどはRNA型の遺伝子を有している。そこで一般的に行われている下記の①～④のRNA変性法で処理したCEVd転写物を同時に同一マイクロプレート上に処理した後、MPHを行った。即ち、

1、50 % formamide, 6.125 % formaldehyde, 1 X SSC 中で 68℃、15分

2、1 M glyoxal, 50 % dimethyl sulfoxide, 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 中で50℃、60分

3、10 X SSC, 1 mM EDTA (pH7.0) 中で100℃、5分

4、8 M urea 中で68℃、15分

の各条件で処理後、20 X SSC を20 μ l 加え、200 μ l の10 X SSC で希釈して検体原液とした。さらにこれを10X SSC で5倍段階希釈して5⁴倍希釈液まで作製し MPH を行った。その結果、# 1の処理をしたものだけが非常に強い黄色反応を示し、他の試料はほとんど発色しなかった。マイクロプレートリーダで発色を測定しグラフにしたものを図1に示した。さらに、ホルムアルデヒドの影響を調べるためにホルムアルデヒド濃度のみを上記の半分、1/4、0と減らしてMPHを行った。その結果、ホルムアルデヒドを希釈するほど発色が弱くなりホルムアルデヒド濃度がゼロではほとんど発色せず、核酸のプレートへの吸着に及ぼすホルムアルデヒドの効果は大変大きいことが分かった。

「プレハイブリダイゼーションは省略できる」メンブレンハイブリダイゼーション法では、プレハイブリダイゼーションは大変重要な操作で、省略するとバックグラウンドが高くなり、時として判定が困難なことがある。ところが図2に示すように、MPHではプレハイブリダイゼーションを省略しても検出感度及びバックグラウンドの強さに全く影響はなく、従ってプレハイブリダイゼーションは不用であった。

「リボヌクレアーゼ処理も省略できる」プレハイブリダイゼーション同様、メンブレンハイブリダイゼーション法では RNaseA 処理が大変効果的で、プローブの非特異的吸着を抑えてバックグラウンドを低下させるだけでなく、検体試料中の標的核酸以外の核酸との非特異的結合による偽陽性反応の出現を阻止し、

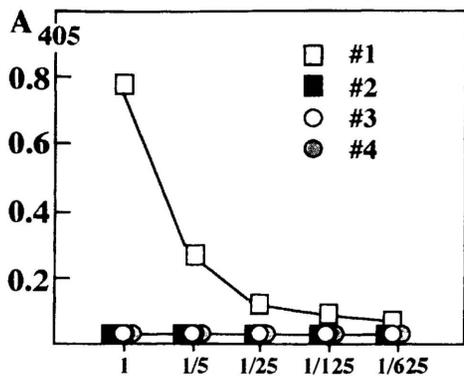


図 1、試料変性方法の検討

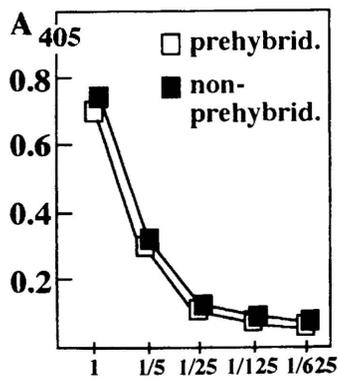


図 2、プレハイブリダイゼーションの必要性の検討

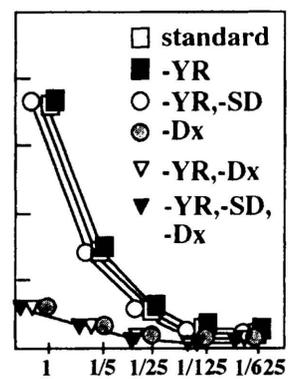
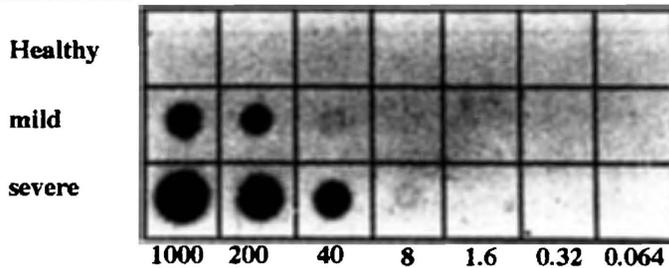


図 3、ハイブリダイゼーション溶液の組成の検討

Membrane



Plate

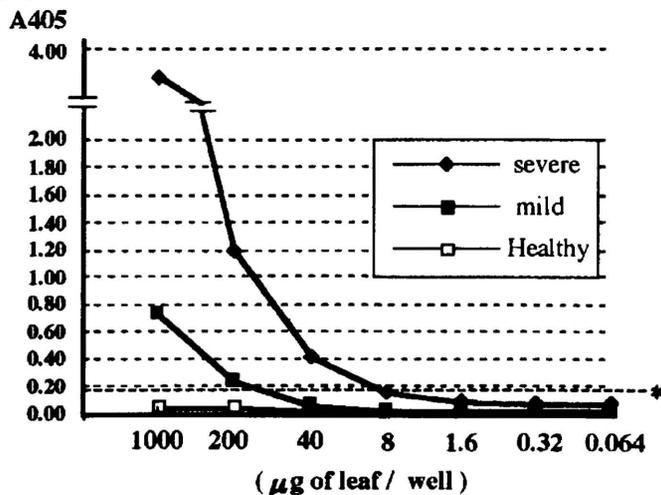


図 4、MPHとメンブレンハイブリダイゼーションの比較

反応の特異性を高め、診断の信頼性を大きく向上させる。しかしMPHではRNaseA処理を省略しても非特異的反応は全く観察されないことから、この処理は省略しても差し支えないと判断された。また、ハイブリダイゼーション後の洗浄操作表1②の65℃に温めた0.1X SSC・0.1X SDS 200 μlの洗浄も2回行う必要はなく、1回で充分であった。

「ハイブリダイゼーション液に無駄なものは入っていないか？」メンブレンハイブリダイゼーション法では、ハイブリダイゼーション速度を早めるためデキストラン硫酸ナトリウム(10%)、プローブのメンブレンへの非特異的吸着をブロッキングするため酵母tRNAとサケ精子DNAが添加してある。いずれも検出感度を高め、バックグラウンドを下げるのに必須の成分である。MPHでもこれらの添加が必要かどうかを確認するため、以下の①~⑥のようにいずれかを抜いてMPHを行いその影響を調べた。

処理区	デキストラン硫酸ナトリウム	酵母tRNA	サケ精子DNA
① □	添加	添加	添加
② ■	添加	無	添加
③ ○	添加	無	無
④ ●	無	添加	添加
⑤ ▽	無	無	添加
⑥ ▼	無	無	無

その結果図3に示したように、①②③の3つは全く同様に強い発色を示したが、④⑤⑥の3つは非常に発色が弱かった。つまり、MPHではデキストラン硫酸ナトリウムのみが必須であり、酵母tRNAとサケ精子DNAは省いて差し支えないことがわかった。

デキストラン硫酸ナトリウムはMPHでも検出感度に非常に強い影響を持つ事が明らかになったが、10%という濃度は粘性が強く非常に扱いにくい。そこでどこまで感度を落とさずに濃度を下げることができるか、5%と2%で検討した。その結果2%では明らかに発色が弱くなるものの、通常の半分濃度の5%程度ではほとんど感度の低下は見られないことが解った。取り扱いやすさを考慮して5%が妥当と思われる。

「簡略型MPHプロトコールと今後さらに改良を必要とする点」上述のようにMPHではメンブレンハイブリダイゼーションに比べかなりの操作を省略可能で、試薬の種類もかなり減らすことが可能であった。以上の結果を反映させて、最終的にMPHを表2のように簡略化した。メンブレンハイブリダイゼーション法と比べ、プレハイブリダイゼーションやRNaseA処理を省き、洗浄の時間を短くしたことで検定に要する時間を短縮した。また効果の無い試薬を省き使用する試薬の種類を減らすことで検定経費を削減した。

これでMPHをほぼELISA並のレベルまで簡略化するという初期の目標はある程度達成されたものと考えられる。しかし、まだハイブリダイゼーションを行った後さらにELISAを行わなくてはならないような感があり、実用化に向けてはさらに改良が必要である。現在プローブをDIGではなく、直接アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識し、ハイブリダイゼーション後すぐに発色反応させる方法を検討している。また現在一晩行っているハイブリダイゼーションの時間を短縮することも可能と思われる。ハイブリダイゼーション後の洗浄も2X SSC 5分3回だけで充分かもしれない。朝に検体をプレートに入れて、夕方結果を見ることも充分可能になるであろう。

表2、マイクロプレートハイブリダイゼーション法 (MPH) プロトコール
(簡略型)

1、検体試料の変性処理

①変性液 (50% formamide, 6.125% formaldehyde, 1X SSC) 中で試料核酸を68℃、15分間加熱変性する (反応系20 μ l)。

2、核酸のマイクロプレートへの吸着

②等量 (20 μ l) の20X SSC を加え、さらに必要に応じて10X SSC で希釈後、1 well 当り 200 μ l ずつ入れて37℃で2時間静置する。このとき液が蒸発しないように上下を空のプレート等ではさみ、小さな湿室に置いておく。この段階で核酸がプレート表面に吸着する。

③検体液を捨て、洗浄液 (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3 % Tween 20; pH 7.5) 300 μ l で5分3回洗浄する。

3、ハイブリダイゼーション

④ハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide, 5 % dextran sulfate, 0.1% SDS, 0.18 M NaCl, 20 mM sodium cacodylate, 1mM EDTA) にDIG - RNAプローブ (1 μ l プローブ/10 ml ハイブリダイゼーション溶液) を加え、1 well 当り200 μ l ずつ分注する。マイクロプレートに蓋をして55℃で1晩静置する。

4、洗浄

⑤ハイブリダイゼーション溶液を捨て、2X SSC 300 μ l で5分3回洗浄する。

⑥65℃に温めた 0.1X SSC - 0.1% SDS 300 μ l で5分1回洗浄する。

5、検出反応 (DIG - ELISA)

⑦ブロッキング液 (1% blocking reagent / 0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5) を各well に200 μ l ずつ分注し、マイルドミキサーなどで30分ゆっくり攪拌する。

⑧ブロッキング液を捨て、anti - DIG - AP Fab fragments (Boehringer mannheim 社) をブロッキング液で10000倍希釈したものを各well に200 μ l ずつ分注し、マイルドミキサーなどで30分ゆっくり攪拌する。

⑨抗体液を捨て、洗浄液 300 μ l で5分3回洗浄する。

⑩10 mg/10 ml のp-nitrophenylphosphate - 2Na を含む10% ジエタノールアミン緩衝液 pH 9.8 を各well に200 μ l ずつ分注し、湿室に入れて37℃2時間静置する。

⑪2時間後、発色を確認する。或いはマイクロプレートリーダーで波長405nm (A_{405}) の吸光値を測定しプラス/マイナスを判定する。