

1 カリジノゲナーゼ

2 純度試験(2)を次のように改める。

3 純度試験

4 (2) キニナーゼ

- 5 (i) ブラジキニン溶液 ブラジキニンの適量を取り、pH
6 7.4のゼラチン・リン酸塩緩衝液に溶かし、1 mL中にブラジ
7 キニン0.200 µgを含む液を調製する。
- 8 (ii) カリジノゲナーゼ溶液 本品の表示単位に従い、その
9 適量を精密に量り、pH 7.4のゼラチン・リン酸塩緩衝液に
10 溶かし、1 mL中にカリジノゲナーゼ1単位を含む液を調製す
11 る。
- 12 (iii) 試料溶液 ブラジキニン溶液0.5 mLを正確に量り、
13 30±0.5℃で5分間加熱し、あらかじめ30±0.5℃で5分間加
14 温したカリジノゲナーゼ溶液0.5 mLを正確に加え、直ちに
15 振り混ぜる。この液を30.0±0.5℃で正確に150秒間放置し
16 た後、トリクロロ酢酸溶液(1→5) 0.2 mLを正確に加えて振
17 り混ぜる。3分間煮沸し、直ちに氷冷した後、遠心分離し、
18 室温で15分間放置する。上澄液0.5 mLを正確に量り、pH
19 8.0のゼラチン・トリス緩衝液0.5 mLを正確に加えて振り混
20 ぜる。この液0.1 mLを正確に量り、トリクロロ酢酸・ゼラ
21 チン・トリス緩衝液0.9 mLを正確に加えて振り混ぜ、更に
22 0.2 mLを正確に量り、トリクロロ酢酸・ゼラチン・トリス
23 緩衝液0.6 mLを正確に加えて振り混ぜ、試料溶液とする。
- 24 (iv) 対照溶液 pH 7.4のゼラチン・リン酸塩緩衝液0.5 mL
25 につき(iii)と同様に操作して対照溶液とする。
- 26 (v) 操作法 抗ウサギ抗体を結合させた96ウェルマイクロ
27 プレーートのウェルに抗ブラジキニン抗体試液0.1 mLを加え、
28 振り混ぜた後、25℃付近の一定温度で1時間放置する。抗ブ
29 ラジキニン抗体試液を除き、マイクロプレート洗浄用リン酸
30 塩緩衝液0.3 mLを加えて除く。これを3回繰り返す。液をよく
31 除いた後、試料溶液及び対照溶液100 µLとpH 7.0のゼラ
32 チン・リン酸塩緩衝液50 µLを加え、振り混ぜた後、25℃付
33 近の一定温度で1時間放置する。次にペルオキシダーゼ標識
34 ブラジキニン試液50 µLを加え、振り混ぜた後、冷所で一晚
35 放置する。反応液を除き、マイクロプレート洗浄用リン酸塩
36 緩衝液0.3 mLを加えて除く。これを4回繰り返す。液をよく
37 除いた後、ペルオキシダーゼ測定用基質液100 µLを加え、
38 25℃付近の一定温度で遮光して正確に30分間放置した後、
39 薄めた硫酸(23→500) 100 µLを加え、振り混ぜた後、波長
40 490 ~ 492 nmにおける吸光度を測定する。別に、ブラジキ
41 ニンの適量を取り、pH 7.0のゼラチン・リン酸塩緩衝液に
42 溶かし、1 mL中に正確に100 ng, 25 ng, 6.25 ng, 1.56 ng,
43 0.39 ng, 0.098 ngを含む液を調製し、それぞれ標準溶液(1),
44 標準溶液(2), 標準溶液(3), 標準溶液(4), 標準溶液(5), 標準
45 溶液(6)とする。また、pH 7.0のゼラチン・リン酸塩緩衝液1
46 mLを標準溶液(7)とする。ウェルにそれぞれの標準溶液50
47 µLとトリクロロ酢酸・ゼラチン・トリス緩衝液100 µLを加
48 え、以下試料溶液及び対照溶液と同様に操作する。
- 49 標準溶液のブラジキニン量と吸光度から検量線を作成し、
50 試料溶液及び対照溶液のブラジキニン量 B_T (pg)及び B_S (pg)
51 を求める。
- 52 なお、この試験の吸光度測定には、通例、マイクロプレー

53 ト用の分光光度計を用いる。ウェルが吸光度測定セルとな
54 るので、汚れ、傷に注意する。また、層長はウェルの液量に
55 よって変動するため、正確な一定量の液をウェルに加える。
56 (vi) 判定 次式により R の値を求めるとき R の値は0.8以上
57 である。

$$58 \quad R = B_T / B_S$$