

蛋白質分子の分析法

ー ELISA、迅速検査、ウェスタン・ブロット ー

<https://l-hospitalier.github.io>

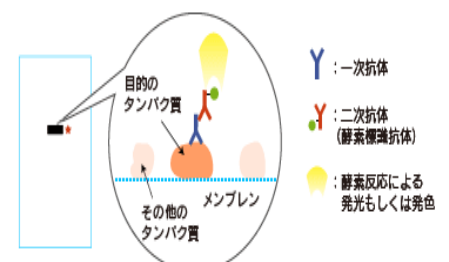
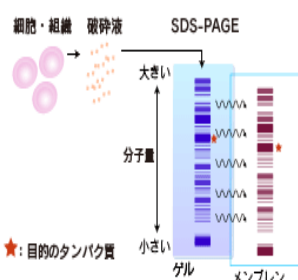
2018.10

現在インフルなどで臨床使用される迅速検査は【ELISA】(Enzyme - Linked Immunosorbent Assay エライザ、酵素結合免疫吸着法、別名酵素免疫測定法 EIA Enzyme Immunoassay) に近い方法を使う。ELISA では伝統的に 12 x 8 の 96 ウェル・マイクロプレート^{*1} (ポリエチレン/ポリプロピレン/ポリスチレン製) を使用。直接法、間接法、サンドウィッチ法などあるが、直接法は適切なマイクロプレートに抗体蛋白質を固相化 (咽頭ぬぐい液や大便などをプレートに吸着させる。4℃で 18 時間)。マイクロプレートに固着する力は共有結合や疎水の相互作用 (物理的吸着) (プレート材質に注意)。洗浄を行いブロッキング・バッファー (スキムミルクなど) でプレート表面の目的蛋白が吸着しなかった部分に小型の蛋白を非特異的に吸着させる (37℃、1 時間)。これで抗体が目的蛋白以外の場所のマイクロプレート表面に結合して起きるバックグラウンド発色を阻止。抗体が吸着したプレートに倍数希釈した検体の抗原蛋白溶液を注入すると抗体蛋白と反応する抗原 (ウイルスや菌表面の蛋白など) が結合し固定される。これに酵素標識抗体を加えれば酵素活性を持つ免疫複合体が目的蛋白と結合する。この酵素により発色する色素基質を追加すれば発色、マイクロプレート・リーダー (右上図) で読み取れる。以上が ELISA 直接法の概要。インフル、ノロやデフィシル菌の迅速検査はこの原理に似た【固相イムノクロマトグラフィー】が主流。イムノクロマトはアフィニティ・クロマトの一種でカラム内の担体に検出しようとする蛋白に発色酵素を結合した抗体複合体を固定しておく (担体は非特異的結合を防ぐためにブロッキング処理)。これに抗原の目的蛋白、例えばノロやデフィシル (の表面蛋白) を含む溶液を流せば目的抗原が担体上の酵素複合抗体と結合、固定。これを色素基質で発色させる。ノロやデフィシル検出キット^{*2}を使用する場合は紙おむつに排泄された下痢便に吸水性ポリマーが混入すると試料が酵素複合抗体と結合する前に吸水性ポリマーが非免疫的に結合し、抗原結合部 (抗体) をブロッキングする。グリセリンも同様の効果? また大便中のポリカーボフィルカルシウム (ポリフル/コロネル) など分解されず排泄される吸水性分子もブロッキングを起す? 本来のクロマトは溶媒を変えて担体と結合した目的蛋白を洗い出しフラクションコレクターで回収、溶液を発色させて吸光度測定するが、固相イムノクロマトは発色の有無で判定。【病棟で施行する検査】結核菌 PCR では阻害物質はヘパリンと血痰 (完全溶血すれば OK?)。痰吸引で血液混入がある場合は同時にインヒビション・コントロール PCR (検体と結核菌 DNA を混ぜたもの) を施行し検体中の混入物質が PCR を阻害しないことを確かめる。One-step PCR Inhibitor Removal Kit (Funakoshi) など阻害因子除去セットの臨床使用不許可されていない。PCR 陰性は安全を保証しない。MGIT 法や T-spot 併用【ウェスタン・ブロット^{*3}】

SDS-PAGE^{*4} Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis ポリアクリルアミドゲル電気泳動で蛋白を分子量と荷電で分離。転写バッファー中でニトロセルロースフィルムと接触させ、電圧をかけて転写。この膜上の蛋白を 1 次抗体と反応させる。洗浄後酵素標識 2 次抗体を結合させ基質色素を加えて発色。

タンパク質を電気泳動で分離、メンブレンに吸着

抗体反応、酵素反応で目的タンパク質を検出



^{*1}1950 年ハンガリーのギュロ・トカーツイが始めた 12 x 8 列のアクリルプレートが始まり。今は 9600 ウェルもある。
^{*2}密閉してあっても検体 (低温で 72 時間有効) は冷蔵庫保存しない (芽胞形成) ! ^{*3}エドウィン・サザンによる DNA 同定法。蛋白に応用したのがジョークでウェスタン・ブロット。英語ではサザンは大文字、他は小文字で始める。
^{*4}SDS は蛋白変性作用の強い界面活性剤。メルカプトエタノール存在下でジスルフィド結合が切断され蛋白は直線状ペプチドに分解されてペプチド長に応じた陰電荷を持つ。

