Western blot 法を用いたたんぱく質の特異的高感度検出について

１．はじめに

アレルゲンや BSE の異常プリオン等が食品に極微量でも混入していないかを調べる方法に、ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法と Western blot (WB)法があります。どちらも、検出したいたんぱく質（標的たんぱく質)と特異的に結合する抗体を用いて、標的たんぱく質だけを高感度に検出する方法です。ELISA 法については当ニュース No.75 で解説していますので、ここでは WB 法についてご紹介します。

２．Western blot 法とは

WB 法は、電気泳動の分離能と抗体反応の特異性を組み合わせた手法です。WB 法では、最初に電気泳動 (SDS-PAGE、等電点電気泳動、二次元電気泳動等)が行われます。各々の電気泳動の分離原理に基づいて高分子ゲル内で試料中のたんぱく質を分離します。分離後、ゲル中のたんぱく質をニトロセルロースやポリフッ化ビニリデン等の膜に電気的に転写 (ブロット)します。次に、転写膜に抗体を接触させて抗体反応をさせます (**図 1**)。抗体反応では、目的のたんぱく質に結合する一次抗体と、一次抗体に結合する抗体に標識をつけた二次抗体の二種類の抗体が用いられます。

ELISA 法は、一度に多数の試料を取り扱うことができ、定量性にも優れています。一方、WB 法は電気泳動や転写作業があるために手間や時間がかかりますが、標的たんぱく質の検出だけでなく、その特性 (大きさや等電点等)の情報も得ることができます。このため、ELISA 法よりも特異性が高いとされています。食物アレルゲン (卵、乳)、BSE、HIV の検査では、一次スクリーニングの ELISA 法で陽性になると、WB 法による確認試験が行われます。

WB 法は、生命科学や食品科学等の分野においてたんぱく質の機能解析や動態を研究するための重要な手法として用いられています。

３．Western blot 法による醸造滓の解析

当センターでは、みりんや溜醤油等の加熱 (火入れ)滓生成機構について研究を進めています (当ニュース No.124)。みりんや溜醤油中のたんぱく質の加熱による挙動を抗 α-amylase (Amy) 抗体を用いて解析したところ、みりんを加熱すると Amy が滓に全て移行するのに対し、溜醤油では加熱上清にも残存しました (**図 2**)。さらに、加熱に伴い Amy が分解する可能性が示唆されるなど、興味深い結果も得られています。

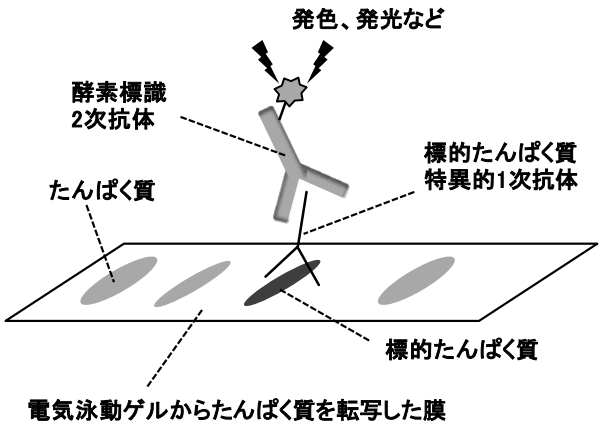

図 1　WB 法の原理

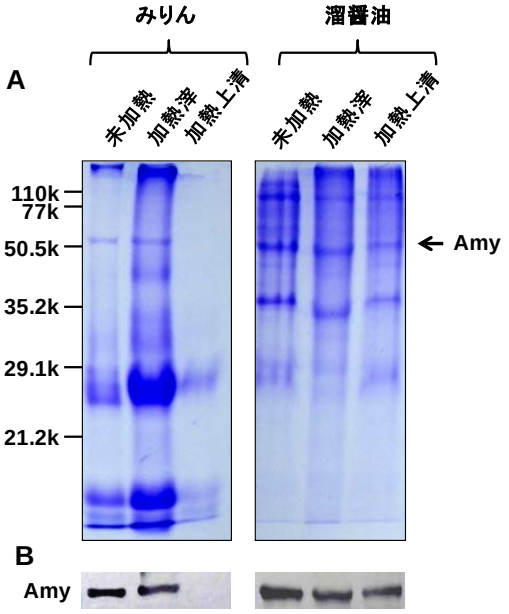

図 2　みりんと溜醤油の加熱滓たんぱく質の解析
(A) CBB 染色, (B) 抗 Amy 抗体を用いた WB 解析

食品工業技術センター　分析加工技術室　近藤徹弥（052-521-9316）
研究テーマ：微生物や酵素を活用した生物資源の機能開拓や機能評価法の開発
指導分野：微生物一般、食品包装、生物工学