

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-246393

(P2011-246393A)

(43) 公開日 平成23年12月8日(2011.12.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/16 (2006.01)	C07K 16/16 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B064
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 Q	4H045
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2010-121244 (P2010-121244)
 (22) 出願日 平成22年5月27日 (2010.5.27)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成21年12月5日 日本食品科学工学会東北支部発行の「日本食品科学工学会 平成21年度東北支部大会市民フォーラム講演要旨集」に発表

(71) 出願人 501203344
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
 茨城県つくば市観音台3-1-1

(74) 代理人 100086221
 弁理士 矢野 裕也

(72) 発明者 老田 茂
 岩手県盛岡市下厨川字赤平4 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター内

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA31 BA47 CA02
 4B064 AG27 CA10 CA20 CE12 DA13
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA32
 DA76 EA50 FA72 GA26

(54) 【発明の名称】 小麦α-アミラーゼインヒビターに結合する抗ペプチド抗体及びそれを用いた小麦アレルゲンの検査方法

(57) 【要約】

【課題】 小麦 - アミラーゼインヒビター (AI) のうち、単量体および二量体のエピトープに結合する抗ペプチド抗体を作製し、単量体および二量体小麦 - AIのエピトープの検出・定量法を開発すること。

【解決手段】 単量体および二量体小麦 - AIのエピトープを含むアミノ酸13個で構成されるペプチドを抗原に用いて作製した抗ペプチド抗体、これを用いて免疫反応を行なうことを特徴とする小麦アレルゲンの検査方法、及び前記抗体を含有するアレルゲン検査キットを提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗小麦 - アミラーゼインヒビター抗体。

【請求項 2】

請求項 1 記載の抗体を用いて免疫反応を行なうことを特徴とする小麦アレルゲンに内在するエピトープの検査方法。

【請求項 3】

請求項 1 記載の抗体を含有するアレルゲン検査用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、小麦アレルゲンとして報告されている単量体および二量体小麦 - アミラーゼインヒビター（以下、 - AI という。）のエピトープの特異的検出に関する。

【背景技術】

【0002】

小麦は主要な食物アレルギーの原因食品の一つでもあり、アレルゲンタンパク質としてグリアジンや - AI 等が報告されている（非特許文献 1 ~ 4 参照）。小麦アレルゲンの検出方法は、現在は主に難水溶性アレルゲンのグリアジンを対象としているが、易水溶性アレルゲンである - AI を対象にしていない。

【0003】

小麦 - AI には、分子量が 13 ~ 15kDa のサブユニットで構成される単量体 (0.28 型)、二量体 (0.19 型および 0.53 型)、四量体 (CM1 ~ 3、CM16、CM17 型) 等が知られている（非特許文献 5、6 参照）。

【0004】

0.53 型の二量体小麦 - AI に対するモノクローナル抗体（特許文献 1 参照）、および小麦 - AI に対する抗体を用いる小麦 - AI の定量方法はすでに報告されているが（特許文献 2 参照）、単量体および 0.19 型二量体の小麦 - AI に対する抗体は、未だ見出されていない。

【0005】

一般にアレルゲンタンパク質は、そのすべての構成アミノ酸がアレルギー反応に関与しているわけではなく、一部のアミノ酸配列がヒトのアレルギー反応に関与する抗体と特異的に結合することが知られており、その部分アミノ酸配列はエピトープと呼ばれている（非特許文献 7 参照）。

【0006】

しかし、特許文献 1 および 2 で用いられる抗体は、小麦 - AI 全体を抗原として得られたものであり、小麦 - AI のエピトープに対して特異的に結合しているわけではないと考えられる。しかも、特許文献 2 の小麦 - AI の定量方法は、アレルゲンの検出を目的としておらず、小麦 - AI 含有量が多い小麦粉の選択を目的としている。 - AI 含有量が多いと、小麦種子に内在する - アミラーゼ活性が抑制されるため、アミロ粘度が高く各種食品加工に適した小麦粉が得られるとのことである。

【0007】

また、小麦 - AI のうち、特に二量体が動物腭液の - アミラーゼを阻害し（特許文献 3 参照）、内臓脂肪蓄積抑制効果を有することから（特許文献 4 参照）、二量体 - AI を添加した麺類（特許文献 5 参照）等の加工食品が知られているが、逆に - AI を含まない小麦粉や小麦加工食品は未だ報告されていない。

【0008】

一方、小麦粉を微生物由来のプロテアーゼで処理すると、小麦アレルギー患者の血清との反応性が低下するが（非特許文献 8 参照）、それが - AI のエピトープ分解によるものかどうか未だ不明である。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特公平05-032034号公報

【特許文献2】特開昭63-247661号公報

【特許文献3】特許第3504719号明細書

【特許文献4】特許第3999825号明細書

【特許文献5】特許第3526361号明細書

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Armentia et al., Clin. Exp. Allergy, 23, p.410-415 (1993).

【非特許文献2】Sandiford et al., Clin. Exp. Allergy, 27, p.1120-1129 (1997).

【非特許文献3】Palosuo et al., Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 3, p.205-209 (2003).

【非特許文献4】Pastorello et al., Int. Arch. Allergy Immunol., 144, p.10-22 (2007).

【非特許文献5】Sanchez-Monge et al., Theor. Appl. Genet. 72, p.108-113 (1986).

【非特許文献6】Gomez et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, p.3242-3246 (1989)

【非特許文献7】Walsh and Howden, J. Immunol. Methods, 121, p.275-280 (1989).

【非特許文献8】Watanabe et al., Biosci. Biotech. Biochem., 58, p.388-390 (1994)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

一般的に、食品加工の過程でアレルゲンタンパク質が部分分解されている場合でも、エピトープが分解されていなければ、ヒトのアレルギー反応に關与する抗体が結合するため、アレルギー反応性が残存している可能性がある。しかし、アレルゲンタンパク質全体を抗原として得られた抗体は、アレルゲンのエピトープ以外の部位に結合する確率が高いため、その抗体を用いて加工食品に含まれるアレルゲンの検出・定量を行った場合に、陰性を示す恐れがある。

【0012】

そこで、本発明は、単量体および二量体の小麦 - AIエピトープに特異的な抗ペプチド抗体を作製し、その抗体を用いて、より高精度なアレルゲンの検査法と検査キットを開発することを目的とする。さらに、その検査法や検査キットを用いることによって、小麦アレルギー発症リスクが低い小麦粉およびその加工食品を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

小麦単量体 - AIのエピトープとして報告されているAVLRDC (配列番号1、37番~42番アミノ酸)は(非特許文献7参照)、小麦二量体 - AIにも含まれることから、本発明者は、このアミノ酸配列を含むアミノ酸13個で構成されるペプチドを合成し、これをキャリアタンパク質に結合させたものを動物に投与することにより、小麦の単量体と二量体の - AIのエピトープに対して特異性が極めて高い抗体を得た。

【0014】

本抗体を用いて免疫反応を行うことにより、アレルゲンタンパク質のうち、ヒトのアレルギー反応に關与する抗体が結合する部位を特異的に検出・定量することが可能となり、アレルゲン検出の精度を高めることができる。

【0015】

さらに、小麦粉を微生物由来各種プロテアーゼ処理したものについて、本抗体による - AIの検出・定量検査を行うことにより、 - AIのエピトープの分解が確認され、アレル

10

20

30

40

50

ゲンエピトープが少ない小麦粉およびその加工食品の提供が可能となり、本発明を完成するに至った。

【0016】

すなわち、本願請求項1に係る本発明は、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗小麦 - アミラーゼインヒビター抗体である。

本願請求項2に係る本発明は、請求項1記載の抗体を用いて免疫反応を行うことを特徴とする、小麦アレルゲンに内在するエピトープの検査方法である。

本願請求項3に係る本発明は、請求項1記載の抗体を含有するアレルゲン検査用キットである。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、小麦アレルゲンの一種である - AIのうち、単量体と二量体のエピトープと特異的に結合する抗ペプチド抗体が初めて提供される。これにより、アレルゲンとしての単量体と二量体の小麦 - AIの高精度な検出・定量が可能となった。

【0018】

さらに、本発明のアレルゲンエピトープ検査法および検査キットを用いることにより、単量体と二量体の小麦 - AIのエピトープをほとんど含まず、小麦 - AIによるアレルギー発症リスクが低い小麦粉およびその加工食品の提供が可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】小麦種子抽出物のイムノブロッティングの結果を示す。図1中、Aは銀染色、Bは抗小麦 - AIエピトープペプチドIgGを用いた抗体反応（化学発光）の結果である。

【図2】小麦抽出物中に含まれる小麦 - AIエピトープをエライザ法により定量した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明で用いる抗小麦 - AI抗体は、例えば次のようにして調製することができる。

小麦単量体 - AIのエピトープとして報告されているAVLRDC（配列番号1、アミノ酸番号37～42番）（非特許文献7参照）を含む各種小麦 - AIのアミノ酸配列を比較し（表1）、抗体の出来易さを考慮した結果、二量体の30番～42番アミノ酸13個からなるペプチド（配列番号2：NGSQVPEAVLRDC）が、単量体と二量体の小麦 - AIエピトープに対するペプチド抗原として適していることが見出された。

【0021】

【表1】

小麦 α -AIのアミノ酸配列比較														
名称	型	アミノ酸配列番号(単量体を基準)												
		30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
0.28	単量体	V	G	S	Q	V	P	E	A	V	L	R	D	C
0.19	二量体	N	G	S	Q	V	P	E	A	V	L	R	D	C
0.53	二量体	N	G	S	Q	V	P	E	A	V	L	R	D	C
CM1	四量体	G	I	S	I	S	G	S	A	V	S	T	E	P
CM2	四量体	G	V	G	I	V	G	S	P	V	S	T	E	P
CM3	四量体	G	T	F	T	P	G	S	K	L	P	E	W	M
CM16	四量体	R	I	E	T	P	G	S	P	Y	L	A	K	Q
CM17	四量体	R	I	E	M	P	G	P	P	Y	L	A	K	Q

10

20

30

40

50

網掛け：共通配列

なお、表中のアミノ酸配列情報は、Sanchez-Monge, et al., Eur. J. Biochem., 183, p.37-40 (1989).より引用。

【0022】

上記で選定した配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる抗原ペプチドを、全自動ペプチド合成機で合成した後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等で精製する。これをマレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド等の架橋剤を用いて、キャリアタンパク質と結合させ、免疫抗原とする。キャリアタンパク質の具体例としては、貝ヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミン等が挙げられる。

10

【0023】

次いで、免疫抗原をアジュバントとよく混合して、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、トリ、ウマ等の動物に投与する。ウサギに投与する場合は、1週間以上の間隔を空けて3回以上行い、最初の投与から4週間以上後に全採血を行い、抗血清を得る。さらに、この抗血清から、硫酸塩析やプロテイン-Aカラム等により精製し、抗小麦-AIエピトープペプチド抗体を得ることができる。

【0024】

モノクローナル抗体の場合は、動物に免疫抗原を投与してポリクローナル抗体を得る代わりに、免疫抗原をマウスに免疫し、抗小麦-AIエピトープ抗体を産生しているリンパ球として例えばマウス脾臓細胞と、ミエローマ細胞とをポリエチレングリコール存在下に細胞融合させ、ハイブリドーマを得る。この中より、小麦-AIエピトープに対する抗体を産生する細胞をスクリーニングし、その細胞を培養することによって、抗小麦-AIエピトープモノクローナル抗体を得ることができる。

20

【0025】

以上のようにして作製した抗体の抗体価の検定は、酵素免疫測定（エライザ）法によって行なうことができる。

すなわち、キャリアタンパク質と結合していない所定量の上記抗原ペプチドを固相化したプレートのウェルに、抗小麦-AIエピトープ抗体（一次抗体）溶液を添加して反応させる。次に、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素などで標識した、一次抗体を抗原として認識する二次抗体溶液をウェルに添加して反応させる。ウェルを洗浄後、標識酵素の基質を添加して酵素反応を行い呈色させ、吸光度の測定値から抗体価を算出する。

30

【0026】

なお、抗原に用いた配列番号2のペプチドのN末端アミノ酸は、単量体-AIでは、N（アスパラギン）ではなくV（バリン）であるが、抗体との結合性は、配列番号2のペプチドと単量体-AIの部分ペプチドであるVGSQVPEAVLRDC（配列番号3）の間に差はない。一方、四量体-AIの一種であるCM16の部分ペプチドCRIETPGSPYLAKQQ（配列番号4）に対する抗ペプチド抗体が報告されているが（老田、第60回日本生物工学会大会講演要旨、p.177（2008）.参照）、本発明の抗原に用いた配列番号2のペプチドとアミノ酸配列が大きく異なるため、抗CM16ペプチド抗体は、単量体および二量体の小麦-AIエピトープには結合しない。

40

【0027】

また、配列番号2のN末端以外のアミノ酸1～3個が別アミノ酸に置換されているペプチドを抗原に用いた場合、配列番号2よりも構成アミノ酸の数が1～3個少ないか、もしくは1～3個多いペプチドを抗原に用いた場合でも、得られた抗体が、単量体および二量体の小麦-AIエピトープであるAVLRDC（配列番号1）に結合する性質を有していれば、本発明に含まれる。

【0028】

以上のようにして作製した本発明の抗体を用いる小麦アレルギー（単量体及び二量体小麦-AI）のエピトープの検査は、免疫反応を利用して、酵素免疫測定（エライザ）法や

50

イムノプロット法などの常法によって行うことができる。被検試料としては、小麦を含有するものであれば良く、例えば醤油、味噌などの調味料、ビールなどの酒類、麺類、クッキーなどの菓子類といった、小麦を原料とする発酵・加工食品を使用することができる。

【0029】

エライザ法の場合、本発明の検査は例えば次のようにして行われる。

被検試料の抽出物をマイクロプレートのウェルに添加して一定時間静置後、本発明の抗小麦 - AIエピトープペプチド抗体（一次抗体）溶液を添加して反応させる。次に、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素などで標識した、一次抗体を抗原として認識する二次抗体溶液をウェルに添加して反応させる。ウェルを洗浄後、標識酵素の基質を添加して酵素反応を行い、呈色または発光させ、それらの測定値から - AIエピトープ量を算出する。

10

【0030】

なお、上記において、酵素の代わりに蛍光色素を用いて二次抗体を標識することもできる。蛍光色素の場合は、励起波長を当てて生じる蛍光を測定すればよい。さらに、一次抗体を直接ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素などで標識すれば、二次抗体を用いることなく、小麦 - AIエピトープ量を測定することができる。

【0031】

また、マイクロプレートのウェルに、小麦 - AIや小麦 - AIエピトープペプチドを固定化しておき、あらかじめ被検試料の抽出物と混合しておいた一次抗体を反応させる、競合エライザ法で検査することもできる。

20

【0032】

イムノプロット法の場合、本発明の検査は例えば次のようにして行なわれる。

被検試料の抽出物を、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）- ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）で展開後、ゲル中のタンパク質をポリフッ化ビニリデン（PVDF）やニトロセルロースなどの膜へ転写する。次に、その膜を本発明の抗 - AIエピトープペプチド抗体（一次抗体）と反応させた後、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した、一次抗体を抗原として認識する二次抗体溶液に浸漬し、一次抗体と二次抗体を結合させる。さらに、その膜を洗浄した後、標識酵素の基質を添加して酵素反応を行ない、呈色または発光させ、小麦 - AIエピトープを包含するタンパク質を検出する。

30

【0033】

なお、上記において、酵素の代わりに蛍光色素を用いて二次抗体を標識することもできる。蛍光色素の場合は、励起波長を当てて生じる蛍光を検出すればよい。さらに、一次抗体を直接ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素などで標識すれば、二次抗体を用いることなく、小麦 - AIエピトープを検出することができる。

【0034】

以上に説明した本発明の小麦アレルギーの検査方法は、本発明の抗小麦 - AIエピトープペプチド抗体を含有するアレルギー検査用キットを用いて容易に実施することができる。このアレルギー検査用キットには、本発明の抗小麦 - AIエピトープペプチド抗体の他に、標識した二次抗体や適切な酵素基質、洗浄用の緩衝液、ブロッキング用試薬などが含まれていても良い。

40

【実施例】

【0035】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

【0036】

（小麦抽出物の調製とタンパク質の定量法）

以下の実施例において、小麦抽出物と - AI画分の調製は以下のように行なった。

小麦（品種名「ゆきちから」）の全粒粉に5倍量（重量比）の0.5M食塩水を加えて懸濁し、4 で1時間静置後の遠心（10,000 × g、5分間）上清を小麦抽出物とした。小麦抽出物に含まれるタンパク質は、DCプロテインアッセイ（バイオラッド社）、および標準タンパク質にウシ血清アルブミンを用いて定量した。

50

【0037】

(タンパク質電気泳動法とイムノプロット法)

以下の実施例において、タンパク質電気泳動法は以下のように行なった。

試料を等容量の「トリスSDS - MEサンプル処理液」(コスモバイオ社)と混合後、95℃で5分間熱処理してから、10~20%アクリルアミドゲル(オリエンタルインスツルメンツ社)、0.1%SDSを含む192mMトリス-25mMグリシンバッファーを用いて電気泳動し、「2D-銀染色試薬・II」(コスモバイオ社)によりタンパク質を染色検出した。

【0038】

以下の実施例において、イムノプロット法は以下のように行なった。

アトー社のマニュアルに従い、セミドライトランスファー装置(アトー社)を用いて、SDS-PAGEゲルからタンパク質をPVDF膜(アトー社)へ転写した。このPVDF膜を25mMトリス-塩酸緩衝液+0.15M食塩+0.1%Tween-20(TTBS)で10倍希釈したEzBlock(アトー社、ブロッキング液)に浸して、室温で30分間ゆっくり振とうしてブロッキング反応を行い、次にブロッキング液で1,000倍希釈した抗-AIエピトープペプチド抗体溶液に室温で1時間浸した。さらにこのPVDF膜を、TTBSによる洗浄後に、ブロッキング液で3,000倍もしくは5,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG(免疫動物:ヒツジ、GEヘルスケアバイオサイエンス社)溶液に室温で1時間浸した。このPVDF膜を再度洗浄した後、EzWestBlue(アトー社)、SuperSignal West Femto(PIERCE社)、およびCCDカメラ内蔵のイメージングアナライザー-LPR-140EX(アイシン精機社)を用いて、抗体結合タンパク質を発色および発光により検出した。

【0039】

(エライザ法)

以下の実施例において、エライザ法は以下のように行なった。

試料を96穴イムノプレート(Nunc社)の各ウェルに0.05mLずつ分注して、4℃で一晩静置後、0.25mLの10mMリン酸緩衝液(pH7.4)+0.15M食塩(PBS)で3回洗浄してから、0.2%ウシ血清アルブミンを含むPBSを0.2mLずつ添加して、室温に1時間置いてブロッキングした。次に、0.25mLのPBSで3回洗浄した後、PBS+0.05% Tween 20(PBST)で100倍~1,000倍希釈した抗小麦-AIエピトープペプチド抗体を0.1mLずつ添加して、室温に1時間置いた後、0.25mLのPBSTで5回洗浄し、PBSTで3,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGを0.1mLずつ添加して、室温に1時間置いた。再び、0.25mLのPBSTで5回洗浄した後、TMBキットHYPER(ナカライテスク社)を用いて発色させ、450nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

【0040】

実施例1(抗小麦-AIエピトープ抗体の作製と特異性の確認)

小麦単量体-AIのエピトープとして報告されているAVLRDC(配列番号1、アミノ酸番号37~42番)を含む各種小麦-AIの配列を比較し(表1)、抗体の出来易さを考慮した結果、30番~42番アミノ酸13個からなるペプチド(配列番号2:NGSQVPEAVLRDC)を合成して、これを抗原にして抗小麦-AIエピトープペプチド抗体を作製した。

【0041】

抗小麦-AIエピトープペプチド抗体の作製は以下のように行なった。

HPLCで精製した合成ペプチド1mgをMBS法(Liu et al., Biochemistry, 18,690-697(1979)参照)で貝ヘモシアニンに結合した後、アジュバントを混合して、ウサギ1羽に6回に分けて皮内、静脈注射を行い、1回目の投与から42日後に全採血し、さらにProtein-Aカラムにより、血清から免疫グロブリンG(IgG)を精製した。Protein-Aカラム精製後のIgGは3.88mg/mL濃度で47mL得られた。

【0042】

次に、抗小麦-AIエピトープ抗体の特異性を以下のイムノプロット法により確認した。

まず、上述の方法により得られた小麦抽出物をSDS-PAGEに供した後、上記で得られた抗小麦-AIエピトープ抗体を用いて、上述の方法によりイムノプロットを行った。

銀染色及びイムノプロット法（二次抗体5,000倍希釈、発光検出）の結果を、それぞれ図1のA及びBに示す。

【0043】

図1Bにおいて、約13kDaの単量体および二量体小麦 - AIの位置に強い発光バンドが二本認められたが、小麦種子に含まれる他のタンパク質と抗小麦 - AIエピトープ抗体との結合は認められず、本抗体の特異性が極めて高いことが明らかになった（図1）。

【0044】

実施例2（エライザ法による - AIエピトープの検出・定量）

上述のイムノプロット法により、抗小麦 - AIエピトープ抗体は、単量体および二量体の - AI以外的小麦タンパク質にはほとんど結合しないことから、抗小麦 - AIエピトープ抗体を用いたエライザ法により、単量体および二量体の小麦 - AIエピトープを定量することができる。

10

【0045】

上述の方法により得られた小麦抽出物をPBSで希釈し、マイクロプレートのウェルに添加し、上述のエライザ法（一次抗体：1,000倍希釈）を行った結果、図2において、ウェルあたり小麦タンパク質が0.1~2.0 µg添加された場合に、エライザ法による吸光度が、濃度依存的に上昇した。

【0046】

次に、小麦抽出物から単量体および二量体 - AI画分を調製するため、小麦抽出物に50%飽和硫酸を加えて、室温に1時間静置後の遠心（10,000 × g、5分間）沈殿物を、0.1M酢酸アンモニウムに溶解し、脱塩カラムPD-10（GEヘルスケアバイオサイエンス社）で脱塩した。タンパク質画分を、セントリプレップYM-10（日本ミリポア社、限外分子量10kDa）により濃縮後、ゲルろ過カラムSuperdex 200HR（GEヘルスケアバイオサイエンス社）で分画し、単量体と二量体の - AIに相当する分子量の画分を回収した。

20

【0047】

この単量体および二量体の小麦 - AI画分を用いて同様にエライザ法を行った結果、ウェルあたり0.2 µg添加した場合に、小麦抽出物を1.0 µg添加した場合と同等の吸光度が得られた。また、単量体および二量体 - AIのエピトープであるAVLRDC（配列番号1）は、単量体および二量体 - AIの全アミノ酸配列中、1箇所しか存在しないため、本エライザ法により、試料中に含まれる単量体と二量体の - AI、およびそれらのエピトープの定量が可能となった。

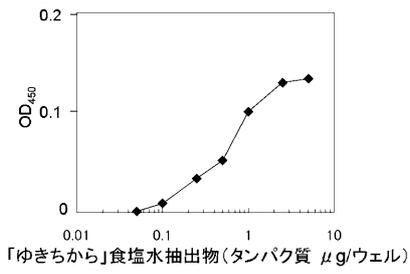
30

【産業上の利用可能性】

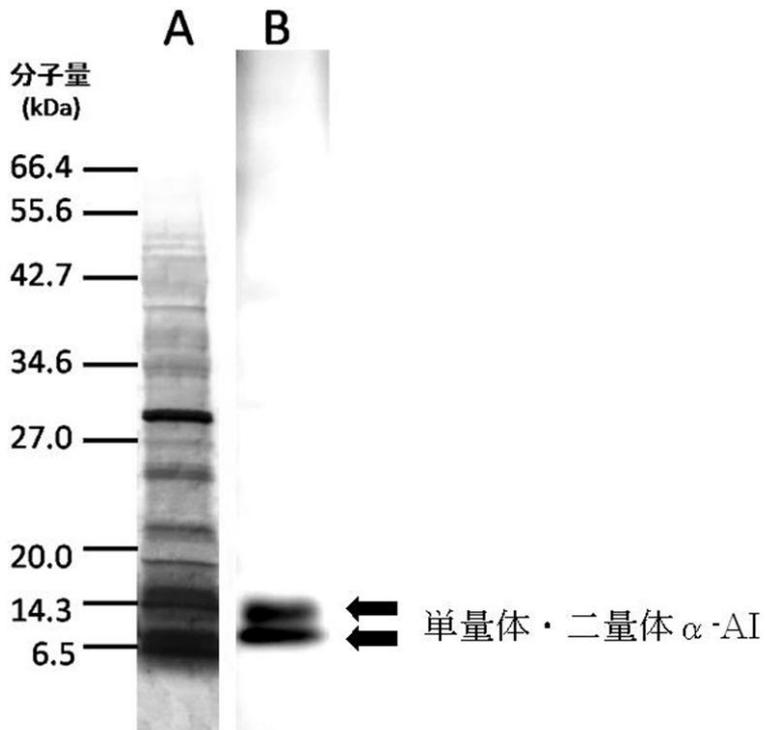
【0048】

本発明によれば、単量体および二量体の小麦 - AIのエピトープを検出・定量することにより、高精度な小麦アレルギー検査が可能となり、食品加工業において、小麦アレルギー混入確認やアレルギー低減化小麦食品の開発などに有益である。

【 図 2 】



【 図 1 】



【 配列表 】

[2011246393000001.app](#)

专利名称(译)	与小麦 α -淀粉酶抑制剂结合的抗肽抗体和使用其测定小麦过敏原的方法		
公开(公告)号	JP2011246393A	公开(公告)日	2011-12-08
申请号	JP2010121244	申请日	2010-05-27
申请(专利权)人(译)	独立行政法人农业·食品产业技术総合研究机构		
[标]发明人	老田茂		
发明人	老田茂		
IPC分类号	C07K16/16 C12N15/09 G01N33/53 C12P21/08		
FI分类号	C07K16/16.ZNA C12N15/00.A G01N33/53.Q C12P21/08 C12N15/13		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA47 4B024/CA02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA32 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	榆亚矢野		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：开发一种结合小麦 α -淀粉酶抑制剂（AI）中的单体和二聚体表位的抗肽抗体，并检测和定量单体和二聚体小麦 α -AI的表位制定法律。通过使用由含有单体表位和二聚体小麦 α -AI作为抗原的13个氨基酸组成的肽制备的抗肽抗体，其特征在于使用抗肽抗体进行免疫反应一种用于测试小麦过敏原的方法，以及用于测试含有所述抗体的过敏原的试剂盒。【选择图】无

