

(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2009-91323

(P2009-91323A)

(43) 公開日 平成21年4月30日(2009.4.30)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
CO7K 16/16	(2006.01)	CO7K 16/16	ZNA	4H045
GO1N 33/53	(2006.01)	GO1N 33/53	Q	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2007-265281 (P2007-265281)	(71) 出願人	501203344
(22) 出願日	平成19年10月11日 (2007.10.11)		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
			福島県福島市荒井字原宿南50 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)	4H045 AA10 AA30 BA10 CA30 DA75 EA50 FA71 GA26

(54) 【発明の名称】 小麦リピドトランスフェアープロテイン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ギーの検査方法

(57) 【要約】

【課題】 小麦LTPを特異的に認識し得る抗ペプチド抗体を作製し、小麦LTPを特異的に検出できる検査方法を開発すること。

【解決手段】 小麦LTPの17~27番アミノ酸からなる部分ペプチドを抗原に用いて作製した抗小麦リピドトランスフェアープロテインペプチド抗体、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ギーの検査方法、及び前記抗体を含有するアレルギー検査用キットを提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 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リピドトランスファープロテインペプチド抗体。

【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の検査方法。

【請求項 3】

請求項 1 に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、小麦アレルゲンの一つとして報告されている水溶性タンパク質のリピドトランスファープロテインの特異的検出に関する。

【背景技術】

【0002】

植物由来の非特異的リピドトランスファープロテイン (nonspecific lipid transfer protein、以下LTPと略記することもある) は、91~95個のアミノ酸で構成され、分子量が約9kDaの塩基性タンパク質で、種々の穀類や野菜、果樹などに広く見出されている (非特許文献 1~3 参照)。穀類種子では分子量が約7kDaのLTPも報告されており、約9kDa蛋白質がLTP1、約7kDa蛋白質がLTP2と呼ばれている (非特許文献 2 参照) が、本明細書では「LTP」とはすべてLTP1のみを指す。

【0003】

LTPの機能としては、ブロッコリー (非特許文献 4 参照) や大麦 (非特許文献 5 参照) の植物表層に存在すること、細菌や糸状菌に対する抗菌性も有している (非特許文献 6、7 参照) ことから、植物体の防御に役立っていると考えられているが、その抗菌作用機構についてはよく解っていない。LTPはまた、植物体表層へ脂溶性成分を運搬する役割も有していると考えられているが、LTPの脂質結合機能が植物において他にどのような生理的意義を有しているのかは不明である。

【0004】

一方、LTPはバラ科果実や野菜、穀類のアレルゲンとして知られており (非特許文献 2、3、8、9 参照)、小麦アレルギー患者のIgE抗体が小麦LTPに反応することも報告されている (非特許文献 10、11 参照)。LTPがアレルゲンになりやすい原因の一つとして、ペプシンによって消化され難いことが挙げられる (非特許文献 12、13 参照)。

【0005】

小麦LTPの検出方法については、抗小麦LTPポリクローナル抗体 (非特許文献 14 参照) およびモノクローナル抗体 (特許文献 1 参照) による酵素免疫測定法では、大麦に対する交差性が極めて低いことが報告されているが、他の農作物との交差性についての記述がない。また、抗大麦LTPポリクローナル抗体に関する既報にも、小麦や他の植物由来LTPとの交差性に関する記述がない (非特許文献 5 参照)。

【0006】

【非特許文献 1】 Doulliez., J.-P. et al., Journal of Cereal Science, 32, 1-20 (2000)

【非特許文献 2】 Salcedo, G. et al., Clinical and Experimental Allergy, 34, 1336-1341 (2004)

【非特許文献 3】 Pastorello, E.A. et al., Molecular Nutrition and Food Research, 48, 356-362 (2004)

【非特許文献 4】 Pyee, J. et al., Arch. Biochem. Biophys., 311, 460-468 (1994)

【非特許文献 5】 Molina, A. et al., The plant Journal, 4, 983-991 (1993)

【非特許文献 6】 Terras, F.R.G. et al., Plant Physiol., 100, 1055-1058 (1992)

10

20

30

40

50

- 【非特許文献7】Segura, A. et al., FEBS Lett., 332, 243-246 (1993)
- 【非特許文献8】Pastorello, E.A. et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 106, 744-751 (2000)
- 【非特許文献9】Miguel-Moncin, M.S. et al., Allergy, 58, 511-517 (2003)
- 【非特許文献10】Battais, F. et al., Journal of Cereal Science, 42, 109-117 (2005)
- 【非特許文献11】Kitta, K. et al., Anal. Biochem., 351, 290-297 (2006)
- 【非特許文献12】Asero, R. et al., International Archives of Allergy and Immunology, 122, 20-32 (2000)
- 【非特許文献13】Vassilopoulou, E. et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 118, 473-480 (2006)
- 【非特許文献14】山口(村上)友貴絵ら, 京都女子大学食物学会誌, 60, 7-14 (2005)
- 【特許文献1】特開2007-153769号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

食物アレルギー患者の約10%は小麦アレルギーを有していると言われていたため、小麦は厚生労働省令で指定するアレルギー特定表示5品目の一つとなっている。食品中に混入している小麦アレルゲンを検出する方法は現在のところ、水不溶性の小麦グリアジン等を主な対象としているが、小麦の様々なタンパク質がアレルゲンとして報告されているため、検出可能なアレルゲンの範囲拡大が求められている。

しかし、小麦LTPが小麦アレルゲンの一つであるとの報告は最近なされたため(非特許文献10, 11参照)、従来の小麦アレルゲン検出技術ではLTPの検出はカバーされていない。

また、現在小麦の主要なアレルゲンとして検出対象になっているグリアジンは水難溶性のため、界面活性剤などを含む抽出液で12時間以上抽出を行う必要があるのに対し、LTPは水溶性のため抽出が容易である。

したがって、本発明は小麦LTPを特異的に検出し得る方法を開発することを目的とした。

【課題を解決するための手段】

【0008】

LTPは麦類のみならずコメ、トウモロコシ、野菜、果樹、ナッツ類などに広く存在することから、麦類LTPに特異的に結合する抗体を得るのは困難であった。そこで本発明者は、これらのLTPのアミノ酸配列を比較し、麦類LTPに特異的な配列で、各種修飾を受けにくく、なおかつタンパク質分子表面に出ている可能性が高い部分ペプチドを合成してその抗ペプチド抗体を作製するために鋭意検討した。

その結果、小麦LTPの17番~27番のアミノ酸11個からなる部分ペプチドを合成し、これをキャリアタンパクに結合させたものを動物に免疫することにより、小麦とライ麦に対して特異性が極めて高い抗体を得た(図1)。本発明者は、これらの知見に基づいて本発明を完成させるに至った。

【0009】

すなわち、本願請求項1に係る本発明は、配列番号1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リポトランスファースプロテインペプチド抗体である。

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なうことを特徴とする小麦アレルゲンの検査方法である。

本願請求項3に係る本発明は、請求項1に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】

【0010】

本発明によれば、新たに小麦アレルゲンの一つとして報告されたLTPに特異的に結合す

る抗ペプチド抗体が初めて提供される。これにより、従来よりも幅広い小麦アレルゲンタンパク質の検出が可能となった。

また、本発明の抗ペプチド抗体が認識するLTP部分ペプチドはアレルギー反応を引き起こすエピトープである可能性が高いため、食品加工工程等においてLTPが部分分解されていても、このペプチド部分が分解されない限りはアレルギー反応性が残存するが、その場合でも本発明の抗ペプチド抗体により検出可能である。

さらに、本発明の抗ペプチド抗体を用いたイミュノプロット法により、小麦種子の水可溶性タンパク質 1 μ g に含まれる極微量のLTPを検出し得ることが明らかとなった。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0011】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の抗小麦LTPペプチド抗体は、例えば次のようにして調製することができる。

各種農作物のLTP配列(表1)を比較し、修飾の受け難さや分子表面露出の可能性等を考慮して、小麦種子アリューロン層由来LTPの17番~27番アミノ酸11個の部分ペプチド(vqpgpssgqc: 配列番号1)が、ペプチド抗原として適していることが見出された。

【0012】

【表1】

表1 (各種農作物のLTP配列の10番~30番アミノ酸の比較)

20

農作物	10 ↓	20 ↓	30 ↓	参考文献
小麦	vrpclsyvqg	-gpgpssgqccdg		非特許文献1
大麦	mk***t****	-*****e***		非特許文献1
ライ麦	ls**ip**ar**n**an**aa**s*			Doxey, A.C.ら
コメ	vg***t**ar**-*a**aa**s*			非特許文献1
トウモロコシ	ia**i**ar**q*s**ag**s*			非特許文献1
ニンジン	la***g*lrsvqnv*	vpl*t*cn		非特許文献2
リンゴ	la**ig**rsg*av*pa-***			非特許文献2

30

表中、* は小麦と同じアミノ酸を示す。

表中、Doxey, A.C.らはDoxey, A.C., Yaish, M.W., Griffith, M. and McConkey, B.J., Ordered surface carbons distinguish antifreeze proteins and their ice-binding regions. Nat. Biotechnol., 24, 852-855 (2006)である。

40

【0013】

上記で選定した配列番号1に記載のアミノ酸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)で精製する。これをMBS(マレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド)法やグルタルアルデヒド法などにより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、KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin)、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミン等が挙げられる。

【0014】

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し、免疫する。ウサギの場合、この免疫操作は2週間以上の間隔

50

で3回以上行い、1回目の感作から約2ヵ月後に全採血を行い、抗血清を得る。この抗血清を塩析、Protein-Aカラム等により精製し、抗小麦LTPペプチドポリクローナル抗体を得ることができる。

【0015】

モノクローナル抗体の場合は、動物に免疫抗原を免疫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LTPペプチド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て細胞融合させ、ハイブリドーマを得る。この中より、小麦LTPペプチド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LTPペプチドモノクローナル抗体を得ることができる。

10

【0016】

以上のようにして作製した抗小麦LTPペプチド抗体の抗体価の検定は、酵素免疫測定(ELISA)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LTP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ない呈色させ、吸光度の測定値から抗体価を算出する。

【0017】

20

本発明の抗小麦LTPペプチド抗体を用いる小麦アレルゲンの検査は、LTPと抗小麦LTPペプチド抗体との免疫反応を利用して、イミュノプロット法やELISA法などの常法により行なうことができる。被検試料としては、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発酵・加工食品を使用することができる。

【0018】

イミュノプロット法の場合、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)に供し、ゲルから蛋白質をポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜へ転写後、ブロッキング反応を行う。次に、PVDF膜を抗LTPペプチド抗体(一次抗体)溶液に浸してLTPと抗体を結合させ、洗浄する。さらに、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。PVDF膜を再度洗浄した後、標識酵素の基質を添加して酵素反応を行ない呈色させ、吸光度を測定することによりLTPを検出する。

30

なお、上記において、酵素の代わりに蛍光色素やビオチンなど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、励起波長を当てて発色させ、吸光度を測定すればよい。ビオチンの場合は、アビジン化酵素を加えてアビジン・ビオチン複合体を形成し、さらにその酵素基質溶液を加えて酵素反応を行ない呈色させ、吸光度を測定すればよい。

【0019】

ELISA法のうち、例えばサンドイッチELISA法の場合は次のようにして行なわれる。

抗小麦LTPペプチド抗体(一次抗体)を固相化したプレートの各ウェルに、被検試料の抽出液を添加して、抗小麦LTPペプチド抗体とLTPを結合させた後、ウェルを洗浄する。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で標識した抗LTP抗体(二次抗体)溶液をウェルに添加し、LTPと二次抗体を結合させる。再度ウェルを洗浄した後、標識酵素の基質を添加して酵素反応を行ない呈色させ、吸光度を測定することによりLTPを検出する。

40

なお、上記において、酵素の代わりに蛍光色素やビオチンなどを用いて二次抗体を標識することもできる。この場合、測定方法は前述の如く常法により行なえばよい。また、直接吸着ELISA法や競合ELISA法で小麦LTPを検出することもできる。

【0020】

以上に説明した本発明の小麦アレルゲンの検査方法は、本発明の抗小麦LTPペプチド抗

50

体含有するアレルゲン検査用キットを用いて容易に実施することができる。このアレルゲン検査用キットには、抗小麦LTP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。

【実施例】

【0021】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

【0022】

(作物水抽出物の調製)

以下の実施例において、作物水抽出物の調製は下記のように行なった。

小麦は「ゆきちから」、大麦は「シンジュボシ」、コメは「コシヒカリ」(いずれも独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター圃場で栽培されたもの)、ライ麦は「春香」(雪印種苗)、エン麦は「とちゆたか」(雪印種苗)を用い、他の農作物は小売店から購入した。麦類種子やコメ、落花生は粉碎機にかけた後、3倍量(重量比)の脱イオン水に懸濁して、4で1時間抽出した。野菜および果実は適宜脱イオン水を加えてミキサーで粥状にした。それぞれの遠心(10,000 × g、5分間)上清を脱塩カラムPD-10(GEヘルスケアバイオサイエンス)にかけて、1mmol/Lジチオスレイトール(DTT)を含む20mmol/Lトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)に置換するとともに分子量5,000以下の低分子物質を除去して水抽出物とした。さらに必要に応じ、セントリプレップYM-3(日本ミリポア、限外分子量3,000)によりタンパク質を濃縮した。

10

【0023】

20

(イミュノプロット法)

以下の実施例において、イミュノプロット法は以下のように行なった。

イミュノプロット法は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(バイオクラフト)を用いて、SDS-PAGEゲルから蛋白質をPVDF膜(アトー)へ転写した。0.3%スキムミルクを含む25mmol/Lトリス-塩酸緩衝液+0.15mol/L食塩+0.1%Tween-20(TTBS)にPVDF膜を浸して、室温で1時間ゆっくり振とうしてブロッキング反応を行い、次に0.3%スキムミルクを含むTTBSで5,000倍希釈した抗LTPペプチド抗体溶液に室温で1時間浸した。TTBSによる洗浄後に、0.3%スキムミルクを含むTTBSで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)溶液に室温で1時間浸した。PVDF膜を再度洗浄した後、SuperSignal West fento Maximum Sensitivity S

30

【0024】

実施例1(抗小麦LTPペプチド抗体の作製と交差反応)

各種農作物のLTP配列(表1)を比較し、修飾の受け難さや分子表面露出の可能性等を考慮して、小麦種子アリュuron層由来LTPの17番~27番アミノ酸11個の部分ペプチド(vqgpgpgsgqc:配列番号1)を合成して抗ペプチド抗体を作製した。

【0025】

抗小麦LTP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3mgをMBS法(Liu, F., Zinnecker, M. and Katz, D. H., New procedures for preparation and isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of D-amino acids and immunochemical characterization of such conjugates. Biochemistry, 18,690-697 (1979)参照)でヘモシアニンに結合した後、ウサギ1羽に3回に分けて感作を行い、1回目の感作から63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(IgG)を精製した。Protein-Aカラム精製後のIgGは5.75 mg/mL濃度で42mL得られた。

40

【0026】

次に、小麦、大麦、ライ麦、エン麦、コメ、トウモロコシ、落花生、ニンジン及びリンゴの各農作物の水抽出物をタンパク量にして20µgずつ用いてイミュノプロットを行った。

50

まず、上述の方法により得られた農作物水抽出物をSDS - PAGEに供した。試料を等容量の「トリスSDS- -MEサンプル処理液」（第一化学薬品）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）、または15~25%アクリルアミドゲル（第一化学薬品）と「SDS-トリスグリシンバッファー」（第一化学薬品）を用いて電気泳動し、「2D-銀染色試薬・II」（第一化学薬品）によりタンパク質を検出した。次いで、上記で得られた抗小麦LTPペプチドIgGを用いて、上述の方法によりイミュノプロットを行った。

銀染色及びイミュノプロット法の結果を、それぞれ図1の(A)及び(B)に示す。図1中、aは小麦、bは大麦、cはライ麦、dはエン麦、eはコメ、fはトウモロコシ、gは落花生、hはニンジン、iはリンゴを示す。

10

【0027】

図1(B)において、小麦とライ麦では、約9kDaのLTPの位置に強い発光が認められ、バンドの中央部が白くなっている。大麦やエン麦でもLTPの位置に発光が少し認められたが、コメなどの他の農作物には発光が認められなかった(図1)。

【0028】

次に、これらのうち麦類の水抽出物について、試料のタンパク量を5µgおよび1µgとして、上記と同様にイミュノプロット法を行なった結果を図2に示す。図2中、aは小麦、bは大麦、cはライ麦；dはエン麦を示す。

その結果、大麦やエン麦のLTPの位置に発光は認められなかったのに対して、小麦やライ麦ではタンパク量が1µgでもLTPの位置に発光が認められた(図2)。なお、タンパク量が20µgの場合、ライ麦では約30kDaの位置に、エン麦では約18kDaの位置にそれぞれ副バンドが認められたが(図1(B))、タンパク量が5µgおよび1µgの場合はこれらの副バンドも認められなかった(図2)。

20

【0029】

本実施例において、小麦LTPの部分ペプチドに対するポリクローナル抗体を初めて得た。抗原として用いたコムギ種子アリューロン層LTPの部分ペプチドのアミノ酸(17~27番)配列は、特にオオムギ種子アリューロン層LTPと相同性が高い箇所(アミノ酸11個中10個が合致、表1)であったが(非特許文献2参照)、得られた抗ペプチドIgGはオオムギ種子LTPとの交差性は低かった。LTPの配列は主に欧州で解析されているため、抗原に用いたLTPの部分ペプチドのアミノ酸配列が、日本のオオムギ品種と異なっている可能性がある。

30

【0030】

実施例2(精製コムギLTPのイミュノプロット法による検出)

小麦種子水抽出物をDEAE-およびCM-トヨパールカラムに流し、どちらの担体にも吸着しなかった画分からさらにHPLCによりLTPを精製した(図3)。

すなわち、未発芽コムギ水抽出物を陰イオン交換樹脂(DEAE-トヨパール、東ソー)のカラム(1×10cm)にかけ、20mmol/Lトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)による溶出画分をセントリプレップYM-3で濃縮した後、脱塩カラムPD-10で50mmol/Lリン酸緩衝液(pH 6.6)へ置換した。次に陽イオン交換樹脂(CM-トヨパール、東ソー)のカラム(1×10cm)にかけ、同じリン酸緩衝液で溶出した画分を濃縮後、逆相HPLCで分画した。カラムはWakosil 5C4-200、4.6×250mm(和光純薬)を用い、0.2%ギ酸を含む15-30%アセトニトリル(流速0.5ml/min)で溶出し、各画分を遠心濃縮機で乾固した。

40

【0031】

次に、画分を超純水で再溶解し、実施例1と同様にSDS - PAGEに供した。

SDS-PAGEの結果を図3に示す。図3中、aはタンパク質分子量マーカー、bはDEAE-トヨパールにおける20mmol/Lトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)による小麦水抽出物の溶出画分(15µg)、cはHPLCによる精製小麦LTP(0.15µg)を示す。

次いで、得られた精製小麦LTP 15ngと実施例1の抗小麦LTPペプチドIgGを用いてイミュノプロットを行ったところ、発光が認められた(図4b)。図4中、aは対照である小麦水抽出物(10µg)、bは精製小麦LTP(15ng)を示す。

50

【 0 0 3 2 】

実施例 3 (精製小麦LTPの直接吸着ELISA法による検出)

実施例 2 で得られた精製小麦LTPの500 ~ 0ng/mLのPBS (20mmol/Lリン酸 + 0.9% 食塩、pH 7.2) 溶液を調製し、96穴イムノプレート (Nunc社) の各ウェルに0.1mLずつ分注して、4で一晩静置した。ウェルを0.25mLのPBSで5回洗浄した後、0.2%ウシ血清アルブミンを含むPBSを0.1mLずつ添加して、室温に1時間置いてブロッキングした。

次に各ウェルを0.25mLのPBSで5回洗浄した後、PBS + 0.05%ツイーン20 (PBST) で100倍希釈した抗小麦LTP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5000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2時間置いた。

各ウェルを0.25mLのPBSで5回洗浄した後、0.1mLのTMB溶液を加えて室温で20分間発色させ、さらに0.1mLの希硫酸を添加して反応を停止させてから、450nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定することにより、LTPを検出できた (表 1) 。

【 0 0 3 3 】

【表 2】

精製 LTP (ng)	吸光度 (450nm)
50	0.867
25	0.881
12.5	0.871
6.3	0.772
3.1	0.292
1.6	0.125
0	0

【産業上の利用可能性】

【 0 0 3 4 】

本発明により、小麦およびライ麦LTPを特異的に検出できる抗小麦LTPペプチド抗体が提供される。これにより、小麦アレルゲンの一つとして最近報告されたばかりであるLTPについても、アレルゲン検査の対象を広げることができる。

なお、本発明の抗小麦LTPペプチド抗体はライ麦のLTPにも結合するが、小麦タンパク質が様々な食品に添加物として用いられているのに対し、ライ麦はパン以外にほとんど使用されないこと、またLTPと他の小麦アレルゲンの検出法を組み合わせることにより、ライ麦タンパク質の混入を小麦タンパク質の混入と誤認する恐れは極めて低い。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 5 】

【図 1】各種農作物の水溶性タンパク質 (20 μ g) を銀染色 (A) 及び抗小麦LTPペプチドIgGを用いたイミュノプロットティング (B) により検出した結果を示す。

【図 2】各種麦類の水溶性タンパク質 (5 μ g、1 μ g) を抗小麦LTPペプチドIgGを用いたイミュノプロットティングにより検出した結果を示す。

【図 3】精製小麦LTPについてのSDS-PAGEの結果を示す。

【図 4】精製した小麦LTPのイミュノプロットティングの結果を示す。

【符号の説明】

【 0 0 3 6 】

(図 1) a : 小麦、b : 大麦、c : ライ麦、d : エン麦、e : コメ、f : トウモロコシ、g : 落花生、h : ニンジン、I : リンゴ

(図 2) a : 小麦、b : 大麦、c : ライ麦、d : エン麦

(図 3) a : タンパク質分子量マーカー、b : DEAE-トヨパールにおける20mmol/Lトリス-

10

20

30

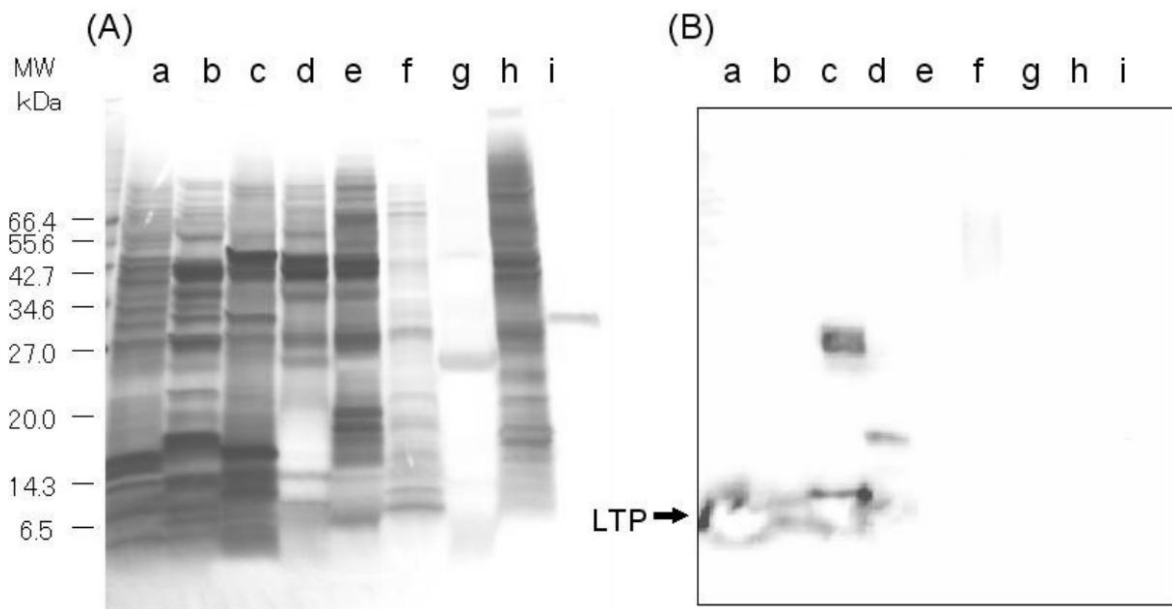
40

50

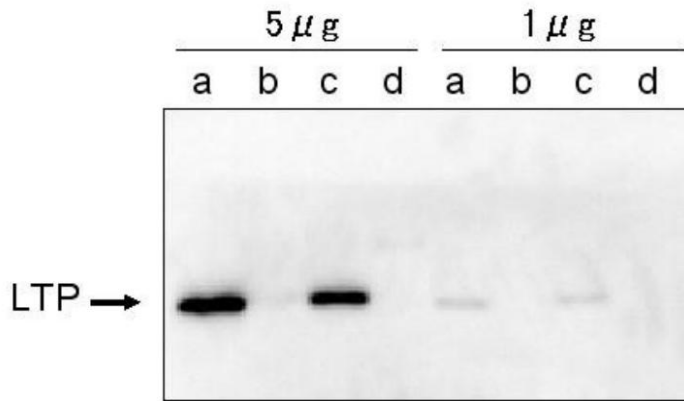
塩酸緩衝液 (pH 8.0) による小麦水抽出物の溶出画分 (15 μ g)、c : HPLCによる精製小麦 LTP (0.15 μ g)

(図 4) a : 小麦水抽出物 (10 μ g)、b : 精製小麦 LTP (15ng)

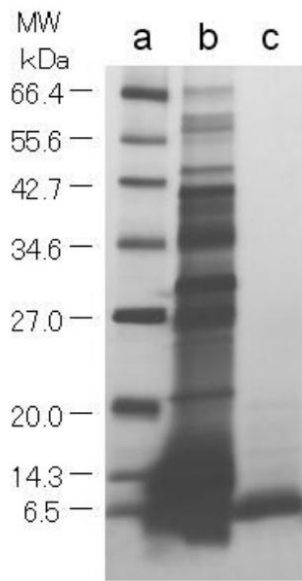
【 図 1 】



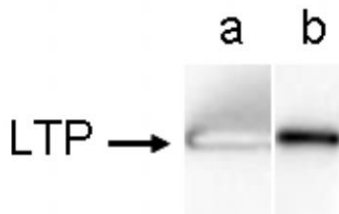
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

[2009091323000001.app](#)

专利名称(译)	与小麦脂质转移蛋白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	JP2009091323A	公开(公告)日	2009-04-30
申请号	JP2007265281	申请日	2007-10-11
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 G01N33/53		
FI分类号	C07K16/16.ZNA G01N33/53.Q		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA30 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA26		
代理人(译)	榆亚矢野		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：制备特异性识别小麦LTP的抗肽抗体，并开发一种特异性检测小麦LTP的检测方法。解决方案：提供一种抗小麦脂质转移蛋白肽抗体，其通过使用由小麦LTP的第17至第27氨基酸组成的部分肽作为抗原，通过使用该抗体进行免疫反应的小麦过敏原检查方法制备，和含有抗体的过敏原检测试剂盒。Ž

	10	20	30	
農作物	↓	↓	↓	参照文献
小麦	vrpclsyvqg-gpqpssgqccdg			非特許文献1
大麦	mk****-*****e**n*			非特許文献1
ライ麦	ls**ip*ar*n*an**aa**s*			Doxey, A.C.ら
コメ	vg****ar*-a****aa**s*			非特許文献1
トウモロコシ	ia**i**ar*q*s**ag**s*			非特許文献1
ニンジン	la***g*lrsvnv*vpl*cn			非特許文献2
リンゴ	la**ig**rsg*av*pa-**n*			非特許文献2