

DETEKCJA GLUTENU - WYBRANE TECHNIKI

Opracowanie: dr Tomasz Wójcik,
Jagiellońskie Centrum Innowacji

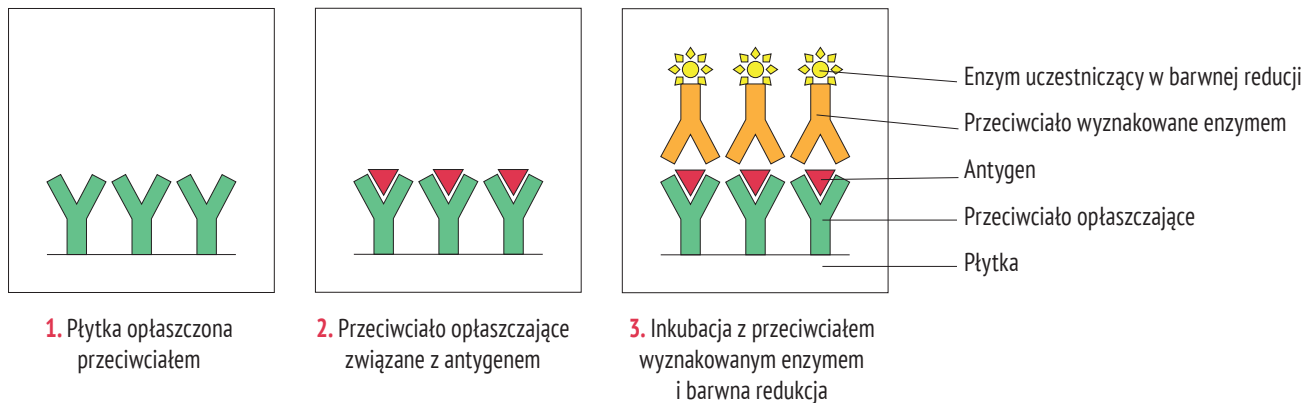


Obecnie preferowanymi metodami detekcji glutenu są **techniki immunoanalityczne**. Wśród nich jest enzymatyczna **metoda immunoenzymosorbcyjna** (ang. *enzyme immunosorbent assay; ELISA*), aktualnie najpopularniejsza i powszechnie stosowana metoda rutynowego badania alergenów pokarmowych. Wynika to z jej czułości, precyzji i szerokich możliwości standaryzacji. ELISA jest również najczęściej używaną techniką w komercyjnie dostępnych zestawach do detekcji poziomu alergenów w składnikach pokarmowych, jak również w gotowych produktach żywnościowych i napojach [1].

Dwa formaty testu ELISA – **kanapkowy** (ang. *Sandwich ELISA*) i **kompetycyjny** (ang. *Competitive ELISA*) są rekomendowane do badania poziomu glutenu w produktach żywnościowych.

Metoda kanapkowa opiera się na zastosowaniu dwóch przeciwciał. Przeciwciało opłaszczające (na rysunku kolor zielony) jest związane z powierzchnią płytki, na której przeprowadza się oznaczenie. Płytkę przemywa się roztworem zawierającym badany materiał. Jeśli w owym materiale znajduje się poszukiwane białko, czyli antygen (na rysunku czerwone trójkąty), będzie się ono łączył z przeciwciałami związanymi z płytką. Po dodaniu badanego materiału płytkę przepłukuje się. W tej chwili antygen jest już wyodrębniony z mieszaniny, poprzez związanie z powierzchnią płytki. Następnie, dodawane jest kolejne przeciwciało, tym razem wyznakowane enzymem. Przeciwciało to również jest specyficzne względem poszukiwanego białka. Po przepłukaniu uzyskujemy strukturę kanapki – antygen

rzeczywiście znajduje się pomiędzy dwiema warstwami przeciwciał. Teraz można dodać już substrat dla enzymu związanego z drugim przeciwciałem. Zwykle stosuje się związki, które w wyniku reakcji enzymatycznej przechodzą w barwny produkt, którego ilość można zmierzyć metodą spektrofotometryczną. Siła sygnału jest proporcjonalna do ilości związanego antygeny.



Rys. 1 Uproszczony schemat testu ELISA – metoda kanapkowa

W metodzie kompetycyjnej oznaczane białko konkuruje z cząsteczkami standardu o dostęp do wiązania z przeciwciałem. Im większe jest stężenie antygeny w próbce, tym mniej standardu zwiąże się z przeciwciałem. Barwny produkt powstaje jedynie, gdy przeciwciało zwiąże się ze standardem. Z tego powodu w metodzie kompetycyjnej intensywność reakcji kolorymetrycznej jest odwrotnie proporcjonalna do ilości antygeny w próbce.

Obecnie zalecaną w Europie metodą badania poziomu glutenu jest kanapkowy test ELISA R5 Mendeza, w którym stosuje się dwa przeciwciała R5 wiążące się z gliadyną, która jest białkiem wchodzącym w skład glutenu. Jest to test o wysokiej czułości i specyficzności, dobry do stosowania zwłaszcza, gdy stężenie badanego białka jest niskie oraz gdy towarzyszą mu wysokie stężenia innych białek. Test ma limit detekcji 1.56 ppm (liczba części na milion) i jest zalecany przez *Codex Alimentarius Commission* jako metoda określania zawartości glutenu w żywności [2]. Nie jest jednak wystarczająco dokładna do określania zawartości glutenu w produktach hydrolizowanych. Kompetycyjny test R5 ELISA, oparty o jedno monoklonalne przeciwciało, umożliwi precyzyjne określenie poziomu zarówno glutenu w całości, jak i jego fragmentów. Według *Codex Alimentarius Commission* ta modyfikacja testu R5 jest wskazana do badania poziomu hydrolizowanego glutenu. Limit detekcji sięga 0.3 ppm w płynnych próbkach.

Idealny test na obecność glutenu w żywności powinien rozpoznawać regiony białka odpowiedzialne za jego immunotoksyczne działanie. Pomimo, że nie wszystkie te regiony zostały do tej pory zidentyfikowane, testy oparte na monoklonalnym przeciwciale G12 wydają się spełniać to kryterium i są wskazane do oznaczania glutenu w żywności m.in. przez AGES – oficjalny urząd kontrolny Austrii [3]. Przeciwciało G12 rozpoznaje fragment peptydu α -2 gliadyny, który jest w znacznej mierze odpowiedzialny za immunotoksyczność glutenu. Kanapkowy test ELISA oparty na przeciwciale G12 dał bardzo obiecujące rezultaty na próbkach różnego typu, jego limit detekcji sięga 0.6 ng/ml. Co więcej uzyskane wyniki dobrze korelowały z immunotoksycznością zbóż, z których był ekstrahowany. Opracowano również wariant kompetycyjny testu ELISA z przeciwciałem G12. Metoda ta jest wysoce czuła, limit detekcji wynosi 0.44 ppm gliadyny i charakteryzuje się wysoką powtarzalnością [4].

Kolejna grupa metod opiera się na detekcji genów odpowiedzialnych za produkcję składników glutenu techniką łańcuchowej reakcji polimeryzacji (ang. Polymerase chain reaction; PCR). Szczególnie szybkie i wygodne techniki opierają się na zastosowaniu ilościowej reakcji łańcuchowej polimeryzacji w czasie rzeczywistym (ang. Quantitative real-time PCR). Ilościowy PCR wykorzystując techniki fluorescencyjne, pozwala na monitorowanie ilości produktu

reakcji w czasie jej trwania, co odróżnia ją od klasycznej reakcji PCR. Dzięki temu cała procedura analizy jest stosunkowo szybka i pozwala wyeliminować etap szacowania produktu po zakończeniu reakcji. Metoda ta umożliwia wykrycie obecności DNA już w stężeniu 20 pg DNA/mg materiału badanego [5]. Porównanie tego testu z techniką R5 ELISA wykazało, że jest on w stanie wykryć DNA w produktach, w których poziom glutenu jest poniżej limitu detekcji dla testu R5 ELISA.

Ostatnia grupa metod opiera się na zastosowaniu biosensorów, umożliwiających otrzymanie mierzalnego sygnału, proporcjonalnego do stężenia badanego analitu. Najczęściej wykorzystywane są biosensory oparte na absorpcji, fluorescencji lub na zjawisku plazmonowego rezonansu jądrowego (ang. Surface plasmon resonance; SPR). Technika SPR jest techniką o wysokiej efektywności, dostarcza wyników w czasie rzeczywistym, może być zautomatyzowana i cechuje się wysoką czułością. Zastosowanie techniki SPR umożliwia skrócenie czasu badania i jego automatyzację [6].

Wszystkie omawiane techniki są wykonywane w laboratoriach Jagiellońskiego Centrum Innowacji, w ramach świadczonych usług badawczych.

Źródła:

- [1] Windemann H, Fritschy F, Baumgartner E. Enzyme-linked immunosorbent assay for wheat alpha-gliadin and whole gliadin. *Biochimica et biophysica acta*. 1982; 709: 110-21.
- [2] Codex Alimentarius Commission. Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Food Standards Program. Report of the Twenty – Seventh Session of the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling. 2006; ALINORM 06/29/23
- [3] Hochegger R, Mayer W, Prochaska M. Comparison of R5 and G12 antibody-based ELISA used for the determination of the gluten content in official food samples. *Foods*. 2015; 4: 654-664.
- [4] Ehren J, Moron B, Martin E, Bethune MT, Gray GM, Khosla C. A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PloS one*. 2009; 4(7): e6313
- [5] Mujico JR, Lombardía M, Mena MC, Méndez E, Albar JP. A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients. *Food Chemistry*. 2011; 128(3): 795-801.
- [6] Bremer MGEG. Selecting a suitable food allergen detection method. *Food Saf. Mag*. 2009, 15,3

