

# Immunanalitikai módszerek a gliadin, mint búza allergén kimutatására

*Márta Dóra*

KÉKI, Biológiai Osztály

Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,  
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

Érkezett: 2006. december 21.

A táplálékallergiában és táplálékintoleranciában szenvedő betegek száma szerte a világon, így hazánkban is folyamatosan nő. Az emelkedő tendenciát az iparosodás, a növekvő környezetszennyezés, a növényvédőszeres, az élelmiszerek előállításánál és tartósításánál alkalmazott eljárások szerepén kívül a diagnosztikai módszerek fejlődése is magyarázza.

Hazánkban – a tej, a tojás és a szója után – a gabonafehérjék okoznak leggyakrabban allergiás megbetegedéseket. A betegek számára a tüneteket kiváltó allergének és intolerancia faktorok elkerülése csak allergénmentes élelmiszerek fogyasztásával válhat lehetővé.

## 1. Irodalmi áttekintés

A gabonafélék ősidőktől fogva nagy szerepet játszanak a humán táplálkozásban, fontos vitamin-, ásványi anyag- és komplex szénhidrát-forrásaik, illetve élelmirost-tartalmuk révén.

A népesség egy szűk hányadánál viszont a gabonafélék fogyasztása kóros immunológiai folyamatokat indíthat el, amelynek következtében cöliákia (gluténszenzitív enteropáthia), illetve gabonaallergia (gluténallergia) alakulhat ki. Gabona-allergia esetén a glutén és a toxikus prolaminek az IgE közvetítésével túlérzékenységi reakciót váltanak ki. Az IgE antitest a szervezetbe bekerült allergénekhez kötődik, hisztamin kibocsátást más gyulladásos reakciót vagy egyéb allergiás reakciót okozva (Paraf, 1992).

A cöliákia a búzában, az árpában, a rozsban és a zabban lévő prolaminnal (gliadinok és gluteninek) szembeni egész életen át tartó intoleranciát jelent. A gliadint és a glutenint glutén fehérjéknek is nevezik. Cöliákia esetében a fenti gabonafélék tartós fogyasztása a vékonybél bolyhainak teljes pusztulását okozza, aminek következménye a különböző tápanyagokra és vitaminokra nézve súlyos felszívódási zavar, hiányállapotok kialakulása (Polgár, 2005; Nékám, Szemere, 1994). Ezért az érintett betegeknek étrendjükben mellőzni kell a búzát és a többi keresztregálós gabonafajtát (rozs, árpa, zab), illetve ezek származékait.

Potenciális alapanyagként a nem keresztreagáló gabonafélék közül a rizs, kukorica és néhány pszeudocereália (amarant, hajdina) alkalmazására került eddig sor. A hántolt hajdina és amarant ételmirost-tartalma jelentős, fehérjéjük gyakorlatilag glutént nem tartalmaz, ezért alkalmasak a gluténmentes élelmiszerek tápértékének kiegészítésére vagy tápértékének növelésére (Léder, 2005).

A FAO/WHO Codex Alimentarius Táplálkozástudományi és Különleges Célú Élelmiszerek Bizottsága (CX/NFSDU) szerint az élelmiszerekben és élelmiszeralkotókban a glutén mennyiségi meghatározása ellenanyagra alapozott immunológiai módszerekkel ajánlott (pl. ELISA); alternatív módszerként pedig a DNS alapú meghatározás javasolt.

Az alkalmazott módszer érzékenységének legalább 10 mg/kg glutén-tartalom kimutatását kell biztosítani a termékben szárazanyagra vonatkoztatva.

## **2. Célkitűzés**

A célkitűzések között szerepelt annak a vizsgálata, hogy milyen biztonsággal ismerhető fel a prolamin frakción belül a gliadin/gliadin epitóp allergén, a rendelkezésre álló fehérje alapú immunanalitikai módszerekkel (poliklonális gliadin-specifikus nyúl IgG, Western-blott analízis) a hazai búzafajtákban, a velük keresztreagáló és nem-kérsztreagáló gabonákban/pszeudocereáliákban. A mért eredmények alapján célszerű ezen módszerek érzékenységét és specifitását jellemezni. További cél arra irányult, hogy a szilárdfázisú enzimjelzéses módszerek (poliklonális gliadin-specifikus nyúl IgG, illetve monoklonális w-gliadin-specifikus egér IgG) mennyire megbízhatóan működnek technológiai hatásnak kitett kereskedelmi minták és szándékosan kontaminált gliadinmentes hőkezelt kenyérmodellek esetében.

## **3. Anyagok és módszerek**

### **3.1. Gabonák és pszeudocereáliák**

A kísérletben felhasznált gabona (búza, árpa, rozs, zab, tritikálé, kukorica, rizs és hajdina) mintákat a Szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht. biztosította. Az amarant minták közül az *Amaranthus moleros* Róza és az *Amaranthus cruentus* Maros Marázné dr. Szabó Lilla nemesítőtől, míg az *Amaranthus hypochondriacus* Edit a Klorofill Bt.-től származtak. Minden fajtából 3-3 párhuzamos minta megőrlés, majd finomliszt minőségre szitálás után került vizsgálatra (1. táblázat).

## 1. táblázat: Gabonák és pszeudocereáliák

Gabonák és pszeudocereáliák	Kód	Latin elnevezés	Kód	Latin elnevezés	Kód	Latin elnevezés
Búza	B1	<i>T. spelta</i>	B2	<i>T. durum</i>	B3	<i>T. aestivum</i>
Árpa	Á1	<i>H. vulgare</i>	Á2	<i>H. vulgare</i>	Á3	<i>H. vulgare</i>
Rozs	Ro1	<i>S. cereale</i>	Ro2	<i>S. cereale</i>	Ro3	<i>S. cereale</i>
Zab	Z1	<i>Avena nuda</i>	Z2	<i>Avena sativa</i>	Z3	<i>Avena sativa</i>
Tritikálé	T1	<i>Triticale rimpau</i>	T2	<i>Triticale rimpau</i>	T3	<i>Triticale rimpau</i>
Rizs	R1	<i>O. sativa</i>	R2	<i>O. sativa</i>	R3	<i>O. sativa</i>
Kukorica	K1	<i>Zea mays</i>	K2	<i>Zea mays</i>	K3	<i>Zea mays</i>
Amarant	A1	<i>A. moleros</i>	A2	<i>A. cruentus</i>	A3	<i>A. hypochondriacus</i>
Hajdina	H1	<i>Fagopyrum esculatum</i>	H2	<i>Fagopyrum esculatum</i>	H3	<i>Fagopyrum esculatum</i>

### 3.1.1. Kenyérmodellek előállítás

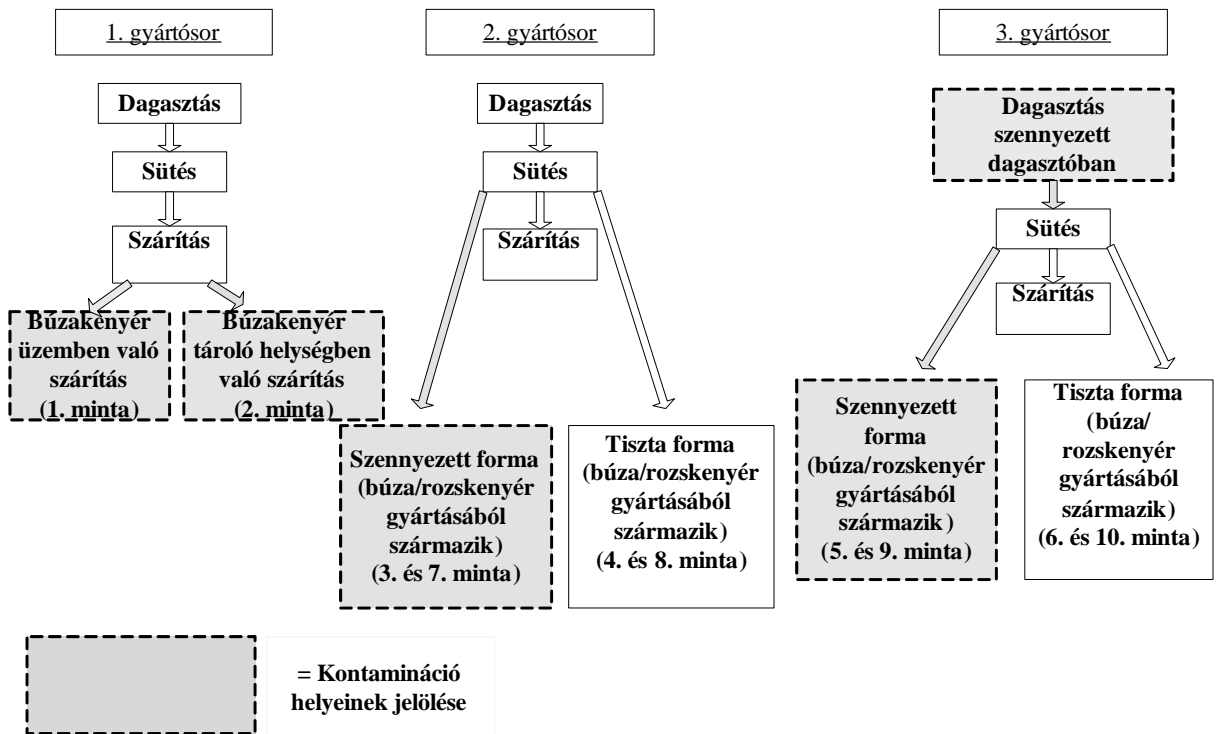
Az alapanyagokat és a kenyérmintákat a Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt. bocsátotta rendelkezésre (2. táblázat). A gliadinmentes kenyér előállításakor az alapanyagok (rizsliszt, kukoricakeményítő, burgonyapehely, só, cukor, disznózsír, tojáspor, élesztő, 25 °C-os víz) összekeverése után tésztát dagasztani kellett, majd formába téve kisütni 220 °C-on 15-20 percig, majd 175-180 °C-ra csökkentve a hőmérsékletet 90 percig. A kész kenyerek 6-8 óra alatt hűltek ki. Ezt követően a kenyerek darabolva és szárítva kerültek őrlésre.

A búzaliszttel, illetve rozsliszttel szennyezett kenyerek egy adott gyártástechnológia alapján készültek a gliadinmentes kenyér gyártása során fellépő kritikus kontaminációs pontok figyelembevételével (pl. szennyezett dagasztó, szennyezett forma, vagy mindkét szennyezés együtt, illetve szárításkor fellépő szennyezés) (1. ábra). Ezeknél a kritikus pontoknál szándékos volt a szennyeződés (3000 µg/g glutén mennyiség).

Negatív kontrollként a kereskedelemben forgalomba kerülő gliadinmentes kenyér került felhasználásra. Pozitív kontrollként pedig a kereskedelemben kapható búza és rozskenyerek szolgáltak alapul. Az utóbbi két kenyér gluténtartalmának hőhatásra bekövetkező mennyiségi változása képezte a vizsgálat tárgyát.

## 2. táblázat: Előállított kenyérmodellek és alapanyagaik

Minta sor-szám	Vizsgált minták megnevezése
1.	Gliadinmentes kenyér (üzemben szárításkor szennyezve)
2.	Gliadinmentes kenyér (búzakenyér tároló helységben szárításkor szennyezve)
3.	Gliadinmentes kenyér: dagasztás (mosott dagasztó búza után) + sütés: szennyezett forma
4.	Gliadinmentes kenyér: dagasztás (mosott dagasztó búza után) + sütés: tiszta forma
5.	Gliadinmentes kenyér: dagasztás (szennyezett dagasztó búza után) + sütés szennyezett forma
6.	Gliadinmentes kenyér: dagasztás (szennyezett dagasztó búza után) + sütés tiszta forma
7.	Gliadinmentes kenyér: dagasztás (mosott dagasztó rozs után) + sütés szennyezett forma
8.	Gliadinmentes kenyér: dagasztás (mosott dagasztó rozs után) + sütés tiszta forma
9.	Gliadinmentes kenyér :dagasztás (szennyezett dagasztó rozs után) + sütés szennyezett forma
10.	Gliadinmentes kenyér :dagasztás (szennyezett dagasztó rozs után) + sütés tiszta forma



1. ábra: Kontaminációs pontok tervezése gliadinmentes kenyerek gyártásánál

## **3.2. Vizsgálati módszerek**

### **3.2.1. Poliklonális ellenanyag alapú kompetitív indirekt ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay)**

Az antigénnel érzékenyített lemezre az ismeretlen koncentrációjú minta és az antigénnel szemben specifikus ellenanyag kerül. Az ELISA lemezen így kialakult immunkomplex meghatározása egy második, peroxidáz enzimmel jelzett ellenanyag segítségével történik. A szubsztrát hozzáadását követően létrejövő színreakció ELISA fotométerrel kerül értékelésre. A mért abszorbancia értékből, ismert koncentrációjú standard görbe felvételével az ismeretlen minta gliadin tartalma meghatározható, mely a színreakció mértékével fordított arányban áll.

### **3.2.2. Monoklonális ellenanyag alapú szendvics ELISA**

A szilárd fázishoz kötött monoklonális ellenanyag a mintában levő antigénnel immunkomplexet képez, mely enzimmel jelölt, antigénre specifikus ellenanyag segítségével színreakció formájában kerül megjelenítésre. A keletkező immunkomplex mennyisége arányos a színintenzitással. Jelen esetben a hőstabil w-gliadinok kimutatása Gluten Assay Kit-et (Tepnel, Biokits) alkalmazásával valósult meg.

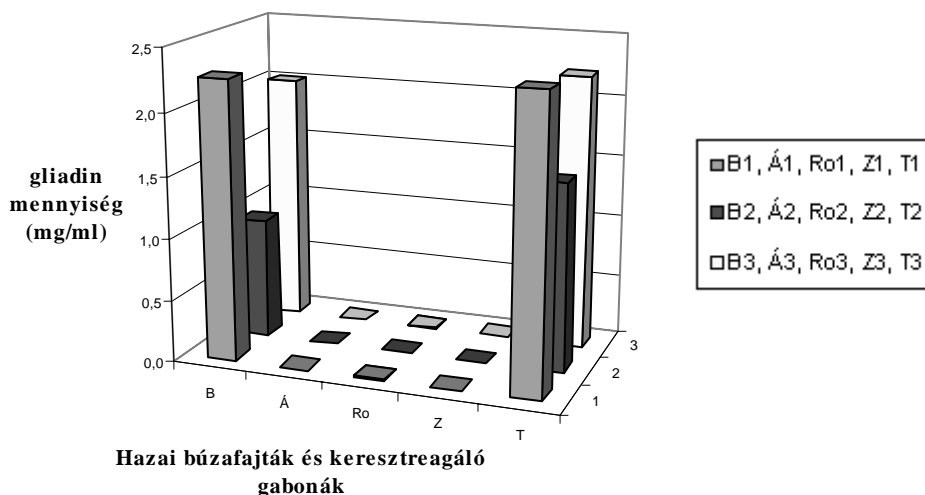
### **3.2.3. Western blott**

A Western blottot a fehérjék vizsgálatára dolgozták ki. Az elektroforetikus szétválasztott komponenseket szilárd hordozóra (nitrocellulóz vagy PVDF membrán) viszik át, ahol a vizsgálandó fehérje ellen termeltetett antitestek (jelen esetben poliklonális a-gliadin nyúl IgG szérum) specifikusan ismerik fel a fehérje-alegységet. Az immunkomplex szintén egy enzimmel jelzett második ellenanyag segítségével színes sávként jeleníthető meg. A kísérletek Western Breeze Chromogen Kit leírása alapján valósultak meg.

## **4. Eredmények és értékelésük**

A gliadin specifikus kompetitív indirekt ELISA módszerrel csak a búza és tritikálé mintákban volt kimutatható a gliadin. Irodalomból az is ismeretes, hogy a rozs, árpa, zab keresztreagáló gabonaféle, mivel a búzával, tritikáléval azonos építőpokat tartalmaz. A poliklonális ellenanyag a gliadinok széles spektrumát, vagyis a  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ -  $\omega$ - gliadin frakciókat is egyaránt érzékeli. Ennek következtében a poliklonális ellenanyag nem egyforma mértékben és a gabonák nem egy ugyanazon részein ismeri fel a gliadinnal keresztreagáló prolamin alegységeket.

A keresztreagáló gabonákban (rozs, árpa, zab) közös gliadin epitópokat a rendszer emiatt nem érzékelte (2. ábra). Csupán a fehérjék SDS-PAGE elválasztása után végzett Western blottal sikerült azonosítani ezeket a módszer érzékenységének köszönhetően. Az immunblott alapján látható, hogy a gliadin frakciók többségét tartalmazza a búza és a tritikálé. A keresztreagálók pedig csak egy-egy frakcióval mutatnak keresztreakciót.



**2. ábra: Hazai búzák és keresztreagáló gabonák gliadin tartalma**

A szándékosan gluténnal szennyezett gliadinmentes kenyér-modellekben poliklonális anti-gliadin nyúl IgG szérummal felismert gliadin-mennyiség nem volt kimutatható. A hőstabil omega-gliadinra alapozott módszerrel a szennyezés mérhetővé vált, de határérték alatti volt (3. táblázat), amely a kitben levő belső, gluténnal szennyezett keményítő kontrollok segítségével került meghatározásra. A kereskedelemben kapható búza- és rozskenyerekben a glutén mindkét módszerrel kimutatható volt, de a méréstartományon kívül eső lényegesen magas értéket mutatott (4. táblázat), amely már a cöliákiás betegek számára toxikus glutén-koncentrációt jelent.

**3. táblázat: Gliadinmentes kenyérmodellek technológiai szennyezésének vizsgálata**

1. Indirekt kompetitív gliadin-ELISA	Szennyezés nem mérhető (egyik mintánál sem)
2. Direkt szendvics $\omega$ -gliadin ELISA	Szennyezés mérhető (<150 $\mu\text{g/g}$ glutén mennyiség minden minta esetében)

#### 4. táblázat: Kereskedelemben kapható búza- és rozskenyerek glutén tartalmának meghatározása

1. Indirektkompetitív gliadin-ELISA	Nagy gluténtartalom (>400 $\mu\text{g/g}$ -nél nagyobb érték)
2. Direkt szendvics $\omega$ -gliadin ELISA	Nagy gluténtartalom (>400 $\mu\text{g/g}$ -nél nagyobb érték)

#### 5. Következtetések

A nyers élelmiszerekben a prolaminok keresztreaktivitásának elemzésénél a Western immunblott módszer több információt mutatott az ELISA módszerekkel szemben. A hőkezeléses modellekben a glutén szennyezés kimutatása hőstabil  $\omega$ -gliadinra alapozott ELISA módszerrel hatékonyabbnak bizonyult.

Az allergének jelölésénél a molekuláris információk nélkülözhetetlenek, melyek még további kutatást igényelnek.

#### 6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Gelencsér Éva főosztályvezető asszonynak (KÉKI, Biológia Osztály) és Takács Krisztina tudományos segédmunkatársnak (KÉKI, Biológia Osztály), valamint Dr. Maráz Anna tanszékvezető asszonynak (BCE, ÉTK Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék) a szakmai útmutatásért, illetve mindazon intézményeknek és szervezeteknek, amelyek a vizsgálatok elvégzéséhez a mintákat biztosították.

#### 7. Felhasznált irodalom

1. CX/NFSDU ALINORM 04/27/26, paras. 27-35 and Appendix III.
2. Léder F. (2005): Gluténmentes új élelmiszer alapanyagok gyártmányfejlesztési lehetőségei, In: Bánáti D., Molnár I.(szerk.), Gluténmentes élelmiszerek, Élelmiszer-biztonsági közlemények II., Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, Budapest, 37-39
3. Nékám K., Szemere P. (szerk.) (1994): Táplálkozási allergiák, Springer Hungarica Kiadó, Budapest, 197-202
4. Paraf, A. (1992): A role for monoclonal antibodies in the analysis of food proteins. Trends in Food Science and Technology 3, 263-267
5. Polgár M. (2005): A coeliakia és gabonaallergia jellegzetességei, diagnosztikus és étrendi konzekvenciái gyermek és felnőtt korban, In: Bánáti D., Molnár I.(szerk.), Gluténmentes élelmiszerek, Élelmiszer -biztonsági közlemények II. Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, Budapest, 14-18

## **Immunanalitikai módszerek a gliadin, mint búza allergén kimutatására**

Hazánkban a tej, tojás és szója után a gabonafehérjék okoznak leggyakrabban allergiás megbetegedéseket. A vizsgálatok célkitűzése arra irányult, hogy a kereskedelmi forgalomban lévő, illetve laboratóriumi fejlesztés alatt álló immunanalitikai módszerek mennyire specifikusan ismerik fel a búza egyik allergén komponensét a gliadint és a vele keresztreakáló fehérjéket a hazai búzafajtákban, gabonákban és pszeudocereáliákban. A mérések poliklonális ellenanyag alapú kompetitív indirekt ELISA-val valósultak meg. Az eredmények igazolására Western blott analízis került alkalmazásra. Vizsgálatok tárgyát képezte továbbá a hőkezeléses technológia hatásának felmérése a gliadin-kimutató érzékenységére vonatkozóan szándékosan gluténnal szennyezett kenyérmodellekben és ipari mintákban. A hőstabil  $\omega$ -gliadinok a monoklonális ellenanyag alapú Gluten Assay Kit-tel kerültek kimutatásra.

## **Immunoanalytical Methods for the Detection of Gliadin as Wheat Allergen Protein**

In Hungary food allergy is caused most frequently by cereal proteins after milk, egg and soy bean proteins. This research work is directed to the specificity of different immunoanalytical methods for the detection of gliadin and also the cross-reactive proteins. For these investigations Hungarian wheat species, other cereals and pseudocereals were used. Measurements were made by polyclonal antibody-based competitive, indirect ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) then the results were verified by Western blot. Regarding to the sensitivity of gliadin detection, the effect of heat treatment was analyzed on industrial samples (wheat bread, rye bread, gliadin-free bread) and intentionally gluten-contaminated bread models. In this case the monoclonal antibody based Gluten Assay Kit was used to detect the heat-stable  $\omega$ -gliadins.