

MOLECULAR - GENETICS METHODS FOR THE DETERMINATION OF CELERY (*APIUM GRAVEOLENS*) AS AN ALLERGEN IN FOOD

Andrea Jurčáková, Ondrej Revák, Ondrej Škultéty

ABSTRACT

The aim of this study was determinate limit of detection (LOD) for determinate celery (*Apium graveolens*). Study was based upon polymerase chain reaction (PCR). The method use primers that are nuclear gene sequences encoding for the celery mannitol dehydrogenase. This reaction is specific for celery. The PCR method was shown to be specific for celery, producing a 279 bp fragment. We used the decimal dilution with range from 100 % to 0.000001 % and a negative control. When evaluated with model samples of celery in, a detection limit of 0.01 % (w/w) (100 ppm) was determined. This method offer also semi-quantitative detection of celery in food.

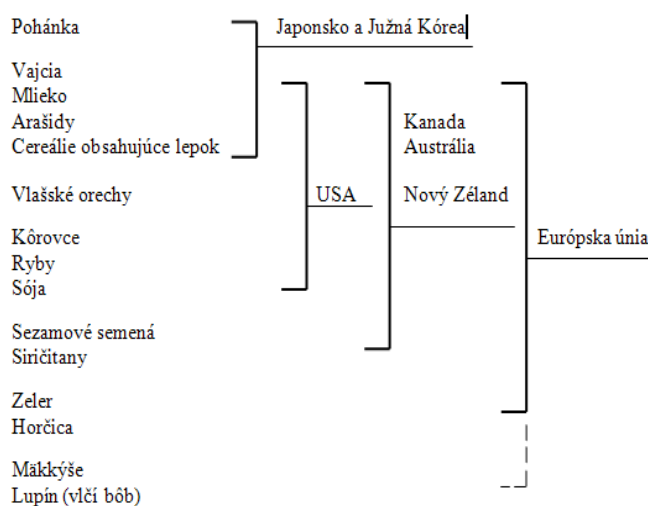
Keywords: *Apium graveolens*, PCR, mannitol dehydrogenase, allergy

ÚVOD

Zeler (*Apium graveolens*) je jednou z najčastejších potravín spôsobujúcich alergické reakcie u dospelých (Etesamifar, Wüthrich, 1998). Avšak, aj tak sa do značnej miery používa v potravinárskom priemysle, predovšetkým v produktoch, ako sú sušené korenie, dehydrované bujóny, omáčky, údeniny a hotové jedlá. Táto skutočnosť predstavuje značné riziko pre alergické osoby, najmä v prípade neúmyselného požitia zeleru kvôli nesprávnemu označeniu. S cieľom poskytnúť spotrebiteľom lepšie informácie a chrániť zdravie tých, ktorí trpia potravinovými alergiami a / alebo neznášanlivosťou, legislatívny rámec týkajúci sa označovania zložiek prítomných v potravinách bol implementovaný do legislatívy Európskej únie. Podľa smernice 2003/89/ES (Directive 2003/89/EC, 2003), je označovanie povinné pre 12 skupín zložiek so známym alergénim potenciálom, okrem iného, zeler a výrobky z nich. Prax označovania a dodržiavanie nových právnych predpisov musí byť riadená pomocou vhodnej, konkrétnej a citlivej metódy detekcie. V súčasnej dobe, predstavujú dva hlavné piliere pri detekcii a analýzach alergénnych zložiek potravín tieto metódy: imunologické metódy založené na bielkovinách (ELISA) a metódy založené na DNA - polymerázovej reťazovej reakcii, ako PCR a real time PCR. Prvý prístup, založený na cieľovej sekvencii génu kódujúceho manitol dehydrogenázu.

Bolo preukázané, že je špecifický pre detekciu zeleru (Dovičovičová, 2004). Alergénnosť zeleru závisí od odrody a tiež či je to časť stonky, koreňa alebo listy. Varením sa redukuje alergenita, ale nie úplne ako uvádza Balmer-Weber et al (Ballmer-Weber, 2002) Api g 1 je hlavný alergén. Ďalšie alergény zeleru boli popísané a klasifikované od Api g 1 až Api g 5 (Bulbil, 2003). Potravinové alergie predstavujú hlavný rizikový faktor ohrozujúci zdravie vo vyspelých priemyselných krajinách. V Európe trpí potravinovými alergiami viac ako 2 % dospelaj populácie a viac ako 8 % detí. (Sicherer et al, 2003; Wuthrich et al, 2000). Počet syndrómov, ktoré sú indukované potravinovými alergénmi neustále narastá. Príznaky po požití alergénu sú rôzne: od zažívacích porúch, respiračné ťažkosti, ako je nádcha alebo astma, kožné reakcie ako je žihľavka, atopická dermatitída až po život ohrozujúci anafylaktický šok. Úroveň expozície, ktorá vyvolá

alergickú reakciu sa líši od jedla k jedlu a od osoby k osobe, najčastejšie v rozmedzí 1-1000 ppm alergénu. Niekedy však aj nepatrné množstvo alergénnej látky môže vyvolať alergickú reakciu.



Obrázok 1 Hlavné alergény a ich označovanie vo svete (Hengel, 2007 (upravené))

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky

Vzorky zeleru (*Apium graveolens*) boli zakúpené v miestnej sieti hypermarketov Hypernova (Nitra, Slovenská republika). Hľuza zeleru bola umytá, nastrúhaná a následne sušená 12 hodín pri teplote 60 °C. Sušený zeler sme homogenizovali 10 minút pri 10 000 otáčkach za minútu, v homogenizátore značky Ovidomix Po homogenizácii sme získali jemný prášok sušeného zeleru.

Navážka vzorky – zo vzoriek sme pripravili 10 riedení, jedna vzorka bola kontrolná (100 % obsah lupiny bielej). Navažovanie vzoriek sme robili na analytických váhach KERN EW s presnosťou na 3 desatinné miesta. Pri navažovaní vzoriek sme postupovali nasledovne: 1 g vzorky na 1 g hladkej múky. Pri homogenizácii sme používali Vortex firmy Biosan. Homogenizácia Vortexom medzi každou navážkou trvala 1 minútu.

Tabuľka 1 Navážka vzoriek

Číslo vzorky	Názov vzorky	Obsah zeleru vo vzorke [%]
1	Vzorka 1	100
2	Vzorka 2	10
3	Vzorka 3	1
4	Vzorka 4	0,1
5	Vzorka 5	0,01
6	Vzorka 6	0,001
7	Vzorka 7	0,0001
8	Vzorka 8	0,00001
9	Vzorka 9	0,000001
10	Neg. kontrola	0

Extrakcia DNA

Protokol pre genomickú purifikáciu DNA z potravín (NucleoSpin® Food). Vzorky DNA sme pripravili za pomoci komerčného kitu NucleoSpin® Food firmy Macherey - Nagel, ktorý sa používa na extrakciu DNA z potravín. DNA sme extrahovali podľa postupu, ktorý je uvedený v užívateľskom manuáli. Dostupný je aj na internetovej stránke spoločnosti. Dostupné na: <<http://www.clontech.com/images/pt/PT4015-1.pdf>>.

Priméry

Na detekciu prítomnosti zeleru vo vzorke sme použili priméry pre detekciu manitol dehydrogenázy (GenBank, Accession No. AF067082). Priméry sme použili od autorov (Dovičovičová et al, 2004). Autori navrhli priméry celF 5'-CAGCCTGTTTCCCGTACGAGAT -3' a celR 5'-TGCCAAATAAAGATTCGAGATTGT-3'. Priméry boli navrhnuté a otestované programom Primer Express software (Applied Biosystems) s teoretickou teplotou topenia okolo 60 °C. Priméry boli otestované s nehomologickými DNA sekvenciami iných rastlín použitím softvéru Blast 2.1 (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md., USA).

PCR reakcia

PCR reakcia vo finálnej fáze prebiehala za týchto podmienok: veľkosť výslednej vzorky 30µl. Každá reakcia obsahovala 1x reakčný pufor pre polymerázu (Qiagen), 1,5mmol.l⁻¹ MgCl₂, mix 0,2 mmol. l⁻¹, 0,50 pmol. µl⁻¹, 5 U HotStarTaq DNA polymerázy a 2µl roztoku templátovej DNA. PCR reakcia prebiehala na prístroji MiniCycler™ PT-150. PCR cyklus začína pred-denaturáciou pri teplote 95 °C po dobu 5 minút. Následne bude zopakovaných 38 cyklov s teplotným profilom (30 sekúnd pri 94 °C(denaturácia, 30 sekúnd pri 59 °C annealing), 1minúta pri 72 °C) a finálna polymerizácia 8 minút pri 72 °.

Tabuľka 2 Protokol na výrobu master mixu pre reakciu PCR (primér celF, celR)

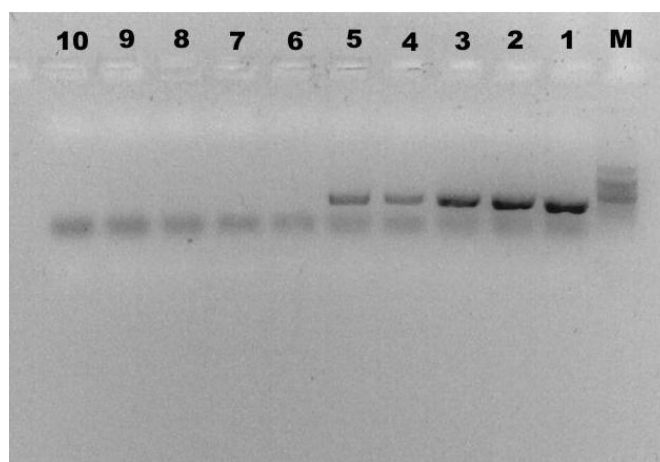
	zásob.	výsled.	µl/vzorka
Red. H ₂ O			16,62
134 Go Taq green pufor 5x	5x	1x	6
180 Go Taq MgCl ₂ 25mM	25,0 mM	1,50 mM	1,8
220 AB dNTP mix 10mM	12,5 mM	0,20 mM	0,48
186 celR	10,0	0,50	1,5
187 celF	10,0pmol/µ	0,50	1,5
179 Go Taq HotStart DNA	5,0 U	0,50 U	0,10
			2
celkom			30

Gélová elektroforéza

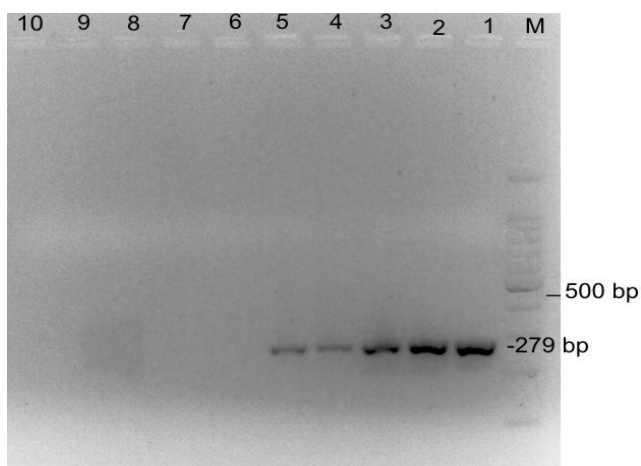
Na vizualizáciu fragmentov DNA PCR reakcie sme použili 1 %-ný agarózový gél. Pri optimalizácii metódy sme použili ako farbivky Etídium Bromid, ale aj farbivo GelRed™. Elektroforéza prebiehala v elektroforetickom korýtku pri jednosmernom prúde s napätím 150 V 15 (obr.2) minút a 125 V 60 minút (obr.3). Na výrobu 1 %-ného agarózového gélu sme použili 1 g agarózy SERVA pre analýzu DNA, ktorú sme zmiešali s TBE pufrom SERVA, ktorý je desať krát koncentrovanej. Zloženie puforu je nasledovné: 0,89 M Tris HCl; 0,89 M kyseliny boritej a 0,02 M EDTA. Výrobu agarózového gélu: 1 g agarózy a 10 ml TBE puforu a doplnili na objem 100 ml destilovanou vodou. Vizualizácia fragmentov DNA sa robila pomocou UV vizualizátora, Vzorka DNA na gél bola 10 µl, 10 µl EtBr , 1 µl GelRed a 3 µl hmotnostného DNA markéra (100 bp).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tejto modelovej PCR reakcii, sme skúmali možnosti detekcie zeleru prítomného vo vzorke. Vzorky boli pripravené desiatkovým riedením s koncentráciou od 100 % až 0,000001 %. Súčasťou kontroly fungovania reakcie boli aj negatívna kontrola, ktorá nepreukazovala žiadnu reakciu na prítomnosť zeleru vo vzorke. Touto metódou sa nám podarilo určiť v modelových podmienkach detekčný limit stanovenia zeleru vo vzorke. Detekčný limit bol stanovený na 0,01 %, čo predstavuje 100 ppm. Výsledky tejto modelovej reakcie znázorňujú aj obrázky č. 2 a 3.



Obrázok 2 Gélová elektroforéza (150V, 15 min)



Obrázok 3 Gélková elektroforéza (125V, 60 min)

Na obrázku č. 2 je elektroforeogram s líniami M – hmotnostný marker 100 bp, dráha 1 -100 % zeleru, dráha 2- 10 % zeleru, 3- 1 % zeleru, 4 – 0,1 % zeleru, 5 – 0,01, 6-0,001 %, 7- 0,0001 %, 8 – 0,00001 %, 9 – 0,000001 % zeleru vo vzorke, dráha č. 10 – neaktívna kontrola.

Detekcia zeleru bola pozorovaná v dráhach č. 1-5. V dráhach 6-10 neboli pozorované žiadne fragmenty DNA, ktoré by naznačovali prítomnosť DNA vo vzorke. Detekčný limit, ktorý sa nám podarilo stanoviť pri detekcii zeleru bol 0,01 % čo predstavuje 100 ppm. Na obrázku č. 3 môžeme vidieť elektroforeogram, s tými istými riedeniami ako na obrázku č. 1. Táto elektroforéza prebiehala pri 125 V, po dobu 60 minút. Tento variant sa nám potvrdil predchádzajúce výsledky, pričom viditeľnosť fragmentov DNA bola oveľa lepšia.

Táto metóda detekcie zeleru má detekčný limit 100 ppm, čo stačí na orientačné stanovenie prítomnosti zeleru.

Na presnejšie stanovenie obsahu zeleru vo vzorke, je výhodnejšie použiť metódy s vyššou citlivosťou, ako sú real time PCR ,alebo SYBRGreen PCR tak, ako to uvádzajú (Wu et al., 2010). Táto metóda, ktorú sme použili na skriningové zistenie prítomnosti zeleru v potravinách.

ZÁVER

Metóda, ktorú sme použili na stanovenie obsahu množstva zeleru v potravinách má detekčný limit 100 ppm. Tento detekčný limit, umožňuje rýchle zistenie prítomnosti zeleru v potravinách. Stačí preto na skriningové stanovenie obsahu zeleru vo vzorke. Na základe ako sa zmenšuje intenzita fragmentov DNA sa dá urobiť semikvantifikácia prítomnosti zeleru vo vzorke.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BALLMER-WEBER, B.K. – HOFFMANN, A. – WÜTHRICH et al. 2002. Influence of food processing on allergenicity of celery: DBPCFC with celery spice and cooked celery in patients with celery allergy In *Allergy*, 2002, 57, 228-235.

BULBILN, M. – RADAUER, C. – WILSON, I. B. et al. 2003. Cross-reaction N-glycans of Api g 5, a high molecular weight glycoprotein allergen for celery, are required for immunoglobulin E binding and activation of effector cells from allergic patients. *FASEB*, 2003, 17, 1697-9.

Directive 2003/89/EC of 10 November 2003 amending Directive 2000/13/EC as regards indications of the ingredients present in Food stuffs. In, *Off J Eur Union* .2003. L308:15–18

DOVIČOVIČOVÁ, L. – OLEXOVÁ, L. – PANGALLO, D. - SIEKEL,P. - KUČHTA,T. 2004. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of celery (*Apium graveolens*) in food. In *Eur Food Res Technol* vol. 218, p. 493–495.

ETESAMIFAR, M. - WÜTHRICH, B. 1998. IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergie bei 383 Patienten unter Berücksichtigung des oralen Allergie-Syndroms. In *Allergologie* 1998; vol.21, p. 451-7.

HENGEL, A. J. 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. In: *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, vol. 389 p.111–118.

SICHERER, S. H.- MUNOZ-FURLONG, A. –MURPHY, R. –WOOD, R. A. – SAMPSON, H. A . 2003. Symposium: Pediatric Food Allergy In *Pediatrics* vol.111, p.1591–1594.

WU ET, AL. 2010. SYBR Green Real-Time PCR used to detect celery in food. In *Journal of AOAC international*. vol. 93, no. 5, 2010.

WÜTHRICH, B. 2000. Lethal or life-threatening allergic reactions to food. In *J. Investig. Allerg. Clin. Immunol.* vol.10,p.59–65.

Pod'akovanie

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0619/10.

Kontaktná adresa

Andrea Jurčáková, Katedra hygieny bezpečnosti potravín, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko, Email: andrea.jurcakova@gmail.com