

# A búzaliszt gliadin tartalmának vizsgálata ELISA módszerrel

*Aubrecht Erzsébet és Tóth Árpád*

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet

Érkezett 1991 május 17.

Néhány aestivum búzafajtából előállított liszt alkalmas jó minőségű élesztős kenyér készítésére, míg más fajtákból kiváló keksz gyártható, a durum búzafajták pedig a száraztészta kiváló alapanyagai. A búzafajták ezen tulajdonsága a búza tartalékfehérjéinek egyedülálló sajátosságán alapul, hogy a búzamazgából előállított őrleményből tészta készíthető, melyből a keményítőt kimosva rugalmas, alakítható massa, a sikér marad vissza. A sikér mennyisége és minősége a búzafajtára jellemző minőségi mutató, a különböző analitikai módszerekkel becsült mennyisége igen fontos a fajta megítélése szempontjából.

A klasszikus gabonafehérje-kémia [1] nyomán a 70 %-os vizes etanolban oldható fehérjéket tekintik gliadinoknak, a híg savval, luggal oldhatókat gluteineknek. Irodalmi források [2] szerint a gliadinok oldatban mint egyedi polipeptid láncok komplex keverékei vannak jelen a disszociáló oldószerben, a glutenin pedig aggregátumok formájában.

Vizsgálatunkban a gliadin mennyiségi becslését tűztük ki célul, ahol a 70 %-os etanolban és 50 %-os propanolban oldódó fehérje mennyiségét tekintjük antigénnek. A teljes nyers gliadin mennyiségi becslését ELISA módszerrel végeztük el. Ezt a módszert azért választottuk, mivel az ELISA módszer lényege, hogy kis anyagmennyiségek kimutatására alkalmas, érzékeny és nagy specificitású. Az antitesttel kapcsolt enzim szintelen vegyület, mely a szubsztráttal színes vegyületet hoz létre, és a színintenzitás mérhető optikai denzitás alapján, mely arányos az antigén, vagy az ellenanyag mennyiségével. A gliadinok kvantitatív becsléséhez a fehérjék térszerkezetének lerombolása nélkül szükséges a méréseket elvégezni [3].

Az ELISA tesztekhez nyulakban fejlesztett poliklonális immunszérumot alkalmaztunk, mely a teljes gliadin külső építőpokkal adott reakciót [4], [5] munkája alapján mértük. Az agliadin immunszérum IgG-t tormaperoxidázzal kapcsoltuk [6]. Az enzim szubsztrátjaként TMB-t (3,3',5,5'-tetrametil-benzidin-dihidro-klorid) alkalmaztunk. A különböző fajtájú búzalisztek gliadinmennyiségi becslését [7] dolgozata alapján végeztük el.

## Anyagok és módszerek

Az antigént, a gliadint 9 fajta búzából: Mv-4, Mv-8, Mv-9, Mv10, Mv-15, Mv-16, Mv-14-85, Mv-21, Mv-107-85 nyertük ki. A búzafajtákat az ELTE Növényélettani Tanszékétől kaptuk. 1 g őrleményt 10 ml 50 %-os propanollal vagy 70 %-os etanollal

mérsékelt lassú keverés mellett felszuszpendáltuk, majd két óra hosszat 37 °C-os vízfürdőre tettük. Ezt követően két órán át mágneses keverővel kevertük, majd 10 percig 10000 rpm-mel lecentrifugáltuk. A felülúszót 1,5 %-os NaCl-dal lecsaptuk és a sóban oldódó fehérjét kioldottuk, a 10000 rpm centrifugálás után a csapadékot gyűjtöttük. A csapadékot alkoholban oldottuk és a sóoldat hozzáadásával a sóban oldódó fehérjét eltávolítottuk. A műveletet háromszor ismételtük. Az alkoholban visszaoldott csapadékot dializáló csőbe töltöttük és desztillált vízzel szemben 24 órán keresztül dializáltuk, a desztillált víz többszöri cseréje mellett.

A poliklonális antitestet nyulakban fejlesztettük, az állatokat a Gödöllői Kisállattenyésztési Kutató Intézet gödöllői telepén vásároltuk. A teszttállatok súlya, neme azonos volt. Az antigént (gliadint) 0,01 M ecetsavval és a Human Oltóanyagtermelő és Kutató Intézettől vásárolt komplett immun adjuvánnal oltottuk. A hiperimmun szérum előállításához az injektlási adag felét a combizomba, míg a másik felét a bőr alá fecskendeztük 20 tűszúrással.

Az ELISA vizsgálatokhoz a polipropilén mikrotiter lemezeket a súlysápi Műszeripari és Műanyagfeldolgozó GMK-tól vásároltuk. Az összes vegyszer analitikai tisztaságú volt, melyeket a REANAL-tól szereztünk be.

A kötő karbonát pufferhez 2,688 g NaHCO<sub>3</sub> és 1,908 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot mértünk be, melyet 1000 cm<sup>3</sup>-re töltöttünk fel desztillált vízzel, majd pH 9,6-ra állítottunk be. A hígító és mosópufferként PBS-t használtunk, melyhez 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,68 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–2H<sub>2</sub>O és 0,27 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-et 1000 cm<sup>3</sup>-re töltöttük fel, az oldat pH-ját 7,4-re állítottuk be. A mosópuffer 1 % Tween 20 detergenst tartalmazott. A konjugátumot [6] szerint állítottuk elő tormaperoxidáz enzimmel, az enzimet a KÉKI Biomérnöki Osztálya állította elő kromatográfiásan.

Az előállított immunszérum titerét indirekt ELISA módszerrel határoztuk meg. A 96 lyukú mikrotiter lemezt a 1 mg/cm<sup>3</sup> gliadin ötszörös hígításának tova futó hígítási sorozatával borítottuk, a hígítást a kötőpufferrel végeztük (1000 µg, 200 µg, 40 µg, 8 µg, 1600 ng, 320 ng, 64 ng, 12 ng), mely oldatokból 100-100 µl-t mértünk be a lemez vályataiba. A lemezt 4 °C-on egy éjszakán át hűtőszekrényben inkubáltuk. Ezt követően a lemezt háromszor PBS-Tween oldattal mostuk és törlőruhához ütögetve jól kiszárítottuk. A lemezre felmértük az immunizáció során kapott pozitív szérumok tova futó hígítást 80, 160, 320, 640, 1280, 2560, 5020 és 10040, a negatív és a gyengén pozitív szérummal együtt és az előzővel azonos módon hígítva. A bemért mennyiség 100-100 µl/lyuk. Két órás inkubálással 37 °C-on létrejött az antigén és antitest reakció, melyet a második tormaperoxidázzal jelzett antitesttel jeleztünk. A mosást és szárítást követően az anti-nyúlkecske HRP 250-szeres hígításának 100-100 µl-ét mértük fel a lemezre és 2 órát inkubáltuk 37 °C-on. A háromszoros mosás és az ezt követő szárítás után a lekötött ellenanyagot ABTS vagy TMB szubsztráttal jeleztük.

Jelenlegi munkánkban a TMB szubsztráttal kapott eredményekről számolunk be. A TMB 42 mMol mennyiségét DMSO-ban oldottuk és 0,1 M Na-acetáttal hígítottuk, melyből 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hozzáadása után a mikrotiter lemezre mértük 100-



100  $\mu$ l mennyiséget. 5 percig inkubáltuk és 50  $\mu$ l 2 M  $H_2SO_4$ -el leállítottuk a folyamatot, a mérést 449 nm-en végeztük.

A gliadin mennyiségi becslését szendvics ELISA módszerrel végeztük. A lemezt borítottuk az általunk előállított poliklonális immunszérum IgG 1:160 szoros hígításával, melyet egy antitestet a PBS-Tween mosópufferrel kimostuk és törlóruhához ütögetve kiszárítottuk. A teljes gliadinból a standard sort felmértük, mely a következő volt: 3000 ng, 1000 ng, 300 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng. A különböző fajtájú búzákból előállított lisztek 70 % etanolban és 50 % propanolban oldott gliadin mennyiségét mértük fel az aktuális hígításban, mely 50x, 100x és 300x hígítást jelent. A két órás 37 °C-os inkubációt követően háromszor mostuk a lemezt és alaposan kiszárítottuk. A saját konjugátumunk, melyet [6] szerint állítottunk elő és 100 szoros hígításban mértünk fel. Az inkubálási mosási lépéseket az előzőek szerint végeztük. A TMB szubsztrátot az indirekt ELISA-nál leírtaknak megfelelően alkalmaztuk. Az optikai denzitások sorozatos mérése alapján a gliadin mennyiségeket becsültük.

### A mérési eredmények értékelése

Az 1. táblázatban a mikrotiter lemezeire felmért gliadin mennyiségét ng-ban tüntettük fel és a mért extinkció értékeit adtuk meg, mely mérési eredmények TMB szubsztrátra vonatkoznak. A standard görbét különböző időpontokban mért értékekből képzett átlag és a hozzá tartozó gliadin változó közötti két változós regressziós analízist végeztünk 1. ábra. A nem lineáris illesztések körül az exponenciális modell statisztikai paraméterei adták a legjobb eredményt, melynek egyenlete:

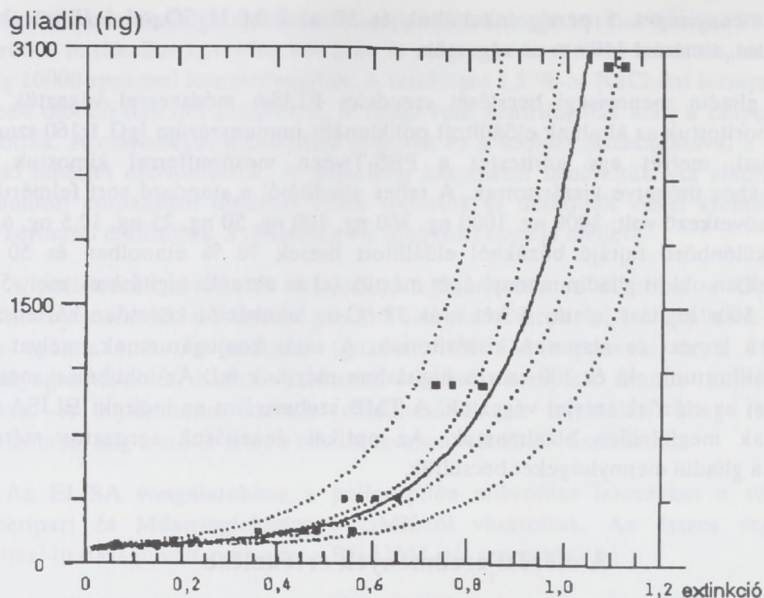
$$y = \exp(a+bx).$$

1. táblázat

Az ELISA lemezeire felmért gliadin mennyisége és a TMB szubsztráttal mért extinkció értékek átlaga különböző mikrotiter lemezekon

Sor	Gliadin (ng)	A mikrotiter lemezekon mért extinkció átlagértékek			
		x1	x2	x3	x4
1	3000	1,086	1,082	1,094	1,119
2	1000	0,719	0,811	0,753	0,820
3	300	0,519	0,584	0,550	0,632
4	100	0,338	0,461	0,431	0,534
5	50	0,158	0,306	0,207	0,347
6	25	0,041	0,122	0,108	0,194

A modell (görbe) felállításának helyességét a 2. táblázat variancia analízise igazolja (F próba).



1. ábra: A különböző időpontokban szendvics ELISA módszerrel mért extinciók átlaga a 0 - 3100 ng gliadin tartományra

2. táblázat

A regressziós analízis szignifikancia próbája

	A négyzetek összege	Szabadságfok	F arány	A próba szintje
Modell	111,82	1	569,07	0,000
Hiba	5,50	28		
Összes	117,32	29		
Korrelációs koefficiens (r) = 0,976				
A becslés standard hibája (sec) = 0,443				

A vizsgálati módszernél leírt mintaelőkészítéssel a különböző gliadin tartalmú búzalisztek elkülöníthetők. A nem hőkezelt gabona alapú élelmiszer nyersanyagok glutén tartalma becsülhető a mért gliadin tartalom alapján.

A módszereknél leírt antigén előkészítésű gliadinok visszamérése megbízható. A mintaelőkészítés egyszerűbb módja esetén a gliadin becslésekor ez nem egyértelmű.

A vizsgálatok alapján szerzett tapasztalatok azt mutatják, hogy a poliklonális és a specifikus monoklonális ellenanyagok összehasonlító és kombinált alkalmazása szükséges.



## IRODALOM

1. Osborne, T.B.: The proteins of the wheat kernel Cornege Inst. Washington, 1907. Washington, D.C.
2. Jackson, E.A., Holt, L.M., Payne, P.J.: Characterization of molecular weight glutenin subunits of wheat endosperm by two dimensional localisation of their controlling genes (1983) *Theor. Appl. Genet.* **56**, 29-35
3. Miles, E.N.C.: A two-site enzyme-linked immunosorbent Assay for wheat gliadins (1989). *Food and Agricultural Immunology* **1**, 19-27
4. Troncone, R., Vitale, M., Donatiello, A., Farris, E., Rossie, G.: Sandwich immunoassay for wheat gliadin *Immunol. Methods* **92**, 21-23 (1986)
5. Aubrecht, E.: A búzalisztek minősítésének lehetősége ELISA módszerrel *Élelméleti Ipar* **7**, 260-265 (1991)
6. Nakane, P.K., Kawaoi, A.: *Histochem. Cytochem* **22**, 1084-1089 (1974)
7. Skerritt, J.H., Diment, J.A., Wrigley, C.W.: A sensitive monoclonal antibody based test for gluten detection. Choice of primary and secondary antibodies *J.Sci. Food. Agric.* **36**, 995-1003 (1985)

### A búzaliszt gliadin tartalmának vizsgálata ELISA módszerrel

*Aubrecht, E. és Tóth, Á.*

A különböző búzafajtából kiőrölt liszt eltérő tartalék fehérje összetétele miatt alkalmas arra, hogy késztermékek sorát állítsák elő belőle, ezért igen fontos a különböző összetételű lisztek elkülönítése. Vizsgálatainkban 9 féle martonvásári búzafajtából előállított örleményből 70 %-os etanollal és 50 %-os propanollal oldottuk ki a gliadin antigént. A sóoldatban oldható fehérjéket 1,5 %-os NaCl-ban távolítottuk el. Az ELISA tesztekben nyulakban fejlesztett poliklonális immunszérumot alkalmaztunk. Konjugátumként tormaperoxidázzal kapcsolt nyúl IgG-t alkalmaztunk. A TMB szubsztráttal mért extinkció értékek átlagából a standard görbét mértük ki ismert mennyiségű gliadin adagolásával. A sandwich ELISA-val mért eredmények alapján megállapítható, hogy az oldékonyság különbség alapján előállított gliadin mennyiségek visszamérhetőek. A mintaelőkészítés egyszerűbb módja esetén az nem egyértelmű.

## **Investigation into the Gliadin Content of Wheat Flour by ELISA Method**

*Aubrecht, E. and Tóth, Á.*

Flours extracted by milling from different wheat varieties are suitable for the production of series of finished goods because of their different reserve protein composition. For this reason it is important to separate the flours of different composition. In the course of the present study the gliadin antigen was dissolved with 70 % ethyl alcohol and 50 % propyl alcohol from grists, prepared from 9 different wheat varieties of Martonvásár. Saline soluble proteins were removed with 1.5 % NaCl solution. Polyclonal immun serum developed in rabbits were used in the ELISA tests. Rabbit IgG linked to horse radish peroxidase was used as conjugate. The standard curve was determined from the average of extinction values measured with TMB substrate, adding known amounts of gliadin. From the results of sandwich ELISA measurement it can be concluded that the amount of gliadin prepared on the basis of solubility differences can be recovered. This is not unambiguous using a more simple sample preparation.

## **Untersuchung des Gliadiningehaltes vom Weizenmehl mit der ELISA-Methode**

*Aubrecht, E. und Tóth, Á.*

Das aus verschiedenen Weizensorten gemahlene Mehl ist infolge der Zusammensetzung des Reserveeiweisses dafür geeignet, eine ganze Reihe von Fertigprodukten herzustellen. Deshalb ist die Trennung der Mehle von verschiedener Zusammensetzung sehr wichtig. In unseren Untersuchungen wurde das Gliadin-Antigen aus dem Mahlgut mit 70 %-igem Ethanol und mit 50 %-igem Propanol ausgelöst. Die in Salzlösung löslichen Eiweißstoffe wurden in 1,5 %-iger NaCl-Lösung entfernt. Für die ELISA-Methode wurde ein in Hasen entwickeltes polichlonales Immunserum eingesetzt. Als Konjugat wurde ein mit Merrettich verbundenem Hasen-IGG angewandt. Die Mittelwerte der mit TMB-Substrat gemessenen Extinktionswerte ergaben die Standardkurve unter Dosierung von bekannten Gliadinmengen. Auf der Grundlage der mit Sandwich-Elisa gemessenen Ergebnisse kann festgestellt werden, daß die nach der Löslichkeitsdifferenz hergestellten Gliadinmengen können wiedergefunden werden. Bei einfacherer Probenvorbereitung ist es dagegen nicht eindeutig.