

# Ověření imunochemické metody Western blot pro identifikaci alergenů soji

Milena Kmínková, Alexandra Prošková, Jiří Kučera  
Výzkumný ústav potravinářský Praha v.v.i., Radiová 7, 102 31 Praha 10

## Souhrn

K ověření přítomnosti alergenů soji v potravinářských výrobcích byla použita imunochemická metoda Western blot. Hlavní alergeny soji glycinin a  $\beta$ -conglycinin, které tvoří 70% celkových bílkovin, byly izolovány na našem pracovišti a následně použity jako antigeny pro tvorbu slepičích protilátek typu IgY. Tyto protilátky po zaočkování nosnic přecházejí do slepičích vajec, ze kterých byly izolovány. Poté byla sledována imunoreakce získaných protilátek uvedenou metodou. Kontrolovali jsme jednak samostatně vzorky glycininu a  $\beta$ -conglycininu a dále různé výrobky z potravinářské sítě, a to se sojou a i bez ní (tofu natural s mořskou solí, tofu zeleninové s mořskou solí a směsí zeleniny, párek se sýrem a sojou, dětský párek se sojou 0,4%, mini klobáska se sojovou bílkovinou 4%, poličan, spíšský párek, vepřové maso a rybí file). Přípravu extraktů z každého vzorku je nutno individuálně modifikovat. Osvědčilo se odtučnění vzorku před extrakcí, poté ultrafiltrace a lyofilizace ke zvýšení koncentrace bílkovin.

Byla prokázána možnost využití protilátky IgY antiglycininu a anti- $\beta$ -conglycininu pro detekci alergenů soji v extraktech ze soji. Testovanou metodu Western blot je možno použít přímo pro sojové výrobky (např. Tofu), kde je dostatečně citlivá. Pro výrobky, které obsahují pouze malé přídavky soji (párky a klobásky) není pro průkaz alergenů těmito protilátkami vhodná. Výsledek je tedy obecně použitelný pro detekci alergenů glycininu a  $\beta$ -conglycininu soji tam, kde je soja majoritní složkou.

## Úvod

Sojové boby obsahují 32% extrahovatelných bílkovin, z kterých je několik alergenů. Mezi hlavní alergeny patří glycinin (frakce 11S) a  $\beta$ -conglycinin (frakce 7S), které jsou současně hlavními rezervními proteiny soji, neboť tvoří 70% celkových bílkovin. Bohužel jejich standardy nejsou komerčně dostupné. Další alergeny jsou již přítomny v menším množství (např. Gly m Bd 30 a trypsin inhibitor). Komerčně dostupné protilátky jsou pouze proti trypsin inhibitoru a celkovým sojovým bílkovinám jako součást ELISA kitů. Alergie na sojové bílkoviny se projevuje v několika oblastech, a to jako astma a jiná dýchací onemocnění, kožní ekzemy, vyrážky případně žaludeční nevolnosti. Cílem pro sledování těchto alergenů bylo vypracovat metodu detekce a případně stanovení, které bude možno využívat jak v hotových výrobcích, tak během technologického procesu.

## Materiál a metody

### Isolace

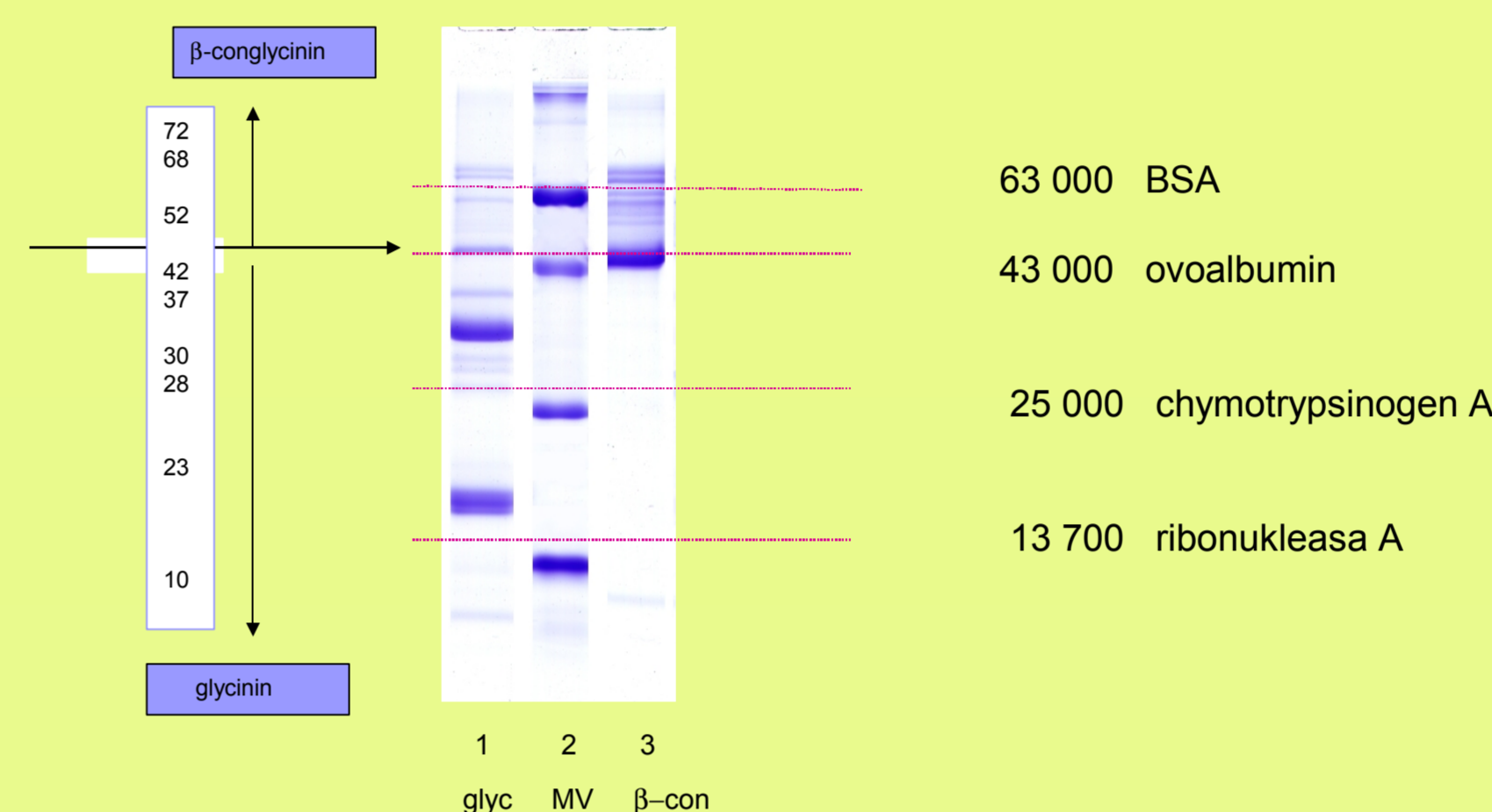
Isolace alergenů byla provedena frakčním srážením dle Wu et al. s modifikací dle Nagano et al. Identifikace a čistota těchto bílkovin byla kontrolována elektroforézou SDS-PAGE.

### Protilátky

Slepičí protilátky k našim izolovaným alergenům byly vyrobeny imunizací slepic včetně kontrol z vajec příslušných slepic před imunizací na zakázku od firmy HenAntibody s.r.o. anti-glycinin I 130106, kontrola I 130106, anti-glycinin II 220206, kontrola II 220206, anti- $\beta$ -conglycinin I 050106, kontrola I 050106, anti- $\beta$ -conglycinin II 090106, kontrola II 090106, sekundární protilátka značená peroxidasou, sekundární protilátka anti-chicken IgY –peroxidase, produkované v králíkovi, Sigma

## Cíl

- Isolace glycininu a  $\beta$ -conglycininu jako antigenů pro vytvoření protilátek ve zvířecím organismu
- Příprava protilátek
- Isolace glycininu a  $\beta$ -conglycininu jako standardů
- Použití protilátek v imunologické metodě Western Blot s možností detekce uvedených alergenů v potravinářských výrobcích



Obr.1. Elektroforéza – identifikace podjednotek glycininu a  $\beta$ -conglycininu

## Příprava vzorku

### Extrakce:

Postup byl zaměřen tak abychom získali čirý roztok s odpovídající koncentrací bílkovin, vhodný pro elektroforézu a následný blot. Příprava každého vzorku tedy byla jiná, všechny ale byly extrahovány do pufru 0,03M Tris-HCl, pH 7,5.

### Obecný postup:

Rozkrájení, dezintegrace, míchání 1hod, ochlazení v lednici, filtrace, odstředování, u tučných vzorků odtučnění n-hexanem opět ochlazení a filtrace k odstranění tuku. V případě nízké koncentrace bílkovin ultrafiltrace na Amiconu na membráně PM 10 event. dialýza v dialyzačním sítěvě proti destilované vodě v lednici 24 hod s výměnou vody.

## Elektroforéza a Western blot

### Elektroforéza vertikální

SDS-Page, 12,5% gel, napětí 150V, 40-60 $\mu$ g/jamku, délka nejčastěji 2hod 20min, teplota 5°C, pufr Tris-glycin, pH 8,3, zařízení Biometra MIV8.10.

### Western blot

blotování membrána nitrocelulosa s velikostí porů 45  $\mu$ m, napětí 150 V, počáteční teplota 5°C, po skončení 20°C (přístroj byl v lednici), doba 1 hod, transfer pufr: Tris-glycin-methanol, pH 8,3

## Vyvolání blotu

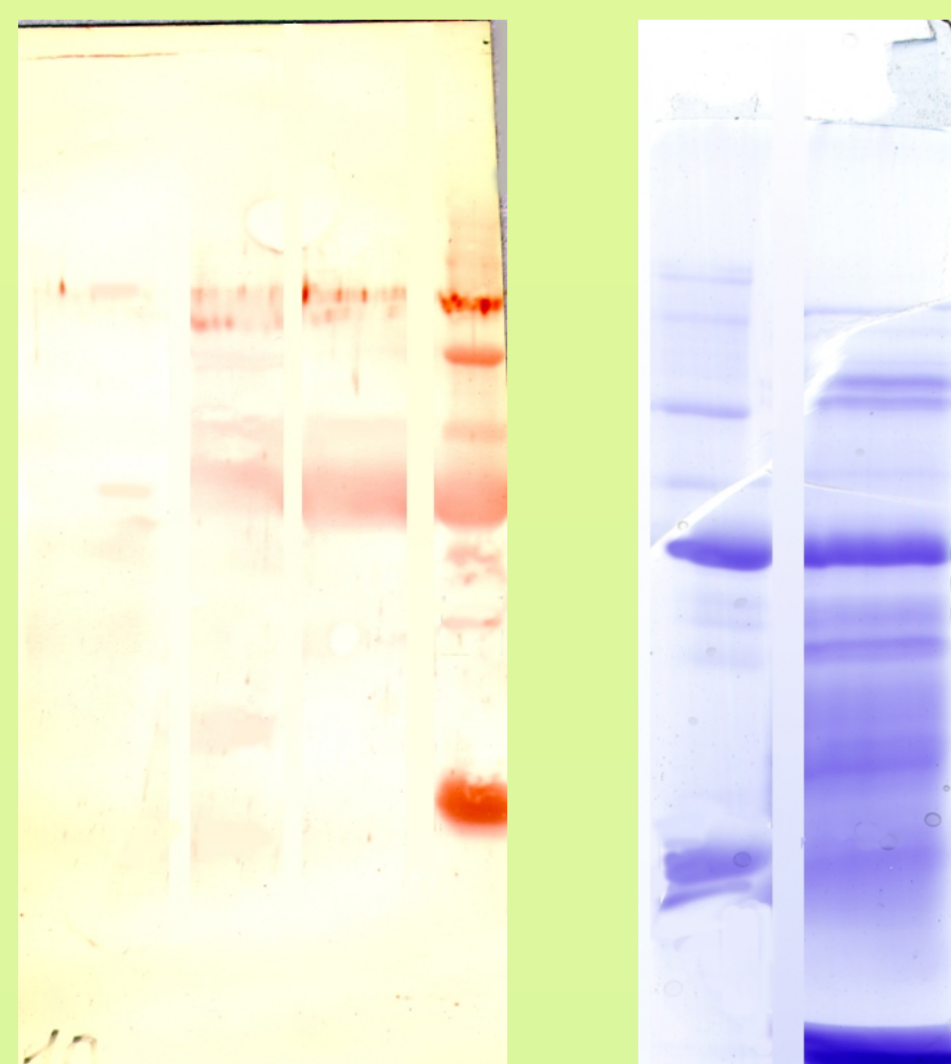
Rozdělené bílkoviny v gelu po elektroforéze se přeblovaly do NC membrány.

Vyvolání imunoreakcí je podle následujícího postupu :  
promytí : PBS + 0,05% Tween 20, 30 min,  
blokování nespecifických vazeb : PBS + 0,05% Tween 20 + 3% BSA, 60 min,  
primární protilátka : IgY ze slepičích vajec podle výběru, ředění různé (viz text u obrázků) v PBS+ Tween 20 + 3% BSA, 60 min  
promytí : PBS + 0,05% Tween 20 + 3% BSA, 3x po 5 min,  
sekundární protilátka : peroxidasový konjugát králíčí IgG proti slepičímu IgY, ředěno vždy 1000x v PBS + Tween 20 + 3% BSA, 60 min,  
promytí : 3x po 5 min v PBS + Tween 20, ustálení v 0,1M octanu Na, pH 5,2, 3 min,  
barvení : 8 ml 0,1M octan Na pH 5,2 + 42 ml roztoku chromogenu AEC(3-amino-9-ethyl carbazole)+ 100  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
zastavení reakce : PBS + 0,1% NaN<sub>3</sub> 5 min.

## Výsledky

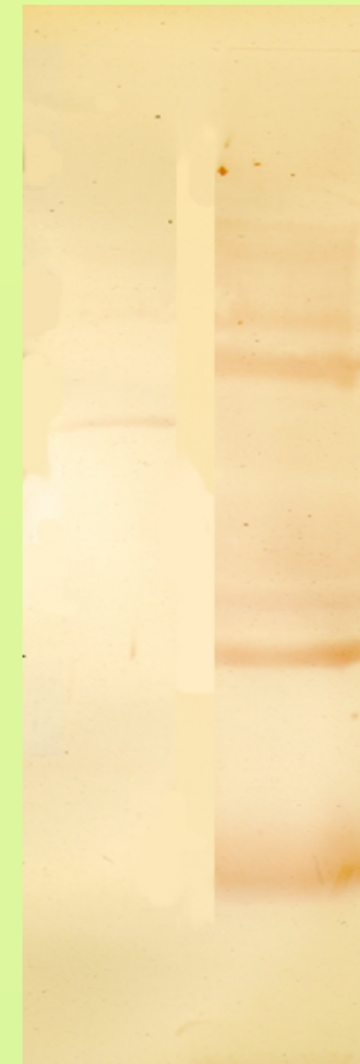
Získané protilátky anti-glycinin a anti- $\beta$ -conglycinin byly testovány na konkrétních výrobcích z potravinářské sítě. Na obr. č.2 při použití anti-glycininu jsou porovnány sojové výrobky tofu zeleninové (TZ), tofu natural (TN), klobáska (KL), která obsahuje pouze 4% soji, s izolovaným glycininem (glyc) ze sojových bobů. U TZ i u TN jsou dobře viditelné pružky podjednotek glycininu o molekulových vahách 42 000 a 37 000. U klobásky je přítomnost tohoto alergenu neprukazná. Na obr. č. 3 je srovnán spíšský párek (s.p.), který neobsahuje soju opět s izolovaným glycininem se sojových bobů. Z výsledku je patrné, že sledovaný alergen skutečně není přítomen. Při použití protilátky anti- $\beta$ -conglycinin je z obr. č. 4 patrná u TZ především přítomnost jedné z podjednotek  $\alpha$  alergenu  $\beta$ -conglycininu o molekulové váze cca 70 000. U párku se sýrem, který obsahuje pouze malé množství soji, je přítomnost  $\beta$ -conglycininu neprukazná.

Obr.2. Blot a gel vzorky klobáska soja 4%, tofu zeleninové, natural, glycinin, protilátka anti-glycinin I



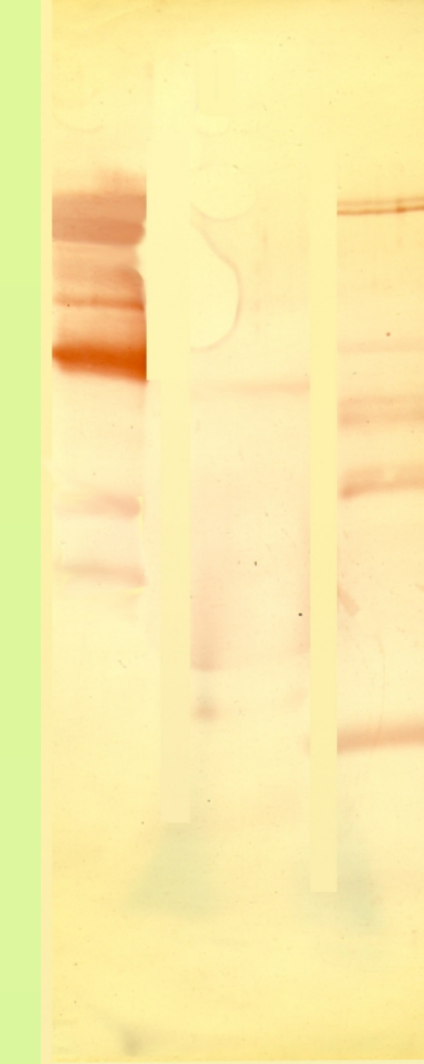
anti - glycinin

Obr.3. Blot vzorky spíšské párky, glycinin, protilátka anti-glycinin I



anti - glycinin

Obr.4. Blot vzorky párek se sýrem obs. soju, tofu zeleninové,  $\beta$ -conglycinin, protilátka anti-  $\beta$ -conglycinin I



anti -  $\beta$ -conglycinin

## Závěr

Byla prokázána možnost využití protilátky IgY antiglycininu a anti- $\beta$ -conglycininu pro detekci příslušných majoritních alergenů soji tj. podjednotek glycininu a  $\beta$ -conglycininu v extraktech ze soji metodou Western blot. Tuto metodu je možno použít přímo pro sojové výrobky (např. Tofu), kde je dostatečně citlivá. Pro výrobky, které obsahují pouze malé přídavky soji (párky a klobásky) není pro průkaz alergenů těmito protilátkami vhodná. Výsledek je tedy obecně použitelný pro detekci podjednotek alergenů glycininu a  $\beta$ -conglycininu soji tam, kde je soja majoritní složkou.

## Literatura

Nagano T., Hirihuka M., Mori H., Kohyama K., Nishinari K.J.: Agric Food Chem 40, 941-944,1992  
Wu S., Murphy P.A., Johnson L.A., Fratzke A.R., Reuber M.A.: JAOCS, Vol. 76, 3, 285-293, 1999