

Ing. Milena Kmínková, Ing. Alexandra Prošková
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.

Úvod

Práce byla zaměřena na přípravu vhodného extraktu z jablek, které obsahovaly jeden z hlavních alergenů jablek Mal d1 a na identifikaci tohoto alergenu imunometodou Western blot pomocí sér pacientů, prokazujících alergické reakce v prick to prick testech. Alergenů v jablku je několik a jsou zastoupeny v různém množství. Nejvíce je tato skutečnost ovlivněna odrudou jablka. Vážnost alergie závisí na síle alergické reakce pacienta, na ten který alergen. Majoritním alergenem je Mal d1 o mol. váze 18 kDa. Ten je nejvíce obsažen v odrudě Golden delicious. Všichni pacienti ale nereagují jen na tento alergen, ale mnoho z nich současně nebo i výhradně na další závažný alergen Mal d3 s mol. vahou 31 kDa. Zdá se, že alergen Mal d1 je nejdůležitější alergen jablka ve střední Evropě kvůli vysokému stupni sekvenční homologie s alergenem břízy Bet v1. Na rozdíl od jižní Evropy, kde převážně účinkuje Mal d3, který nemá křížové reakce s Bet v1. Ostatní alergeny nemají už tak velký význam, protože jsou v jablku v malém množství.

Materiál a metody

Materiál

Jablka - Golden Delicious z obchodní sítě a ze skladu v Tuchorazi, skladovaná pod řízenou atmosférou dusíku.

Séra pacientů, alergických na jablko - Imumed.

Protilátky anti-human-IgE in goat, anti-goat-IgG -biotin in rabbit, konjugát streptavidin-peroxidasa, substrát peroxid s TMB a chemikálie pro elektroforezu - firma Sigma-Aldrich.

Membrány s velikostí porů 0,2 nebo 0,45 μm - Whatman

Ostatní chemikálie jsou chemicky čisté.

Přístroje

Elektroforeza Mini V-8.10, blotovací zařízení Mini-Twin, chlazené vodou a třepačka na gely -Biometra.

Ultrafiltrirací zařízení Centriprep s membránkou PM-10 -Amicon

Odstředivka Janetzki, pro Centriprep, chlazená

Stolní odstředivka pro přípravu vzorků Hettich 32R, chlazená

Mrazicí box na -30°C Elektrolux a na -28°C Whirlpool.

Chladnička Elektrolux pro chlazení průběhu elektroforesy.

Postup

Extrakce

Jablečná šťáva s kyselinou askorbovou se odstředí při 12 000 ot/min při 5°C, 20 min.

Přidá se 10mM pufr fosforečnan draselný, pH 7,4 s přídatkem 10 mM DIECA (diethylthiocarbamat, sodná sůl), 2mM EDTA-sodná sůl, 2% susp. PVPP (polyvinyl polypyrrolidon) v poměru 1:1 nebo 2:1 (extrakt:pufr) pro ochranu alergenu.

Po důkladném promíchání se odstředí při 18 000 ot/min, 5°C, 15 min.

(2). Upraví se pH na 9,5.

Pokud se zahušťuje ultrafiltrací, napipetuje se do patry Centriprep (PM 10) jablečná šťáva a odstředí se na odstředivce Janetzki při 2000 ot/min při 5°C 20 min. V retenátu se stanoví bílkoviny.

Příprava vzorků pro ELF

Vzorek se upraví pro elektroforezu přidávkem 10% sacharosu, 2% SDS a 5% mercaptoethanolu a barevný marker- bromfenolová modř. Zahřívá se ve vodní lázni při 100°C po dobu 5 min.

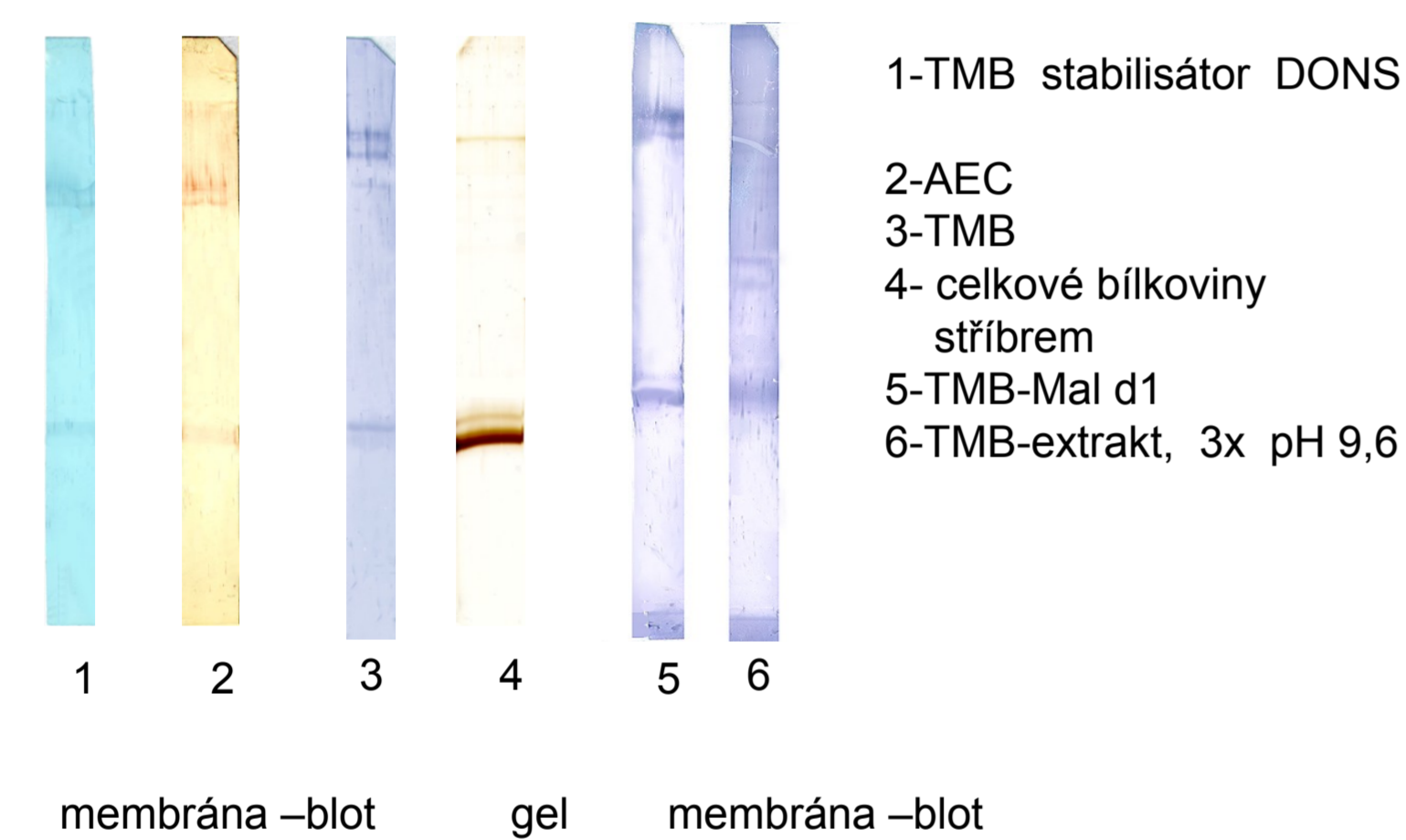
Elektroforeza

SDS-PAGE, rozdělovací gel je 12,5%, zaostřovací 5%, síla gelu 1,5 mm, pufr Tris-glycinový, pH 8,3, konstantní napětí 160 V, doba je 60 min.

Blot

Po elektroforese se gel ponoří na 20 min do vychlazeného transfer pufru Tris-glycin-methanol pH 8,3. Poté se navrství podložky, podložní papír, gel a membránka atd. podle návodu výrobce a umístí se do komory blotovacího zařízení. Pufr - glycin-methanol, pH 8,3, konstantní proud 350 mA, chlazení vodovodní vodou v průtoku max. 1l/hod, doba transferu 3 hod.

Barvení alergenu na membránci

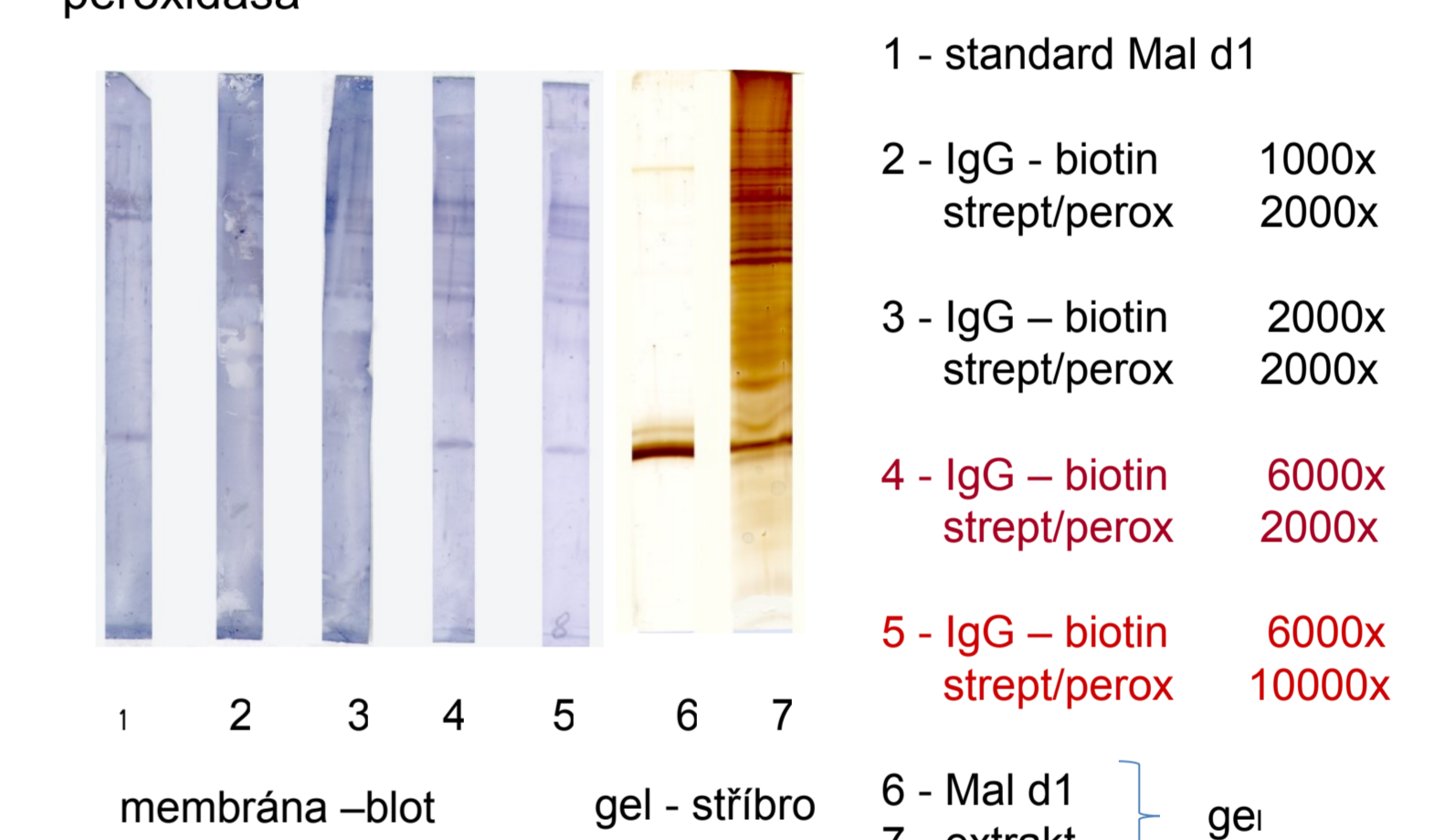


Tabulka - výsledný postup imunoreakce

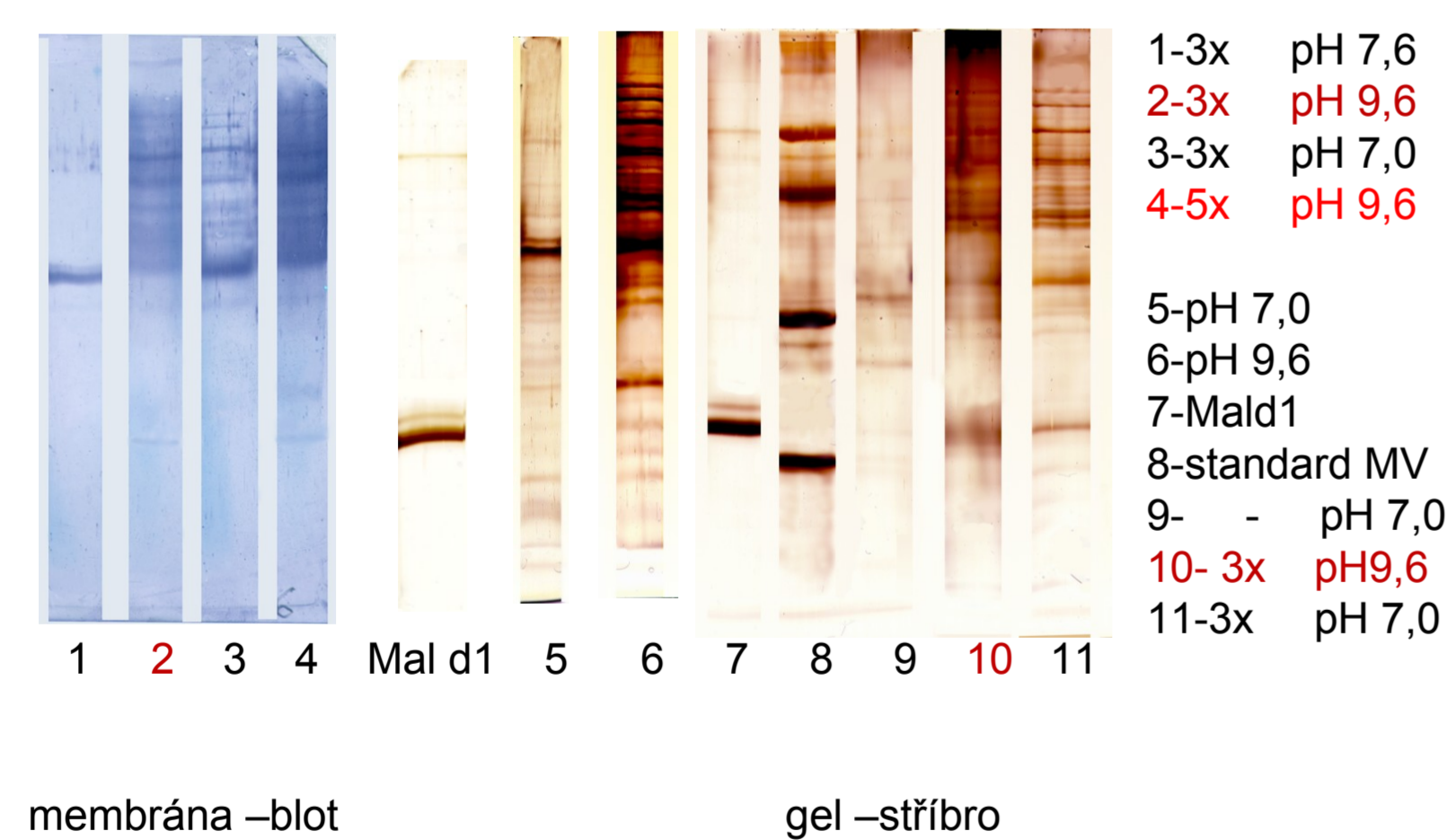
| Krok | Operace | Roztok | Doba |
|------|--|--|--------------------|
| 1 | Promytí | 0,01 fosf K + 0,15M NaCl pH 7,4 (PBS) + 0,05% Tween 20 | 30 min |
| 2 | Blokace | PBS+ 0,05% (v/v)Tween 20 + 0,3% BSA, pH 7,4 | 60 min |
| 3 | Sérum - specifická primární protilátka | sérum je ředěné 1:4 PBS+0,05% Tw. 20 +0,1% BSA | přes noc v lednici |
| 4 | promytí | PBS+ 0,05% Tween 20 | 3x 5 min |
| 5 | primární protilátka IgE | anti-human IgE in goat ř. -1:2000 | 60 min |
| 6 | promytí | 1x PBS+ 0,05% Tween 20 | 3x 5min |
| 7 | sekundární protilátka biotin | anti-goat IgG-biotin in rabbit 1:6 000 | 60 min |
| 8 | promytí | PBS+ 0,05% Tween 20 důkladně promýt (azid) | 4x5min |
| 9 | konjugát streptavidin-peroxidasa | streptavidin-peroxidasa 1: 10000 | 25 min |
| 10 | promytí | PBS+ 0,05% Tween 20 | 3x 5min |
| 11 | barvení | substrát-TMB s peroxidem | 3-5 min |
| 12 | stop | 5x promýt destil. vodou | |

Poznámka: před zahájením imunoreakce se membránka suší 30 min. na vzduchu

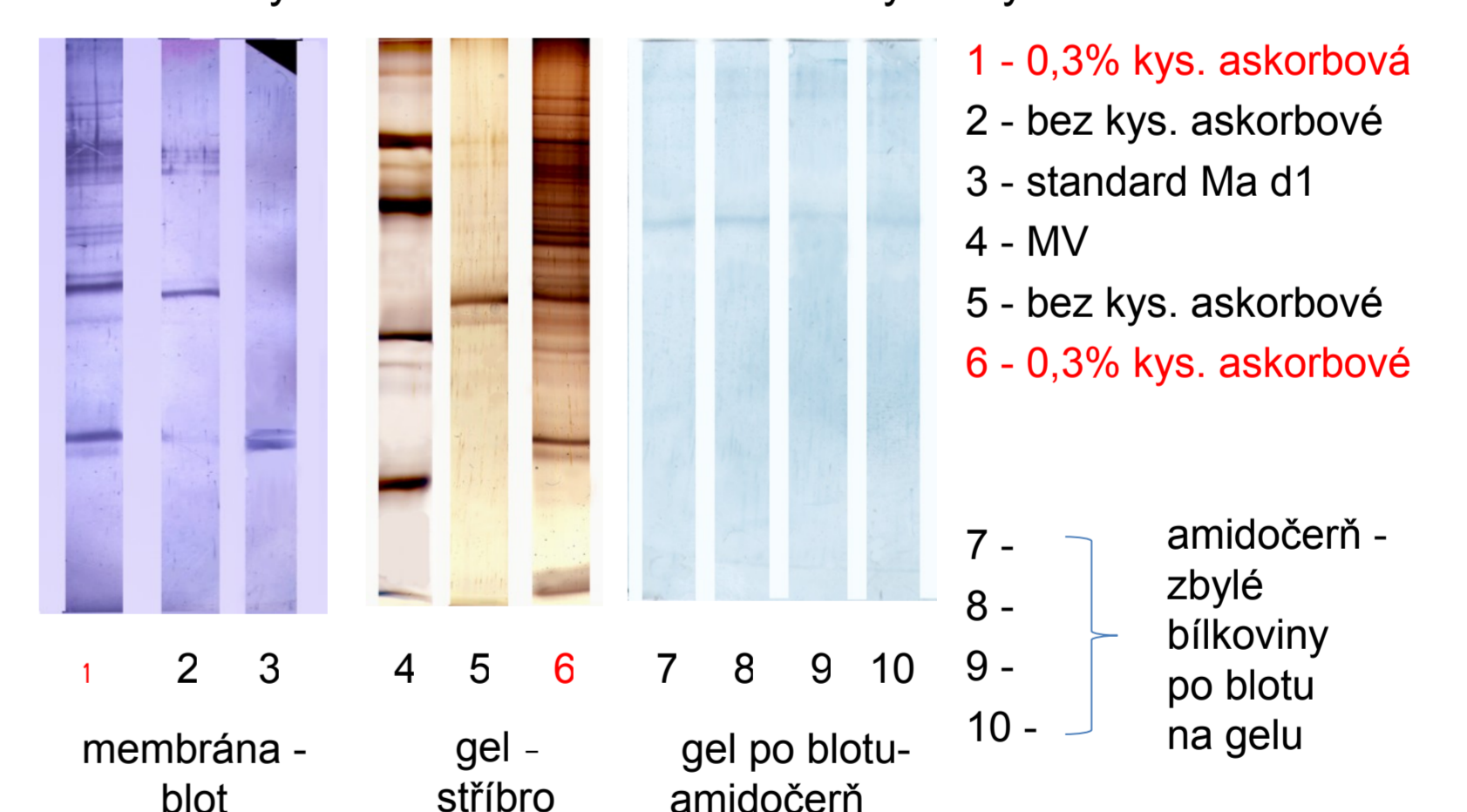
Sekundární protilátka IgG s biotinem a konjugát streptavidin-peroxidasa



Různá pH extraktu a zahuštění extraktu lyofilisací



Extrakt s kyselinou askorbovou a bez kyseliny askorbové



Závěr

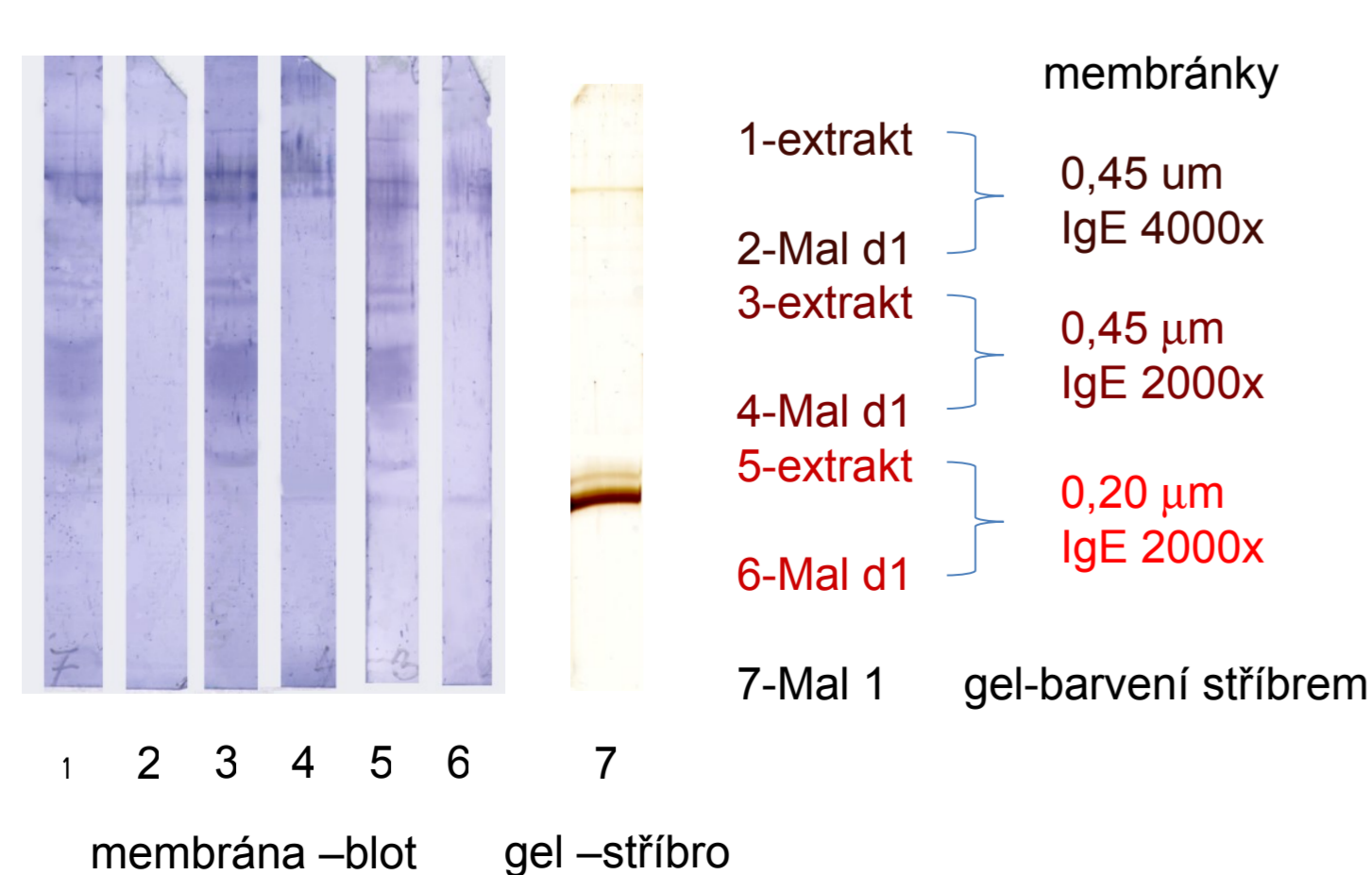
Vybrali jsme nejvhodnější extrakční pufr, kterým je 10mM fosfát K pH 9,5 s inhibitory enzymů, antibakteriálním agens a anti-oxidující kyselinou askorbovou.

Zajistili jsme vhodnou koncentraci sledovaných proteinů při elektroforese pro následnou imunoreakci metodou Western blot. Podmínky jsme podřídili blotaci.

Optimalisovali jsme postup reakce sér pacientů a alergenů a následně imunoreakci a barvení pro zviditelnění reakcí. Přesný postup je v tabulce.

Testovali jsme imunoreakce Mal d1 ve standardu a jednotlivá séra pacientů a později i účinky ostatních alergenů v jablku na séra.

Membránka 0,2 μm , 0,45 μm , primární protilátka IgE



Různými séry vyvolané Ma d1 v extraktu

