

Hodnocení alergenicity různých odrůd jablek z hlediska přítomnosti alergenu Mal d1

Kmínková¹ M., Prošková¹ A., Honzová² S., Šetinová² I., Paprštejn³ F.

¹ Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.

² Imumed s.r.o.

³ Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

V oblasti centrální Evropy je pěstování různých odrůd jablek velmi rozšířené. Na druhé straně přítomnost několika alergenů v jablečné dřeni a slupce přináší některým konzumentům alergické potíže. Zvláště se v této oblasti uplatňuje alergen Mal d1, který způsobuje otoky rtů a ústní dutiny. V současné době je velmi žádanou odrůdou Golden delicious s nalezeným vysokým obsahem tohoto alergenu. Vzorky šťáv různých odrůd jablek v současné době komerčně významných i starších tradičních českých odrůd byly podrobeny elektroforesi SDS-PAGE a následně obarveny redukováním stříbrem. Proužky bílkovin v místě alergenu Mal d1 (mol. váha 18 kDa) byly vzájemně porovnány a testy byly opakovány v průběhu roku s plody čerstvými a skladovanými na vzduchu při 2°C. U jablek z nové sklizeň 2009 byl proveden i imunochemický test Western blot se séry pacientů, projevujících alergií na jablko a byla sledována intenzita imunologické odpovědi sér na různé odrůdy.

Celkem bylo testováno 15 odrůd jablek ze sklizeň 2008, a to čerstvých, a poté skladovaných 5 a 7 měsíců při teplotě 2°C. Ze sklizeň 2009 byla zatím testována pouze čerstvá jablka, a to 17 odrůd, vypěstovaných vždy v sadech VŠUO Holovousy s.r.o. Jablka byla krátce uchována ve skladovacích boxech, a poté zpracována na odšťavňovači.

Materiál a metody

Materiál

Použité chemikálie a imunochemikálie byly od firmy SIGMA- Aldrich, standard alergenu Mal d1 od firmy Biomay AG. Bílkoviny byly stanovovány metodou dle Bradforda. Množství Mal d1 bylo graficky zjištěno pomocí softwaru Elfoman 2.5

Přístroje

Odšťavňovač Champion 2000+ (USA, California). Vertikální elektroforéza -zařízení Mini V 8.10 firmy Biometra. Třepačka na gely Biometra, stolní chlazená odstředivka pro přípravu vzorků Hettich 32R, spektrofotometr UV-Vis PU 8700 Philips, mrazicí box na - 30°C a chladnička Elektrolux pro chlazení průběhu elektroforesy

Elektroforéza

SDS-Page elektroforéza probíhala na 12,5% roztředivém gelu, 5% zaostřovacím gelu o síle 1,5 mm po dobu 110-120 min při konstantním napětí 150V za chlazení, v pufru Tris-glycin pH 8,3. Touto elektroforesou jsme mezi jednotlivými odrůdami identifikovali alergen Mal d1 jednak dle standardu alergenu a jednak dle polohy standardů molekulových vah. Na elektroforetický gel do jamek jsme nanесли stejný objem šťávy jednotlivých odrůd, abychom mohli porovnat intenzitu zabarvení sledované bílkoviny (Mal d1) tak, jak byla obsažena v jablku. Postup vyvolání byl proveden dusičnanem stříbrným, bílkoviny byly v gelu imobilizované glutaraldehydem a obarvené vyredukovaným stříbrem.

Western blot

Blotovali jsme elektroforesou rozdělené bílkoviny na celulosovou membránku o velikosti porů 0,2 µm .

Postup

Jablka po umytí v chladné vodě byla zbavena jadřinců, rozkrájena i se slupkou na menší části a ihned ponořena do 3% kyseliny askorbové na 10 min. Byla ponechána na sítku okapat a poté vylišována na odšťavňovači. Získaná šťáva byla přefiltrována přes mulovou tkaninu, zvážena, rozplněna do sáček po 30 až 50 g a ihned zamrazena na minus 30°C a uschována do dalšího zpracování.

Vzorky pro vlastní elektroforézu byly připraveny následujícím způsobem. Ze zmrazeného vzorku šťávy bylo odebráno odpovídající množství a po opatrném pomalém rozmrazení byl přidán pufr 10 mM fosforečnan draselný, pH 7,0 s přísadkou 10 mM DIECA (diethylthiocarbamat, sodná sůl), 2mM EDTA-sodná sůl, 2% susp. PVPP (polyvinyl polypyrrolidon) v poměru 2:1 (extrakt:pufr) pro ochranu alergenu. Objem všech vzorků byl vždy 2 ml. Poté bylo upraveno pH z 3,2 - 3,6 na 9,4 - 9,6 (20% NaOH). Po důkladném promíchání byl vzorek odstředěn při 18 000 ot./min, 8°C, 15 min. Ve vzorku byly stanoveny bílkoviny. Elektroforéza byla prováděna v redukcujících podmínkách, byly přidány 2% SDS, 10% sacharosy, 5% mercaptoethanolu a barevný marker - bromfenolová modř. Celý objem byl zahříván ve vodní lázni při 100°C po dobu 5 min a po vychlazení zmrazen (Laemmli 1970).

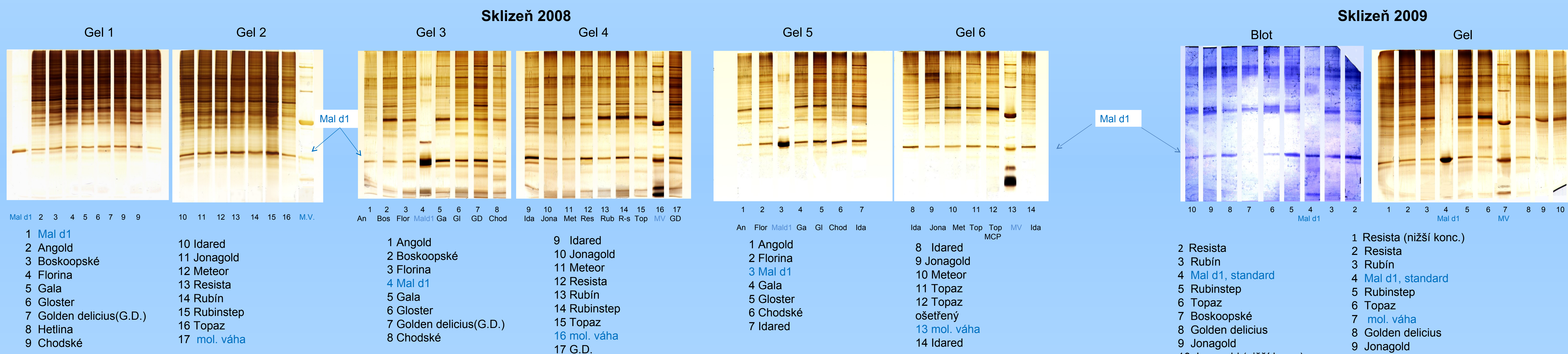
Blot

Po elektroforesy se gel ponořil na 20 min do vychlazeného transfer pufru pH 8,3. Poté se navrstvily podložky, podložní papír, gel a membránka atd. podle návodu výrobce a umístily se do komory blotovacího zařízení.

Podmínky blotování byly následovně - pufr glycin-methanol, pH 8,3, konstantní proud 450 mA, chlazení vodou v průtoku max. 1litr/hod, doba transferu 3 hod. Po blottingu a vyjmutí z přístroje se membránka před dalším postupem dobře osušila na vzduchu.

Imunoreakce Western blot

K identifikaci alergenu Mal d1 ve šťávě jablka jsme testovali 10 sér pacientů z e zdravotnického zařízení Imumed. Směsí nejlépe reagujících sér jsme vyvolali přetisknuté imunoreaktivní bílkoviny na membránci. Jako primární protilátka bylo anti-human IgE in goat , sekundární protilátka anti goat IgG- biotin in rabbit a konjugát streptavidin-peroxidasa. Barvili jsme TMB se substrátem H₂O₂. Proužky na vybarvené membránce jsme se ihned scannovali pro nestálost barvy.

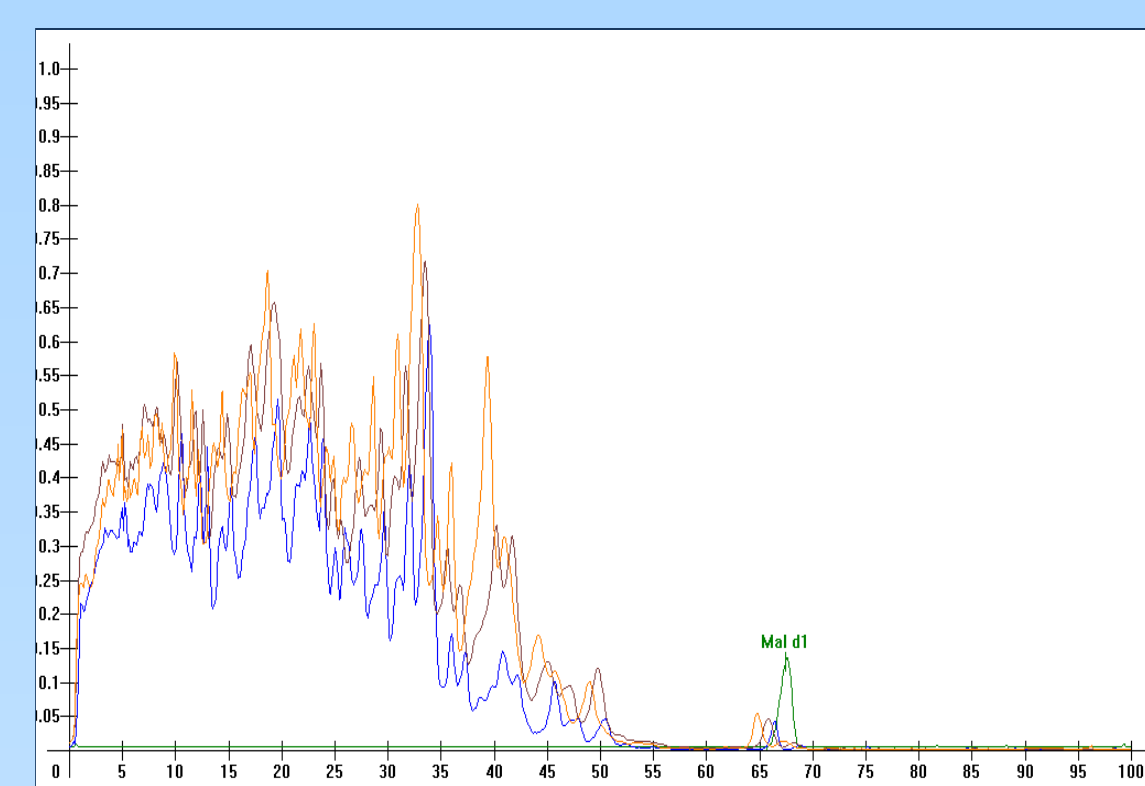


Obr. č. 1 Skladování 2 měsíce

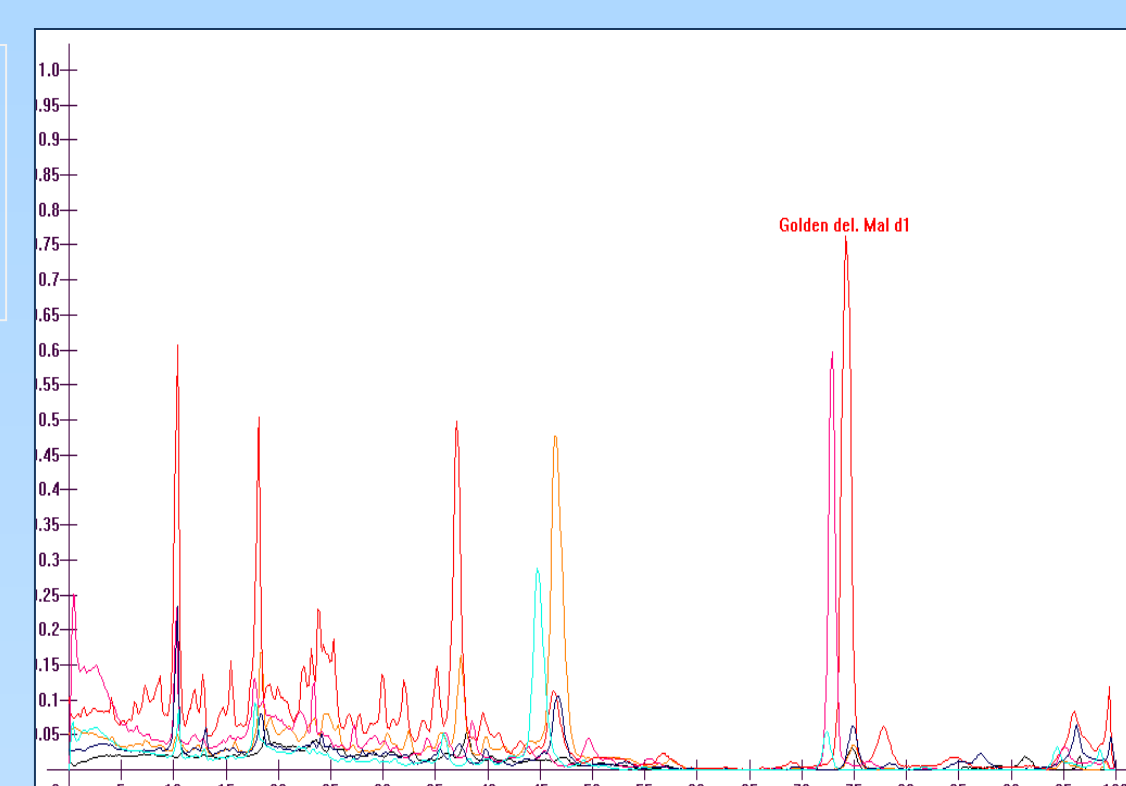
Obr. č. 2 Skladování 5 měsíců

Obr. č. 3 Skladování 7 měsíců. Některé odrůdy chybějí (včetně kontrolního Golden delicious), již neodpovídaly konzumní zralosti

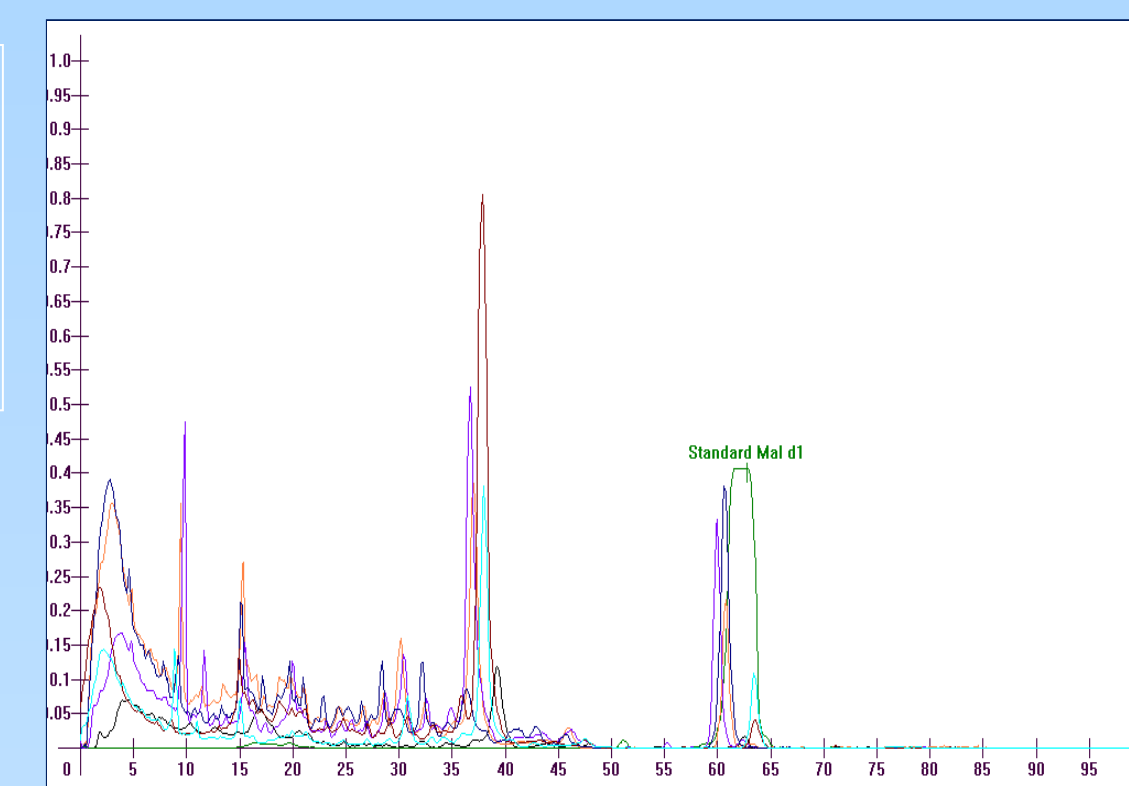
Obr. č. 4 Jablka po sklizni . Vybrané odrůdy



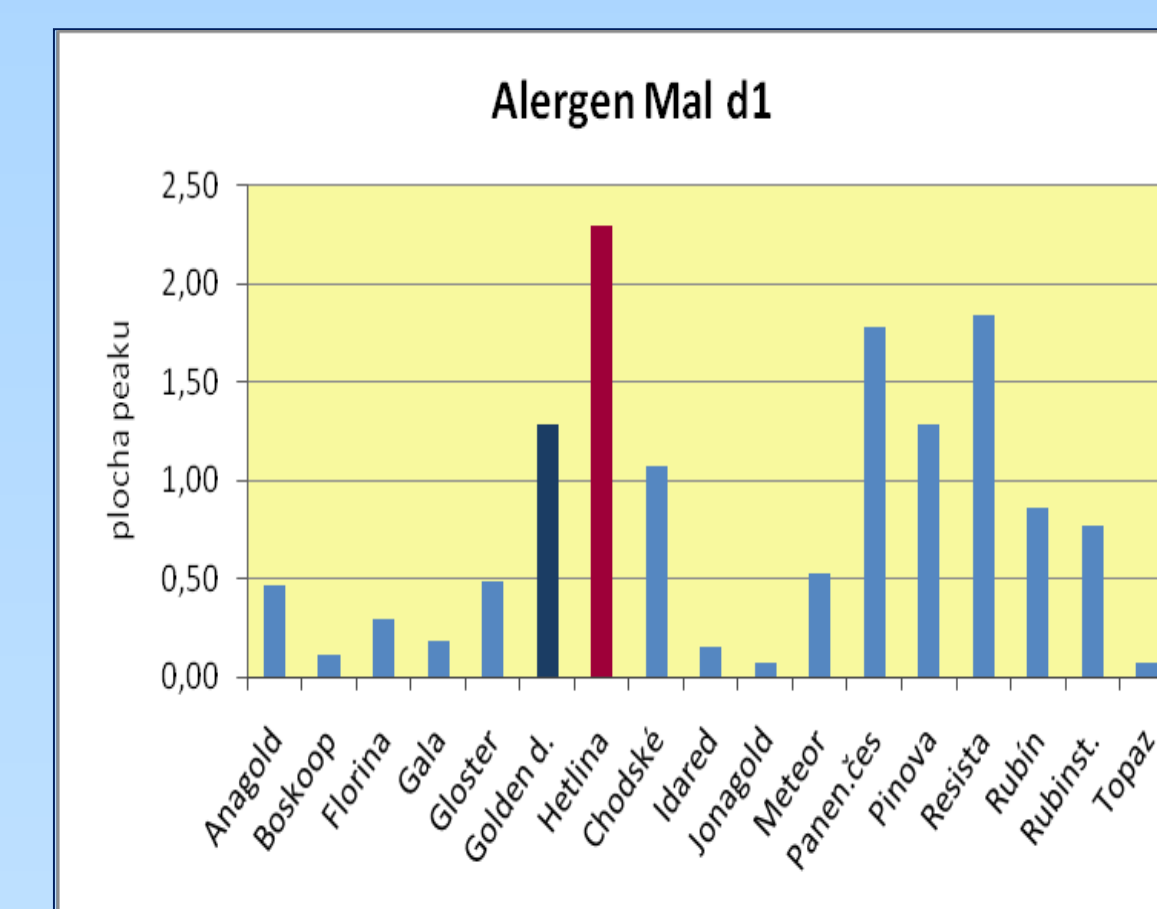
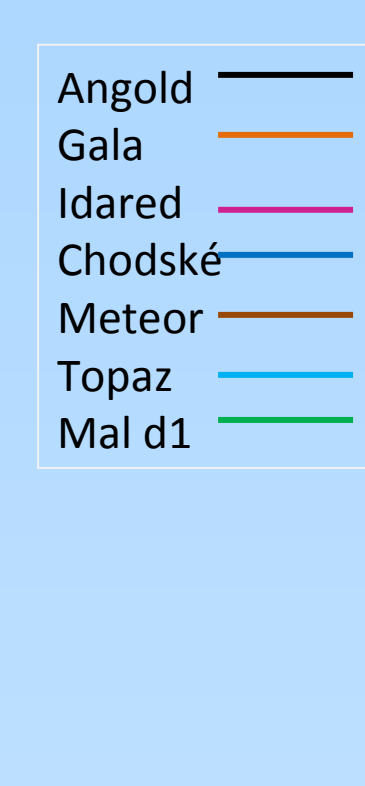
Graf č.1.1 Bílkoviny jablečné šťávy na gelu 1 a 2 vybraných odrůd ze sklizeň 2008



Graf č.2.2 Bílkoviny jablečné šťávy na gelu 3 a 4 vybraných odrůd ze sklizeň 2008



Graf č.1.1 Bílkoviny jablečné šťávy na gelu 5 a 6 vybraných odrůd ze sklizeň 2008



Obr. č. 5 Množství alergenu Mal d1 ve vzorku šťávy na jamku gelu (45 µl) v 17 odrůdách čerstvých jablek ze sklizeň 2009

Výsledky

Podle intenzity proužků bílkoviny na elektroforesi (obr.č. 1-4) v místě Mal d1 jsme vyhodnotili největší a nejmenší obsah alergenu. Jedny z nejlepších (nejnižších) hodnot měly odrůdy Angold a Topaz ve všech odběrech. U krátce skladovaných plodů (2 měsíce) dále slabě reagovaly odrůdy Chodské, v dalším odběru (5 měsíců) Boskoopské, Topaz, Rubín a v posledním odběru (7měsíců), kde několik odrůd nebylo k dispozici, protože již nebyly v konzumní zralosti, to byly Topaz ošetřené, Meteor a Jonagold. Naopak nejvyšší hodnotu kromě Golden delicious měly odrůdy Rubinstep, Idared a Gloster (tab. č.1). Na blotu po imunoreakci (obr.č.4, blot) bylo nejméně Mal d1 v odrůdách Boskoopské, nejvíce v odrůdách Hettlina (obr.č. 5 a tab.č.2).

Tab. č. 1 Mal d1 šťávy jablek v gelu po elektroforesi

dobu skladování	odrůdy s malým obsahem Mal d1	odrůdy s velkým obsahem Mal d1
2 měsíce	Chodské, Angold, Gala, Topaz	Rubinstep, Gloster, Resista
5 měsíců	Angold, Boskoopské, Topaz	Idared, Gala, Golden del., Resista
7 měsíců	Angold, Jonagold, Meteor, Topaz ošetřené	Gloster, Chodské, Idared,
1 měsíc nová sklizeň	Boskoopské, Angold, Jonagold, Topaz	Hettlina, Resista, Panenské české

Tab.č. 2 Mal d1 šťávy jablek na membránce po blotu (obr. č. 5)

období odběru	odrůdy s malým obsahem Mal d1	odrůdy s velkým obsahem Mal d1
20.10.09 nová sklizeň	Boskoopské, Jonagold, Topaz	Hettlina, Resista a Panenské české