

## METODY STANOVENÍ LEPKOVÝCH BÍLKOVIN V POTRAVINÁCH

PETR HULÍN<sup>a</sup>, PAVEL DOSTÁLEK<sup>a</sup> a IGOR HOCHEL<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, <sup>b</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
petr.hulin@vscht.cz

Došlo 2.6.07, přijato 19.7.07.

Klíčová slova : ječmen, prolaminy, lepek, alergenní struktury, imunoanalýza

### Obsah

1. Úvod
2. Prolaminy a jejich struktura
  - 2.1. Prolaminy pšenice
  - 2.2. Prolaminy ječmene
3. Alergenní vlastnosti prolaminů – celiakie, bezlepkové potraviny
  - 3.1. Denní příjem lepku
  - 3.2. Alergenní peptidové struktury
4. Metody stanovení prolaminů
  - 4.1. Extrakce
  - 4.2. Metody stanovení lepkových bílkovin – ELISA
    - 4.2.1. ELISA s použitím polyklonálních protilátek
    - 4.2.2. ELISA s použitím monoklonálních protilátek
    - 4.2.3. Přehled publikovaných metod s využitím monoklonálních protilátek
    - 4.2.4. Komerční soupravy používané pro imunochemické stanovení prolaminů v potravinách
  - 4.3. Další metody využitelné pro stanovení lepkových bílkovin
    - 4.3.1. Elektroforetické metody
    - 4.3.2. Chromatografické metody
    - 4.3.3. Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF)
    - 4.3.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)
5. Závěr

### 1. Úvod

Obiloviny čeledi lipnicovitých trav mohou způsobovat podmíněnou alergii při vdechnutí nebo inhalaci. Daleko větší pozornosti se ale dostává proteinům těchto obilovin, které jsou spojovány s celiakií. Toto geneticky podmíněné onemocnění se vyskytuje u 0,5 % evropské populace a jedinou doposud používanou léčbou je striktní dodržování „bezlepkové diety“, která je založena na potravinách

s vyloučením obsahu bílkovin pšenice, ječmene a žita.

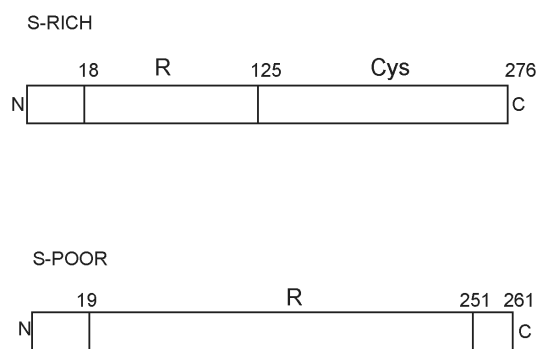
Proteiny odpovědné za tuto imunitní odezvu představuje především tzv. prolaminová frakce obilných bílkovin, která je historicky vyčleněna na základě sekvenční extrakce jako rozpustná v ethanolu. Prolaminy obecně obsahují vysoké procentuální zastoupení glutaminu a prolinu a společně s gluteninovými bílkoviny potom představují lepek, elastickou hmotu obilnin se značným technologickým významem.

Pro potravinářskou kontrolu „bezlepkových“ potravin je nutná přítomnost skupiny věrohodných a dostatečně specifických analytických systémů. Pro stanovení prolaminové frakce cereálních proteinů bývá používána široká paleta elektroforetických, chromatografických a imunochemických metod. Posledně jmenované se díky své citlivosti a specifitě dostávají v poslední době do popředí zájmu potravinářských chemiků. Imunochemické metody jsou také ve srovnání s ostatními technikami levnější a poskytují výsledky v relativně krátkém čase.

V posledních desetiletích bylo publikováno velké množství prací, které se zabývaly přípravou protilátky a sestavením testu na stanovení zejména gliadinů pšenice většinou pomocí metody ELISA v sendvičovém uspořádání.

### 2. Prolaminy a jejich struktura

Klasifikace zásobních proteinů obilovin je historicky založena na tzv. Osbornově<sup>1</sup> postupné extrakci a rozdílné rozpustnosti bílkovin, což vedlo k jejich rozdělení do čtyř základních skupin: 1) albuminy rozpustné ve vodě; 2) globuliny rozpustné ve vodných roztocích solí; 3) prolaminy rozpustné ve vodných roztocích alkoholů (např. ethanol, propanol); 4) gluteliny rozpustné až v roztocích kyselin nebo zásad. Jelikož každá z těchto skupin obsahuje velké množství jednotlivých proteinů s částečně rozdílnými vlastnostmi, byly vypracovány další pohledy na klasifikaci těchto látek. Nové možnosti získávání dat o bílkovinných strukturách a vlastnostech umožňují rozdělovat proteiny na základě poznání vztahu aminokyselinových sekvencí a trojrozměrných struktur, což umožňuje klasifikaci tzv. bílkovinných čeledí, zahrnujících i jinak značně odlišné proteiny. Nejrozsáhlejší databázi rostlinných bílkovin je Pfam databáze sestavená na Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK. Podle strukturálních a funkčních vlastností byly prolaminy rozděleny do tří skupin a to na S-Poor (chudé na síru), S-Rich (bohaté na síru) (obr. 1) a HMW prolaminy. Cysteinové zbytky se přitom u S-Rich prolaminů vyskytují převážně v C-koncové části peptidového řetězce. Sekvence a homologie domén cereálních proteinů umožňuje identifikaci prolaminové „nadčeledě“, která je jednou z nejrozšířenějších skupin rostlinných bílkovin a zahrnuje zásobní proteiny semen obilovin, nízkou



Obr. 1. Schéma rozdílné struktury S-Rich a S-Poor prolaminů; R – úseky složené z repetitivních sekvencí (PQQPFPQ), Cys – výskyt cysteinových můstků<sup>3,4,6</sup>

molekulární proteiny bohaté na síru a některé glykoproteiny buněčné stěny, stejně jako několik hlavních typů rostlinných alergenů<sup>2–5</sup>.

Prolaminové frakce bílkovin obilovin podčeledi *Triticeae* jsou nazývány gliadiny u pšenice, hordeiny u ječmene, sekaliny u žita a aveniny u ovsu. Nacházejí se především v aleuronové vrstvě zrna, kde plní zejména zásobní funkci při klíčení a vývoji rostliny. Obsah zásobního dusíku je zajištěn vysokým zastoupením glutaminu a prolinu<sup>6</sup>.

Lepkové bílkoviny pšenice je možno dále rozdělit do pěti skupin podle molekulové hmotnosti. Rozdělení proteinů ostatních cereálií metodou HPLC se od pšenice značně liší, např. žito obsahuje hydrofilní  $\omega$ -sekaliny a hydrofobní  $\gamma$ -sekaliny, naproti tomu ječmen neobsahuje hydrofilní frakce. Nižší afinitu k nepolární fázi mají C-hordeiny následované hydrofobními B-hordeiny. Chromatogram proteinů lepku ovsu je tvořen dvěma blízkými hydrofobními frakcemi<sup>7</sup>.

Mezi vysokomolekulární složky prolaminů je možno zahrnout příbuzné HMW podjednotky gluteninů a podobné proteiny ječmene a žita (D-hordein, HMW sekalin). Gluteninové podjednotky představují asi 10 % lepkových

bílkovin a jsou rozdělovány podle počtu cysteinových zbytků v N-koncové části řetězce na X-typy (mol. hm. ~ 83 až 88 kDa) a Y-typy (mol. hm. ~ 67–74 kDa). Gluteninové podjednotky obsahují vysoké procento glycinu, prolinu a glutaminu. V nativní formě tvoří polymerní struktury, které mohou obsahovat i podjednotky S-Rich prolaminů. HMW a LMW podskupiny gluteninů je možno snadno identifikovat pomocí SDS-PAGE po předešlém vyloučení gliadinových frakcí<sup>2,4,8</sup>.

Všechny repetitivní sekvence S-rich proteinů obsahují sekvenční motiv tetrapeptidu PQQX\* (tedy PQQPFPQ u  $\gamma$ -gliadinů a  $\gamma$ -sekalinů, PQQPFPQ u  $\gamma$ -hordeinů, PQQPT u  $\alpha$ -gliadinů, PQQQPPFS u agregovaných pšeničných prolaminů a PQQPX u B<sub>1</sub>-hordeinů) a do jisté míry korespondují se sekvencemi QQPT a PQQPFPQ u C-hordeinů. Logickým vysvětlením této podobnosti se zdá být domněnka o společném evolučním základu těchto proteinů<sup>4,6,9</sup>.

V molekule S-rich prolaminů se nacházejí 3 nerepetitivní sekvence u C-koncové části, které obsahují 25–30 aminokyselinových zbytků a jsou označovány A, B a C. Sekvence A, B, C jsou obsaženy také v molekule HMW prolaminů, ale v tomto případě jsou místa A a B umístěna na N-koncové části molekuly a úsek C na C-koncové části molekuly. S-poor prolamin (např. hordein C) se patrně vyvinuly z S-rich prolaminů postupnou amplifikací repetitivních domén následovanou delecí nerepetitivních domén s výjimkou pozůstatku C regionu<sup>4,6,7</sup>.

Tabulka I udává podílové zastoupení jednotlivých skupin bílkovin v různých obilovinách, hodnoty jsou ale do jisté míry závislé na odrůdě, pěstební lokalitě a ročníku sklizně.

### 2.1. Prolamin y pšenice

Nejvíce prozkoumanou skupinou prolaminů z hlediska chemické struktury jsou gliadiny pšenice. Jejich aminokyselinové složení je typické vysokým obsahem glutaminu (36–45 %) a prolinu (14–30 %). Naopak nízké je zastou-

Tabulka I

Zastoupení jednotlivých skupin bílkovin v běžných obilovinách<sup>7</sup>

| Obilovina | Albumin [%] | Globulin [%] | Prolamin [%] | Glutelin [%] |
|-----------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Pšenice   | 14,7        | 7,0          | 32,6         | 45,7         |
| Žito      | 44,4        | 10,2         | 20,9         | 24,5         |
| Ječmen    | 12,1        | 8,4          | 25,0         | 54,5         |
| Oves      | 20,2        | 11,9         | 14,0         | 53,9         |
| Rýže      | 10,8        | 9,7          | 2,2          | 77,3         |
| Kukuřice  | 4,0         | 2,8          | 47,9         | 45,3         |

\* jednopísmenné zkratky pro značení aminokyselin: A=Ala, C=Cys, D=Asp, E=glu, F=Phe, G=Gly, H=His, I=Ile, K=Lys, L=Leu, M=Met, N=Asn, P=Pro, Q=Gln, R=Arg, S=Ser, T=Thr, V=Val, W=Trp, Y=Tyr

pení aminokyseliny tryptofanu a poněkud méně jsou obsaženy kyseliny asparagová a glutamová a bazické aminokyseliny. Nízký obsah polárních aminokyselin souvisí s malou rozpustností gliadinu ve vodě. Gliadin je složen z celé řady bílkovinných komponent, jejichž počet se odhaduje na cca padesát jednotlivých proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 30–75 kDa (cit.<sup>4,9</sup>).

První pokusy o jejich rozdělení gelovou elektroforézou nebo katexovou chromatografií vyústily v jejich rozdělení na  $\alpha$ - , $\beta$ - ,  $\gamma$ - a  $\omega$ -gliadiny podle klesající mobility. Pozdější studie aminokyselinových sekvencí těchto proteinů prokázaly, že neexistuje zcela přímá spojitost mezi pohyblivostí proteinů v gelu a jejich základní strukturou, takže se nakonec  $\alpha$ - a  $\beta$ -gliadiny sloučily do jedné skupiny jako  $\alpha$ -gliadin, dále došlo k rozdělení  $\omega$ -gliadinů na  $\omega$ -5 a  $\omega$ -1,2 gliadiny (cit.<sup>9</sup>).

$\omega$ -Gliadiny se skládají téměř výhradně z repetitivních aminokyselinových sekvencí složených z jednotek jako PQQQF nebo PQQPFPQQ. Prolin, glutamová kyselina a fenylalanin reprezentují téměř 80 % aminokyselin, naopak cystein se nevyskytuje vůbec.  $\gamma$ -Gliadin se liší od  $\alpha$ - a  $\beta$ -gliadinů v aminokyselinovém složení, a to přítomností asparagové kyseliny, prolinu, methioninu, tyrosinu, fenylalaninu a tryptofanu. Podle rozdílné *N*-koncové sekvence vznikly tři podskupiny  $\omega$ -gliadinů, které byly dále vztaheny k C-hordeinu a  $\omega$ -sekalinu.  $\alpha$ - a  $\beta$ -Gliadiny obsahují ve svých řetězcích šest molekul cysteinu, které tvoří tři intramolekulární disulfidové můstky (tab. II). Nerepetitivní úsek obsahuje značné množství  $\alpha$ -helixů, repetitivní doména je ve srovnání s  $\gamma$ -gliadiny značně nepravidelná.  $\gamma$ -Gliadiny obsahují v C-koncovém úseku osm molekul cysteinu tvořících intramolekulární disulfidové vazby. Jednotlivé skupiny se rozlišují hlavně podle *N*-koncového aminokyselinového složení. Jejich zastoupení v rámci celkových gliadinů je variabilní podle odrůdy a růstových podmínek rostlin, přesto je možno říci, že nejvíce je zastoupen  $\alpha$ -typ následovaný  $\gamma$ -typem, zatímco  $\omega$ -typy se vyskytují v mnohem menší míře<sup>6,7,9–12</sup>.

Pšeničný lepek (gluten) byl poprvé popsán Beccarim v roce 1745 (cit.<sup>4</sup>). Tato hmota se vyznačuje vysokou elasticitou vlivem obsahu polymerních gluteninů a viskozitou, která je způsobena hlavně přítomností monomerních gliadinů. Právě tyto neobvyklé vlastnosti mají zásadní vliv na

využití pšenice v potravinářské výrobě. V současné době lze nashromáždit několik známých definic lepku (glutenu)<sup>7,13</sup>:

1. Viskoelastická hmota, složená ze dvou třetin z vody a z jedné třetiny z hydratovaných gliadinových a gluteninových proteinů<sup>7</sup>.
2. Viskoelastická hmota, která zbude z pšeničného těsta po vymytí ostatních složek vodou<sup>11</sup>.
3. Směs vodou nerozpustných proteinů vyskytující se u některých obilovin (pšenice, žito, ječmen)<sup>14</sup>.
4. Proteiny pšenice, žita a ječmene rozpustné v ethanolu, které u citlivých jedinců vyvolávají imunitní odpověď vedoucí k histologickým změnám sliznice tenkého střeva<sup>15</sup>.
5. Směs nerozpustných proteinů obilovin s rovnoměrným zastoupením gliadinu a gluteninu<sup>16</sup>.

Z uvedených definic je patrné, že výhodnější a srozumitelnější je se pojmu lepek vyhnout a zabývat se pouze prolaminami, které představují již tak značně komplexní analyt.

## 2.2. Prolaminy ječmene

Hordeinová frakce ječmene zahrnuje HMW (výšemolekulární frakce) D-hordein, C-hordein a LMW (nížšemolekulární frakce) B-hordein. D-Hordeiny jsou značně podobné HMW frakci pšeničných proteinů.

C-Hordeiny se sestávají ze 4–15 jednotlivých proteinů, v závislosti na kultivaru a jejich molekulová hmotnost se obvykle pohybuje mezi 55–70 kDa, jejich typickým znakem jsou repetitivní sekvence složené převážně z oktapeptidu PQQPFPQQ, dále pak pentapeptidu PQQPT poblíž *N*-koncové části. Složení repetitivního oktapeptidu (4× Gln, 3× Pro, 1× Phe) odpovídá i poměrnému zastoupení těchto aminokyselin v celém proteinu. C-Hordeiny neobsahují cystein, v jednom molu obsahují 1 methionin a 0–2 lysinové zbytky. Sekundární struktura těchto bílkovin se vyznačuje výskytem repetitivních sekvencí vedoucích ke vzniku  $\beta$ -ohybu a  $\beta$ -hřebenu<sup>4,6,7,17</sup>.

B-hordeiny tvoří 80–90 % všech prolaminů ječmene a jejich aminokyselinové složení je zhruba podobné se složením ostatních S-Rich prolaminů, tedy  $\alpha$ - ,  $\beta$ - ,  $\gamma$ -gliadinů a  $\gamma$ -sekalinů. Struktura B-hordeinů obsahuje ob-

Tabulka II  
Aminokyselinová sekvence  $\alpha$ -gliadinu<sup>9</sup>

|            |     |  |
|------------|-----|--|
| Doména Ia  | 1   | VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQQFLG                         |
|            | 33  | QQQP-FP-PQQPYPQPQP-FP-SQQPYLQLQP-FPQPQLPYSQPQP-FR-PQQP |
| Doména Ib  | 80  | YPQPQPQYSQPQPIS  |
| Doména II  | 96  | QQQQQQQQQQQQQQQQQQ                                     |
|            | 114 | ILQQILQQQLIFCMDVVLQQHNI AHGRSQV----                    |
| Doména III | 148 | LQQSTYQLLQELCCQHLQWQIPEQSQCQAIHNVVHAIL                 |
| Doména IV  | 182 | HQQQKQQQPSSQVFSQQPLQOYPLGQGSFRPSQQN                    |
| Doména V   | 218 | PQAQGSVQPQQLPQFEEIRNLALQTL PAMCNVVIAPYC-TI-APFGIFGTN   |

vykle C-koncovou část složenou z repetitivních sekvencí bohatých na prolin, N-koncovou část obsahující cysteinové řetězce a konformačně se značně podobá odpovídajícím proteinům gliadinové frakce pšenice s mírně zvýšeným podílem  $\beta$ -hřebenů. Molekulová hmotnost bílkovin této frakce se pohybuje obvykle v rozmezí 20–50 kDa. Dvou-rozměrná elektroforetická analýza B-hordeinových frakcí je rozdělena na B<sub>1</sub>- a B<sub>3</sub>-hordeiny s molekulovými hmotnostmi okolo 35 kDa a 45 kDa. Jednotlivé proteiny B<sub>1</sub>-hordeinů se mezi sebou liší inzercí, delecí či substitucí jednotlivých aminokyselin, zatímco B<sub>3</sub>-hordeiny se navíc ještě vzájemně odlišují organizací repetitivních domén<sup>7,10,11,17,18</sup>.

### 3. Alergenní vlastnosti prolaminů – celiakie, bezlepkové potraviny

Ekvivalentními pojmy k celiakii jsou gluten-senzitivní enteropatie, Gee-Harterův syndrom, alergie na lepek apod. Osoby trpící tímto geneticky podmíněným onemocněním jsou odkázány na doživotní dodržování tzv. bezlepkové diety, musí tedy ze své stravy vyloučit prakticky jakékoliv množství bílkovin a peptidů pocházejících z prolaminů obilovin podčeledi *Triticeae*.

Poprvé byla celiakie popsána Samuelem Gee v roce 1888 jako nemoc objevující se nejčastěji u dětí. Teprve roku 1941 publikoval Willem Dicke své objevy ohledně blahodárného účinku „bezpšeničné“ diety na pacienty stížené celiakií. Od té doby se již objasnilo, že komponentou pšenice, která je toxická pro celiaky, jsou zásobní lepkové bílkoviny. Lepkové bílkoviny obsahují velké procento glutaminu a prolinu (odtud anglický název gluten).

Požítí lepku u pacientů trpících celiakií vede k poškození sliznice tenkého střeva. Rozsah těchto změn ve střevní architektuře může být klasifikován pomocí modifikované Marshovy stupnice od intraepiteliální lymfocytosy až po naprostou atrofii střevních klků.<sup>15</sup> Příznaky, které je možné sledovat u osob stížených celiakií, zahrnují typické projevy alergie na potravu, tedy průjem, malabsorbce, bolesti kostí, v některých případech anémii a přidruženou kožní vyrážku (dermatitis herpetiformis). Dodržováním striktní bezlepkové diety dochází k eliminaci příznaků a regeneraci poškozené střevní tkáně. Základní a doposud užívanou diagnostickou metodou je v případě celiakie histologické vyšetření poškození tenkého střeva pomocí duodenální biopsie.

Patogenetický mechanismus působení alergenních bílkovin není ještě zcela objasněn, je však zřejmé, že prolaminové proteiny jsou parciálně hydrolyzovány trávicími enzymy a vzniklé peptidy prochází stěnou střevní sliznice do prostřední epitelové vrstvy (lamina propria). Mechanismus tohoto průchodu není plně objasněn. Další interakce se účastní enzym tTG (tissue transglutaminase EC 2.3.2.13), který specificky deaminuje část molekul glutaminu na glutamovou kyselinu. To peptidu umožní specificky nekovalentně interagovat s buňkami prezentující antigen (APC-antigen presenting cell) HLA-DQ2, nebo

DQ8, které zajišťují reakci peptidu s T-lymfocytem, čímž dochází k alergenní odezvě. Mechanismus zahrnuje tedy větší množství faktorů<sup>19,20</sup>.

Z epidemiologického hlediska je celiakie onemocnění vyskytující se převážně u lidí euroasijského typu, postihuje častěji ženy než muže a do nedávné doby bylo toto onemocnění považováno za vzácné. Nedávné studie však objevily rozšíření celiakie v populaci v míře okolo 0,4 %, čímž se tato nemoc stává jednou z nejběžnějších alergií na potravu vůbec<sup>21</sup>. Vývin celiakie je podmíněn jednak vnějšími faktory, jednak životním prostředím. Z hlediska dědičnosti hraje klíčovou roli gen pro kódování dimerního imunoproteinu HLA-DQ, který je u nemocných lidí pozměněn. Pravděpodobnost společného výskytu celiakie u sourozenců je 0,1 (děleno výskytem v populaci 0,004 udává relativní koeficient pravděpodobnosti 25), u dvou-vaječných dvojčat 0,2 a u jednovaječných dvojčat 0,86, což poukazuje jednak na silné genetické podmínění výskytu choroby, na druhé straně potvrzuje vliv dalších genetiky nepodmíněných faktorů vzniku onemocnění. Mezi tyto faktory patří charakter konzumace lepku v postkojeném období u dětí<sup>19</sup>. Riziko onemocnění celiakií snižují malé dávky lepku ještě v době kojení, naopak toto riziko se zvyšuje s velkými nárazovými dávkami v potravě bez předešlé přípravy. Další faktory nejsou ještě zcela prozkoumány, ale je pravděpodobné, že riziko onemocnění mohou zvyšovat různé infekce a existence jiných autoimunitních onemocnění. Je také prokázáno, že se celiakie vyskytovala více u dětí narozených v létě než u lidí narozených v jiných měsících<sup>21,22</sup>.

#### 3.1. Denní příjem lepku

Bezlepkové potraviny pro celiaky by v optimálním případě neměly obsahovat jakékoliv stopová množství alergenních peptidů, v zásadě by měly pocházet ze surovin s vyloučením i příměsí relevantních obilovin. Z technických a praktických důvodů je však dodržení takto striktních podmínek téměř neproveditelné. Dlouhodobý denní příjem lepku v potravě celiaků, který by byl tolerovatelný z hlediska vymizení symptomů a regenerace stěny tenkého střeva je značně individuální a nebyl doposud jednoznačně určen<sup>23–25</sup>.

Představitelem tolerantnějšího přístupu k dennímu příjmu lepku je práce Collina a spol.<sup>26</sup>, ve které limit příjmu okolo 30 mg lepku za den nebyl zjištěn jako závadný z hlediska fyziologických změn tkáně tenkého střeva. K měření koncentrací byla použita komerční souprava Ridascreen Gliadin kit (R-Biopharm). Situaci však komplikuje individuální reakce pacientů na příjem lepku a jeho každodenní množství.

#### 3.2. Alergenní peptidové struktury

Alergenní účinky prolaminů jsou úzce spjaty s vysokým obsahem glutaminu a prolinu v aminokyselinovém řetězci. Toxicita gliadinu je široce známa a není eliminována po hydrolyze těchto bílkovin trávicími enzymy

(pepsin, trypsin, pankreatin). Toxické jsou dokonce i peptidy s molekulovou hmotností pod 1000 Da. Intaktní terciární struktura ani zachování disulfidových můstků není podmínkou pro vyvolání imunitní odpovědi, jejímu vyvolání zamezí pouze celková hydrolýza nebo kompletní deamidace glutaminu v prolaminových štěpech<sup>9,11,27,28</sup>.

Nepříliš jednoznačně se jeví alergenní aktivita gluteninových bílkovin. De Vincenzi a spol.<sup>29</sup> prokázali toxicitu gluteninu *in vitro*, zvláště pak účinky LMW gluteninů, které obsahují peptidové sekvence značně podobné gliadinovým. Gluteninové bílkoviny je zároveň značně problematické zbavit prolaminových příměsí.

Toxicita prolaminových frakcí pocházejících z pšenice, žita a ječmene byla dostatečně prokázána. Názory na alergenní vlastnosti ovesných bílkovin se doposud různí, ovesné prolaminu tvoří asi jen 10 % celkových bílkovin, což by mohlo zdůvodnit vyšší míru tolerance u některých pacientů. Problematická je také možná kontaminace ovesného zrna jinými druhy obilovin<sup>9,30</sup>.

Bylo provedeno srovnáním primární struktury a toxicity pepsin-tryptických štěpů  $\alpha$ -gliadinu, tedy strukturálně podobných peptidů B3141-B3146, odvozených od *N*-koncové části A-gliadinu (např. aminokyselinové složení štěpu B3143 je PVPQLQPQNPS-QQQPQEQVPLVQQQ-QFPGQQQFPPQYPQPQPFPSQQPYL). Tyto proteiny jsou z hlediska své prokázané alergenní aktivity vhodnými představiteli gliadinů a byly vyvinuty postupy jejich rutinní přípravy<sup>9,27</sup>.

Berti a spol.<sup>31</sup> testovali reakci IgA frakce protilátek získaných od pacientů s neléčenou celiakií. Kompetitivní ELISA vyvinutá k účelu kvantifikace reakce těchto IgA s různými proteiny v potravě odhalila nulovou křížovou reakci se zeiny a hovězím sérovým albuminem, zato však nenulovou křížovou reakci s kaseiny (kravského a kozího mléka). Tato křížová reakce naznačuje tendenci IgA celiaků vázat se převážně na lineární epitopy.

## 4. Metody stanovení prolaminů

### 4.1. Extrakce

Prvním krokem je extrakce prolaminových bílkovin ze vzorku zředěným ethanolovým roztokem. Koncentrace ethanolu se obvykle pohybuje mezi 40 % a 70 % (v/v). Vlastnosti získaného roztoku ovlivňuje kromě koncentrace ethanolu řada parametrů, jako např. teplota, použití ultrazvuku, případně přidání redukčních činidel k extrakčnímu roztoku<sup>32–37</sup>.

Pro získání lépe definovatelných skupin látek je dále možno frakcionovat extrahované peptidy a proteiny elektroforetickými a chromatografickými metodami<sup>35,38,39</sup>.

### 4.2. Metody stanovení lepkových bílkovin – ELISA

Pro stanovení lepkových bílkovin v potravinách jsou určující limity zavedené v Codexu Alimentarius

(revidovaný standard CX/NFSDU 00/1). Pro analytické účely se běžně předpokládá, že lepek je z poloviny tvořen prolaminu a z poloviny gluteninu.

Hlavním problémem stanovení koncentračních limitů je neúplná charakterizace heterogenního analytu, který navíc může podléhat různým tepelným a enzymovým degradacím při technologických úpravách<sup>11</sup>.

V poslední době bylo publikováno velké množství metod pro stanovení lepku v potravinách. Jejich principem bývá buď detekce prolaminových bílkovin, nebo detekce pšeničné DNA.

Nejpoužívanější metodou ke stanovení prolaminů je enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA), založená na interakci specifické protilátky s antigenem.

Nejčastěji bývá ELISA prováděna v tzv. sendvičovém uspořádání, které je založeno na postupném vytvoření zakotvených komplexů protilátka-antigen-enzymově značená protilátka.

Dalším častým typem technik ELISA je kompetitivní imunochemické stanovení, které dovoluje detegovat antigeny s jedním vazebným místem pro protilátku, případně antigeny, jejichž prostorové uspořádání nedovoluje vytvoření „sendvičového“ komplexu se dvěma navázanými protilátkami<sup>40–42</sup>. Výsledky různých uspořádání se pro řadu analytů mohou výrazně různit i za použití stejné protilátky<sup>43,44</sup>.

Analýza prolaminů v reálném vzorku je závislá i na fyzikálně-chemických dějích v průběhu technologického procesu výroby. Zahřátí extrahovaného materiálu na teplotu kolem 100 °C a výše výrazně ovlivňuje extrahovatelnost a imunochemickou reaktivitu extraktů<sup>37,45</sup>.

#### 4.2.1. ELISA s použitím polyklonálních protilátek

Použití polyklonálních protilátek (PAb) pro tento druh imunochemických stanovení má své opodstatnění z hlediska nižší ceny a jednodušší přípravy. Většina experimentů s PAb proběhla v 80. letech minulého století, než se staly specifitější monoklonální protilátky lépe dostupné. Byly testovány různé formáty a analytické schopnosti sestavených metod<sup>46–48</sup>.

Ciclitira a spol.<sup>46</sup> vyvinuli kompetitivní radioimunoanalýzu pro stanovení  $\alpha$ -gliadinů bez schopnosti detegovat proteiny příbuzných cereálií (žito, ječmen, oves).

Troncone a spol.<sup>49</sup> sestavili sendvičovou metodu se dvěma různými protilátkami pro stanovení gliadinu pšenice. Toto uspořádání dosáhlo větší citlivosti než inhibiční EIA, avšak vykazovalo křížové reakce i s bílkoviny rozpustnými v ethanolu kukuřice a rýže.

Chirido a spol.<sup>41</sup> použili polyklonální protilátky proti komerčnímu gliadinu (Sigma Chemical Co.) k sestavení nepřímé kompetitivní ELISA metody s detekčním limitem pro stanovení lepku 1 ppm. Bylo provedeno srovnání detekční schopnosti této metody s komerční soupravou (Cortec diagnostics, UK). Citlivost dané metody se řádově snižovala pro jiné analyty než čistý gliadin, jako jsou prolaminu příbuzných obilovin nebo tepelně opracované výrobky. Autoři dále zaznamenali negativní vliv zvýšené koncentrace ethanolu (4 %) na imunoaktivnost protilátek.

#### 4.2.2. ELISA s použitím monoklonálních protilátek

Příprava monoklonálních protilátek (MAB) je z principu náročnější, delší a finančně nákladnější. Nicméně výhody definovaného individua získané imunoglobulinové frakce jsou pro sestavení imunochemické metody stěží nahraditelné. Dřívější metody využívající polyklonálních protilátek proti prolaminové frakci určitého druhu obiloviny dosahovaly logicky nižší specifity vůči potenciálně alergenním peptidům a pro kvantifikaci prolaminů v nízkých koncentracích se již nepoužívají. Volba vhodných protilátek je klíčovým krokem celého stanovení. Je třeba, aby protilátky reagovaly s prolaminovými bílkovinami všech toxických druhů obilovin.

ELISA s použitím monoklonálních protilátek proti  $\omega$ -gliadinu

Tyto monoklonální protilátky obvykle bývají specifické k repetitivním aminokyselinovým úsekům specifickým pro jednu bílkovinnou frakci, což může negativně ovlivňovat přesnost stanovení z důvodu rozdílné kompozice obiloviny standardu a vzorku. V případě stanovení bílkovin ječmene se protilátky spojují se sekvencemi hordeinové frakce s repetitivními sekvencemi, které jsou ekvivalentní k sekvencím  $\omega$ -gliadinové frakce. Vzhledem k tomu, že  $\omega$ -gliadiny se téměř celkově skládají z repetitivních aminokyselinových sekvencí, je možné předpokládat, že většina monoklonálních protilátek postavených proti specifické repetitivní sekvenci bude mít patrně vyšší afinitu k  $\omega$ -gliadinové frakci než k ostatním skupinám gliadinů<sup>11,14</sup>.

ELISA s použitím protilátek proti toxickému peptidovému úseku

Monoklonální protilátky jsou zde specifické vůči jednomu danému aminokyselinovému úseku, případně s přidružením úseků velmi podobných. Protilátky detegující předpokládanou toxickou sekvenci proteinového řetězce jsou v poslední době často využívány pro stanovení lepku. Sekvence bývají voleny na základě poznatků o struktuře a alergenní aktivitě gliadinů, většinou na základě primární struktury repetitivních domén peptidů s klinicky prokázanou toxicitou<sup>11,14</sup>.

#### 4.2.3. Přehled publikovaných metod s využitím MAB

Prvním opravdu úspěšným pokusem na sestavení ELISA metody byla práce Skerritta a Hillové, která využívala monoklonální protilátky proti tepelně odolným  $\omega$ -gliadinům. Metoda dosahovala detekčního limitu okolo 10 ppm s možností kvantifikace lepku nad 100 ppm. Jako referenčního materiálu pro kvantifikaci bylo použito gliadinového standardu, připraveného extrakcí pšeničné mouky 40% ethanolem. Tato metoda byla dlouhou dobu jako jediná přijata AOAC (Association of Official Analytical Chemists) pro stanovení lepku v potravinách a stala se základem prvních komerčních kitů. Tepelně odolné  $\omega$ -gliadiny jsou nicméně minoritní prolaminovou frakcí bílkovin pšenice a strukturně se skládají převážně z repetitivních domén<sup>50–52</sup>. Vlivem vazby protilátky na sekvence minoritně zastoupených  $\omega$ -gliadinů může značná

heterogenita nedefinovaného analytu s proměnným podílem jednotlivých bílkovinných frakcí vést k zavádějícím výsledkům zastoupení všech lepkových bílkovin ve vzorku. Tyto nedostatky byly o to citelnější, dokud byla tato protilátka jedinou uznávanou alternativou. Určitou výhodou této metody lze naopak spatřovat v minimalizaci problémů při stanovení proteinů, které prošly tepelnou úpravou<sup>9,50</sup>.

Ellis a spol.<sup>36,53</sup> použili pro metody stanovení gliadinu monoklonální protilátku, která byla získána imunizací myši peptidem B3144. Tento peptid je podobný A-gliadinu a vzniká při štěpení  $\alpha$ -gliadinu pepsinem a trypsinem. Autoři dále vyvinuli metodu ELISA založenou na monoklonální protilátce proti peptidu tvořenému 19 aminokyselinami, který je obsažen v A-gliadinu. A-Gliadin je tvořen skupinou plně definovaných agregovatelných proteinů patřících mezi  $\alpha$ -gliadiny, které prokazatelně vyvolávají alergenní reakci u osob s celiakií<sup>9</sup>. Detekční limit v sendvičovém uspořádání s polyklonální králičí protilátkou zachycenou na pevné fázi a sekundární monoklonální protilátkou činil pro  $\alpha$ -gliadin 0,08 mg na kg extrahovaného materiálu, pro  $\beta$ - a  $\gamma$ -gliadin byl asi 4× vyšší a pro  $\omega$ -gliadin a prolaminu jiných alergenních cereálií se citlivost snižovala již řádově. Autoři ovšem zaznamenali, že metoda značně podhodnocuje obsah prolaminů po předchozím zahřátí vzorku na teploty nad 90 °C (cit.<sup>36</sup>).

Stejná protilátka byla později použita pro konstrukci nepřímé kompetitivní ELISA metody s detekčním limitem 0,128 ppm gliadinu. V různých uspořádáních byla protilátka schopna detegovat jak specificky pouze gliadin, tak i prolaminu ostatních cereálií. Autoři zároveň zkoumali vliv přídavku redukcujících činidel v extrakčním kroku a zaznamenali značné snížení citlivosti metody. Problém s detekcí gliadinu v tepelně opracovaných vzorcích tedy vyřešen nebyl<sup>54</sup>.

Předešlé metody poměrně úspěšně kvantifikovaly gliadiny pšenice ve vyšších koncentracích, posléze byly vyvinuty další postupy, které umožňovaly detekci prolaminů pšenice, žita i ječmene. Např. ELISA se dvěma imobilizovanými protilátkami pro zachycení prolaminových antigenů a třetí konjugovanou protilátkou umožnila stanovit hordeiny s detekčním limitem 1,5 ppm (cit.<sup>34</sup>).

Brett a spol.<sup>55</sup> charakterizovali skupinu široce specifických monoklonálních protilátek zaměřených proti gluteninové frakci pšeničných bílkovin, které reagovaly jak s gliadiny, tak i s vysokomolekulárními prolaminu ječmene a ovsa.

Dalším zásadním krokem k určení problematických koncentrací prolaminů bylo použití monoklonální protilátky R5, která byla připravena imunizací myši ethanolovým extraktem žita. Tato protilátka je specifická k peptidovým úsekům QQFP, QQQFP, LQFP a QLFP s předpokládanou alergenní aktivitou. Byla použita v sendvičové metodě ELISA, která umožňuje stanovit alergenní prolaminu většiny obilovin s výjimkou prolaminů ovsa. Detekční limit stanovení byl 3 ppm lepku v potravinách. Metoda byla validována a uvedena v Codexu Alimentarius (IV\_E20) jako referenční metoda. V současné době tvoří také základ několika komerčních souprav<sup>56–60</sup>.

Protilátka R5 byla využita i v kompetitivním uspořádání metody ELISA. Toto uspořádání eliminuje chybu stanovení vzniklou přítomností nízkomolekulárních prolaminových peptidů a jejich neschopností vytvářet komplex protilátka-antigen-značená protilátka<sup>61</sup>.

Chirido a spol.<sup>40,41</sup> použili pro kvantifikaci gliadinu streptavidin-biotinový amplifikační systém v sendvičovém i kompetitivním imunochemickém stanovení. Použitá monoklonální protilátka byla specifická ke gliadinu, hordeinu a sekalinu. Detekční limit kompetitivní ELISA metody byl 20 ng gliadinu na ml, detekční limit metody v sendvičovém uspořádání dosahoval hodnot 1 ng gliadinu na ml.

Analýza jiných než pšeničných prolaminů závisí na specifitě konkrétní protilátky v daném uspořádání. Rovněž není uspokojivě dořešena problematika záchytu produktů tepelných a enzymových přeměn hordeinů<sup>42,43,62</sup>.

#### 4.2.4. Komerční soupravy používané pro imunochemické stanovení prolaminů v potravinách

Protilátky vyvinuté pro metody ELISA nacházejí více či méně úspěšně komerční uplatnění při výrobě analytických souprav pro stanovení prolaminů. Následující tabulka uvádí přehled prodávaných sestav a jejich základní charakteristiky. Použitá protilátka je obvykle buď specifická k  $\omega$ -gliadinu, nebo k pentapeptidu QQFPF (R5). Soupravy, jejichž výrobci deklarují schopnost analytického systému detegovat prolaminu všech tří alergenních obilovin (pšenice, ječmen, žito), bývají založené na kombinované metodě ELISA, ve které je použito kombinace protilátek proti různým prolaminům.

Následující tabulka III udává přehled některých souprav uvedených na trh. Uvedené charakteristiky jednotlivých výrobků odpovídají údajům uváženým výrobcem případně vlastnostem zjištěných při vývoji metod nebo srovnávacích studiích. Koncentrační údaje jsou uvedeny v ppm gliadinu, což bývá obvykle chápáno jako polovina obsahu lepku (glutenu).

Protilátka proti  $\omega$ -gliadinům je principiálně výhodnější pro stanovení potravin, které prošly tepelnou úpravou. V poslední době se ale více prosazují protilátky specifické proti toxickým sekvencím  $\alpha$ -gliadinů, neboť jejich specifita a afinita lépe reprezentuje celkovou skupinu prolaminových bílkovin. Bylo provedeno srovnání komerční metody na bázi protilátky proti  $\omega$ -gliadinům a metody ELISA s protilátkou R5 na třech skupinách vzorků. Toto srovnání bylo provedeno mezi komerčními kity Ridasreen Gliadin Kit a Transia Plate Gluten<sup>70</sup>. Rozdílnost výsledků byla zdůvodněna několika faktory:

1. Použití jiného standardu v každé soupravě, dokonce o jiné skutečné koncentraci prolaminů.
2. Použití alternativního „koktejlového“ extrakčního činidla pro analýzu s protilátkou R5 oproti klasické ethanolové extrakci v druhém případě. Složení tohoto činidla nebylo autory v odborné literatuře blíže specifikováno, pravděpodobně se jedná o vícesložkové rozpouštědlo, které zvyšuje výtěžek extrakce<sup>56</sup>.
3. Možnost interference některých látek extrahovaných z komplexní matrice vzorku.

Kromě souprav určených pro laboratorní použití byly vyvíjeny i produkty umožňující semikvantitativní domácí stanovení lepkových bílkovin v potravinách<sup>71</sup>.

Tabulka III  
Přehled komerčních analytických souprav<sup>63–69</sup>

| Výrobce       | Produkt                 | LOD [ppm] | Rozmezí stanovení [ppm] | Specifita PL      |
|---------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-------------------|
| Neogen        | Alert (Qualitative)     | 10        |                         | prolaminy         |
|               | Veratox                 | 5         | 5–50                    | prolaminy         |
| R-Biopharm    | RidaScreen Gluten       | 5         |                         | $\omega$ -gliadin |
|               | RidaScreen Gliadin      | 1,5       | 2,5–40                  | QQFPF             |
|               | RidaScreen Fast         | 5         | 5–40                    | QQFPF             |
| Tepnel        | Gluten Assay Kit        | 5         | 50–1000                 | pšenice žito      |
|               | nebo High sensitivity   | 0,5       | 5–100                   | pšenice žito      |
| Hallmark      | HAVen Gluten            | 5         | 50–1000                 | $\omega$ -gliadin |
|               | nebo High sensitivity   | 0,5       | 5–100                   | $\omega$ -gliadin |
| Diffchamb     | Transia Plate Gluten    | 5         | 5–100                   | $\omega$ -gliadin |
|               | Transia Plate Prolamins | 1,5       | 0,8–12,5                | prolaminy         |
| ELISA systems | Gliadin Kit             |           | 5–100                   | $\omega$ -gliadin |
| Ingenasa      | Ingezim Gluten          | 0,75      | 1,6–25                  | QQFPF             |

Pozn.: LOD – detekční limit, PL – protilátka, ppm – odpovídá  $\text{mg kg}^{-1}$  ( $\text{mg l}^{-1}$ )

### 4.3. Další metody využitelné pro stanovení lepkových bílkovin

#### 4.3.1. Elektroforetické metody

Elektroforéza je jednou z hlavních metodik používanou pro analýzu cereálních bílkovin. Mezi hlavní skupiny těchto metod můžeme zařadit elektroforézu v polyakrylamidovém gelu s dodecyl sulfátem sodným (SDS-PAGE), elektroforézu v kyselém prostředí (acid-PAGE), izoelektrickou fokusaci (IEF), kapilární zónovou elektroforézu (CZE) a vysokoúčinnou dvourozměrnou HPLC-HPCE<sup>36</sup>. Separace a charakterizace zásobních proteinů obilovin probíhá u těchto technik na základě velikosti molekul nebo jejich pohyblivosti v elektrickém poli.

Dodecyl sulfát sodný vytváří s proteiny komplexy, jejichž náboje jsou následně srovnatelné, a tedy migrují v elektrickém poli stejnou rychlostí, k jejich rozdělení tedy dojde na jednotlivé frakce pouze na základě molekulové hmotnosti. SDS-PAGE představuje relativně levnou možnost separace obilných bílkovin. Má však tři základní nevýhody, problematickou kvantifikaci izolovaných proteinových frakcí, nutnost vizualizace separovaných proteinů a práci s nebezpečným akrylamidem<sup>39</sup>.

Byly analyzovány bílkoviny rozpustné v ethanolu celé řady obilovin v konstantním i gradientovém gelu, avšak podmínky stanovení jsou vždy závislé na konkrétním analytu<sup>35,39,72–76</sup>.

Elektroforetické metody bývají spojovány s metodami western blot nebo imunoblot. Po elektroforetické separaci proteinů, se rozdělené frakce přenesou na nitrocelulózovou nebo PVDF membránu elektroprěnosem nebo obtiskovou metodou. Imunochemická detekce separovaného analytu se provádí pomocí specifické protilátky. Vzniklý komplex antigen-protilátka je detegován pomocí sekundární značené protilátky. Ellis a spol.<sup>72</sup> označili v bílkovinném spektru ječmene frakce 45 a 20 kDa za příslušné k hordeinům. Pirocheau a spol.<sup>73</sup> provedli dvourozměrnou elektroforézu ječných proteinů s následnou identifikací gelu hmotnostní spektrometrií.

Užitečným nástrojem pro identifikaci jednotlivých proteinů je dvourozměrná elektroforéza buď v tradičním provedení, nebo v modifikovaných uspořádáních jako dvourozměrná elektroforéza v kyselém prostředí kombinovaná s elektroforézou s dodecyl sulfátem sodným (2D-A-PAGE-SDS-PAGE), případně dvourozměrná nativní elektroforéza v kyselém nebo zásaditém prostředí<sup>74,75</sup>.

Acid-PAGE (A-PAGE) rozděluje proteiny v kyselém prostředí v závislosti na velikosti i náboji molekul v gelu. Hlavním využitím je analýza specifického zastoupení gliadinových frakcí (fingerprint) v jednotlivých odrůdách cereálií, převážně pšenice. Podobně jako SDS-PAGE se i v této metodě běžně používají jak lineární, tak i gradientové gely. Kromě gliadinů bývá využívána i pro separaci gluteninových proteinů a hordeinů ječmene. Přitom všechny tyto skupiny je možno frakcionovat semipreparativně i preparativně. Bílkoviny ostatních cereálií (oves, rýže, kukuřice, čirok) je možné také charakterizovat metodou A-PAGE, v některých případech je nutný přídavek močoviny

pro zvýšení rozpustnosti hydrofobních proteinů<sup>39</sup>.

Izoelektrická fokusace (IEF) bývá používána k separaci některých cereálních proteinů, přičemž zvláště rozpustnost analytu hraje zásadní roli pro vhodnost tohoto stanovení. Z tohoto důvodu bývá ke vzorku přidáno silné rozpouštěcí činidlo (např. 8M močovina, alkoholy)<sup>77,78</sup>.

Podobně jako A-PAGE i kapilární zónová elektroforéza (FZCE) separuje molekuly analytu na základě jejich nábojové hustoty a bývá také převážně používána pro analýzu čistoty odrůdy. Řada prací se zabývala optimalizací podmínek této metody pro separaci gliadinů a gluteninů pšenice<sup>76,79–81</sup>.

Kapilární zónová elektroforéza ve vysokoúčinné modifikaci (HPCE) využívá malého průměru separační kapiláry (25–100 μm) ke zvýšení pracovního napětí (až 30 kV), což umožňuje dosáhnout vysokého rozlišení v krátkém čase. Moderní HPCE jsou také plně automatizované a oproti klasické elektroforéze produkují méně nebezpečné odpady<sup>76,82</sup>.

Spojením dvou moderních metod vznikla dvourozměrná vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s vysokoúčinnou kapilární zónovou elektroforézou (2D-HPLC-HPCE), která byla využita k separaci gliadinu i hordeinu. Podobně jako u 2D elektroforézy vzniká dvojrozměrná mapa proteinů (případně trojrozměrná pro kvantitativní analýzu) s možností identifikovat jednotlivé zásobní proteiny obilovin<sup>83</sup>.

#### 4.3.2. Chromatografické metody

Přístroje HPLC se poslední dobou používají k analýze prakticky jakýchkoliv látek. Pro separaci a stanovení proteinů byly vyvinuty metody, jako je gelově permeační HPLC (size exclusion HPLC, SE-HPLC), HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC) a HPLC na iontoměničích. Takto provedené stanovení je značně nespecifické, nicméně podává cenné informace o rozdělení prolaminů do jednotlivých podskupin a o vlastnostech těchto frakcí. Dalším využitím chromatografických technik je příprava lépe definovatelných skupin proteinů a jejich přečištění<sup>84–90</sup>.

#### 4.3.3. Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF)

Hmotnostní spektrometrie, při níž se bílkoviny ionizují dusíkovým laserem ve vhodné nízkomolekulární matici, která zabraňuje rozpadnutí makromolekul. Vzniklé ionty jsou posléze urychleny na krátkém úseku silným stejnosměrným elektrickým polem. Měří se doba letu iontů k detektoru v trubici bez elektrického pole, která je úměrná poměru jejich hmotnosti ku jejich náboji. Metoda slouží v tomto provedení k určení známých peptidů, její nevýhodou je vysoká přístrojová a finanční náročnost. MALDI-TOF se využívá hlavně jako kontrolní srovnávací metoda pro odhalení falešně pozitivních výsledků imunoanalytických měření<sup>91–96</sup>.

#### 4.3.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Druhou principiální možností odhalení kontaminace vzorku příměsí potenciálně toxických obilovin je stanovení a kvantifikace přítomnosti genetického materiálu da-



ných plodin<sup>97</sup>.

Tato metoda je schopna detegovat stopy nepoškozené DNA alergenních obilovin v potravinách a je tedy potenciálně vhodnou alternativou k imunochemickým metodám. Vykazuje vyšší citlivost než metody ELISA, její nevýhodou je právě nutnost přítomnosti pomnožitelné deoxyribonukleové kyseliny ve vzorku a schopnost detegovat kontaminaci vzorku nukleovými kyselinami právě jedné obiloviny. Köppel a spol.<sup>98</sup> testovali použití metody PCR oproti výsledkům komerčního ELISA kitu (Ridascreen, R-Biopharm) pro stanovení kontaminace ovesné mouky pšeničnými bílkoviny. Detekční limit pro metodu ELISA byl stanoven jako 2 ppm, zatímco PCR vykázala cca 10× lepší citlivost. Další práce zabývající se paralelním stanovením prolaminové kontaminace v „bezlepkových“ potravinách prokázaly poměrně dobrou shodu obou metod a možnost jejich vzájemné kontroly. Negativní výsledek imunochemického stanovení při pozitivním výsledku PCR může značit přítomnost deproteinovaného pšeničného škrobu a v obráceném případě přítomnost čistého gliadinu bez příměsí DNA<sup>99,100</sup>.

Henterich a spol.<sup>101</sup> vypracovali systém real-time PCR pro stanovení gliadinu, ve kterém byla použita protilátka R5 (viz kap. 4.2.3.) s navázaným oligonukleotidem. Detekční limit metody byl 0,16 ppm.

## 5. Závěr

Komplikovanost stanovení lepkových bílkovin v potravinách spočívá především v nejednoznačně definovaném analytu, který se navíc ve vzorcích vyskytuje ve značně heterogenní formě zahrnující proteiny, peptidy a různé nízkomolekulární štěpy. Heterogenita prolaminů se dále může zvyšovat, pokud v průběhu výroby dochází k teplotním, enzymovým nebo jiným změnám bílkovin. Zastoupení jednotlivých proteinů i celých frakcí prolaminů navíc značně kolísá v závislosti na pěstebním ročníku, oblasti a odrůdě dané obiloviny. Z hlediska analýzy látek s alergenní aktivitou navíc situaci komplikuje značně individuální imunitní odpověď jednotlivých pacientů.

Pro analýzu obilných proteinů bylo použito velkého počtu analytických metod, založených na principech elektroforézy, kapalinové chromatografie a specifických imunochemických stanovení. Vzhledem k důležitosti alergenních účinků těchto proteinů je ELISA dnes hlavní volbou pro stanovení prolaminů v nízkých koncentracích, ačkoliv ostatní techniky mohou stále poskytovat užitečné informace. Během let byl vyvinut velký počet metod ELISA s různými protilátkami, které vykazovaly značnou míru specifity a citlivosti vůči prolaminovým bílkovinám, což předurčuje možnosti jejich využití pro daná stanovení.

Účinnost imunochemických stanovení je primárně závislá na kvalitě protilátky, tedy na její specifitě a afinitě ke konkrétním frakcím gliadinu, hordeinu a sekalinu. Dalšími určujícími faktory je formát metody ELISA a v neposlední řadě také způsob extrakce prolaminů ze vzorku.

Protilátky zaměřené proti prokazatelně toxickým sekvencím gliadinů se v současné době jeví jako nevhodnější pro stanovení lepkových bílkovin ječmene a pro potravinářskou kontrolu, nicméně schopnost křížových interakcí s ječnými a žitnými proteiny může být stále problémem, stejně jako věrohodnost výsledků analýzy částečně hydrolyzovaných a tepelně degradovaných peptidů. Peptidové fragmenty prolaminů jsou přitom velmi častým výsledkem působení výrobního potravinářského procesu.

Existence oficiálního neměnného standardu v rámci všech prováděných analýz by zamezila některým komplikacím souvisejícím se špatnou definovatelností analytu.

*Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR (1M0570 a MSM6046137305).*

## LITERATURA

- Osborne T. B.: Carnegie Ins. 1907.
- Gianibelli M. C., Larroque O. R., MacRitchie F., Wrigley C. W.: Cereal Chem. 78, 635 (2001).
- Shewry P. R., Sayanova O., Tatham A. S., Tamas L., Turner M., Richard G., Hickman D., Fido R., Halford N. G.: J. Plant Physiol. 145, 620 (1995).
- Shewry P. R., Halford N. G.: J. Exp. Bot. 53, 948 (2002).
- Bateman A., Birney E., Cerruti L.: Nucl. Acid Res. 30, 276 (2002).
- Shewry P. R., Tatham A. S.: Biochem. J. 267, 1 (1990).
- Yada R.Y., v knize : *Proteins in Food Processing*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2004.
- Sontag-Strohm T.: J. Cereal Sci. 24, 87 (1996).
- Wieser H.: Acta Paediatr. 412, 3 (1996).
- Velíšek J.: *Chemie potravin I*. Osis, Praha 2002.
- Stern M., Ciclitira P. J., van Eckert R., Feighery C., Janssen F. W., Méndez E., Mothes T., Troncone R., Wieser H.: Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13, 741 (2001).
- Kasarda D. D., Okita T. W., Bernardin J. E., Baecker P. A., Nimmo C. C., Lew E. J., Dietler M. D., Greene F. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 4712 (1984).
- Tatham A. S., Shewry P. R.: Trends Biochem. Sci. 25, 567 (2000).
- Denery-Papini S., Nicolas Y., Popineau Y.: J. Cer. Sci. 30, 121 (1999).
- Wahab P. J., Crusius J. B., Meijer J. W., Mulder C. J.: Am. J. Gastroenterol. 96, 1464 (2001).
- Linden G., Lorient D., v knize: *New Ingredients in Food Processing: Biochemistry and Agriculture*. Woodhead publishing, Cambridge 1999.
- Forde B. G., Kreis M., Williamson M. S., Fry R. P., Pywell J., Shewry P. R., Bunce N., Mifflin B. J.: EMBO J. 4, 9 (1985).
- Shewry P. R., Kreis M., Parmar S., Lew E. J.-L., Kasarda D. D.: FEBS Lett. 190, 61 (1985).
- Jabri B., Sollid L. M.: Nat. Clin. Pract. Gastroenter. Hepatol. 3, 516 (2006).

20. Cornell H. J.: *Amino Acids* 10, 1 (1996).
21. Auricchio S., Troncone R.: *Eur. J. Pediatr.* 155, 427 (1996).
22. Feighery C.: *Br. Med. J.* 319, 236 (1999).
23. Biagi F., Campanella J., Martucci S., Pezzimenti D., Ciclitira P. J., Ellis H. J., Corazza G. R.: *A Case Report. Nutr. Rev.* 62, 360 (2004).
24. Collin P., Mäki M., Aukinen K. K.: *Nutr. Rev.* 60, 490 (2004).
25. Hischenhuber C., Crevel R., Jarry B., Maki M., Moneret-Vautrin D. A., Romano A., Troncone R., Ward R.: *Aliment. Pharmacol. Ther.* 23, 559 (2006).
26. Collin P., Thorell L., Kaukinen K., Maki M.: *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19, 1277 (2004).
27. Wieser H., Belitz H. D.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 194, 229 (1992).
28. Rauchová H., Rauch P.: *Chem. Listy* 91, 189 (1997).
29. De Vincenzi M., Luchetti R., Peruffo A. D., Curioni A., Pogna N. E., Gasbarrini G.: *J. Biochem. Toxicol.* 11, 205 (1996).
30. Janatuinen E. K., Pikkarainen P. H., Kempainen T. A., Kosmo V. M., Jarvinen R. M. K., Uusitupa M. I. J., Julkunen R. J. K.: *N. Engl. J. Med.* 333, 1033 (1995).
31. Berti C., Trovato C., Bardella M. T., Forlani F.: *Food Agric. Immunol.* 15, 217 (2003).
32. Dona V. V., Fossati C. A., Chirido F. G.: *Proceedings of the 18th Meeting working group on prolamin analysis and toxicity. Stockholm, 2–5 October, 2003.* (Stern M., ed.), str. 51. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2004.
33. Wieser H.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 207, 128 (1998).
34. Sorell L., Lopez J. A., Valde's I., Alfonso P., Camafeita A. B., Chirido F., Galvilondo J., Mendez E.: *FEBS Lett.* 439, 46 (1998).
35. Rumbo M., Margheritis A. I., Chirido F. G., Giorgieri S. A., Fossati C. A., Anon M. C.: *Eur. Food Res. Tech.* 214, 198 (2002).
36. Ellis H. J., Rosen-Bronson S., O'Reilly N., Ciclitira P. J.: *Gut* 43, 190 (1998).
37. Morel M. H., Dehlon P., Autran J. C., Leygue J. P., Bar-L'Helgouac'h C.: *Cereal Chem.* 77, 685 (2000).
38. Tatham A. S., Shewry P. R., Belton P. S.: *Adv. Cereal Sci. Technol.* 10, 1 (1990).
39. Bean S. R., Lookhart G. L.: *J. Chromatogr., A* 881, 23 (2000).
40. Chirido F. G., Anon M. C., Fossati C. A.: *Food Agric. Immunol.* 10, 143 (1998).
41. Chirido F. G., Anon M. C., Fossati C. A.: *Food Agric. Immunol.* 7, 333 (1995).
42. Mičková B., Rauch P., Fukal L.: *Chem. Listy* 98, 970 (2004).
43. Dostálek P., Hochel I., Gabrovská D., Rysová J.: *Proceedings of the 19th Meeting working group on prolamin analysis and toxicity. Prague, 30 September – 3 October 2004.* (Stern M., ed.), str. 69. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2005.
44. Dostálek P., Hochel I., Mendez E., Hernando A., Gabrovská D.: *Food Addit. Contam.* 23, 1074 (2006).
45. Rumbo M., Chirido F. G., Fossati C. A., Anon M. C.: *Food Agric. Immunol.* 8, 195 (1994).
46. Ciclitira P. J., Lennox E. S.: *Clin. Sci.* 64, 655 (1984).
47. Friis S. U.: *Clin. Chim. Acta* 178, 261 (1988).
48. Ayob M. K., Rittenburg J., Allen J. C., Smith C. J.: *Food Hydrocolloids* 2, 39 (1988).
49. Troncone R., Vitale M., Donatiello A., Farris E., Rosos G., Auricchio S.: *J. Immunol. Methods* 92, 21 (1986).
50. Skerritt J. H., Hill A. S.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74, 257 (1991).
51. Skerritt, J.H., Hill A.S.: *J. Agric. Food Chem.* 38, 1771 (1990).
52. Skerritt J. H., Wrigley C. W., Underwood P. A.: (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia) : AU 572955 B2 19880519 (CAN 110:191088).
53. Ellis H. J., Doyle A. P., Wieser H., Sturgess R. P., Day P., Ciclitira P. J.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 28, 77 (1994).
54. Bermudo Redondo M. C., Griffin P. B., Garzon R. M., Ellis H. J., Ciclitira P. J., O'Sullivan C. K.: *Anal. Chim. Acta* 551, 105 (2005).
55. Brett G. M., Mills E. N. C., Goodfellow B. J., Fido R. J., Tatham A. S., Shewry P. R., Morgan M. R. A.: *J. Cer. Sci.* 29, 117 (1999).
56. Valdes I., Garcia E., Llorente M., Mendez E.: *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 465 (2003).
57. Kahlenberg F., Mendez E., Mothes T.: *Proceedings of the 18th Meeting working group on prolamin analysis and toxicity. Stockholm, 2–5 October, 2003.* (Stern M., ed.), str. 71. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2004.
58. Kahlenberg F., Sanchez D., Lachmann I., Tuckova L., Tlaskalova H., Mendez E., Mothes T.: *Eur. Food Res. Technol.* 222, 78 (2006).
59. *Proceedings of the 17th Meeting working group on prolamin analysis and toxicity. London, 3–6 October, 2002.* (Stern M., ed.), str. 45. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2003.
32. Osman A. A., Uhlig H. H., Valdes I., Amin M., Mendez E., Mothes T.: *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 1189 (2001).
33. Ferre S., Garcia E., Mendez E.: *Proceedings of the 18th Meeting working group on prolamin analysis and toxicity. Stockholm, 2–5 October, 2003.* (Stern M., ed.), str. 65. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2004.
34. Kanerva P., Sontag-Strohm T., Lehtonen P.: *J. Inst. Brew.* 111, 61 (2005).
35. <http://www.neogen.com/foodallergens.htm>, staženo 14.05.2007.
36. [http://www.tepnel.com/ag\\_bio\\_and\\_food\\_testing/downloads/BK%20P%20Gluten96%20Flyer%20.LA0058.pdf](http://www.tepnel.com/ag_bio_and_food_testing/downloads/BK%20P%20Gluten96%20Flyer%20.LA0058.pdf), staženo 14.05.2007.
37. <http://www.r-biopharm.com/general/main.php?>

- p\_range=foodandfeed&p\_nav=allergens&layer=on&n\_range=foodandfeed&act=foodandfeed&action=&id=&conti=, staženo 14.05.2007.
38. <http://www.hallmarkav.com/page3.html>, staženo 14.05.2007.
39. [http://www.diffchamb.com/website//archive/templates/item/product\\_list.asp?iSecId=624&category=624](http://www.diffchamb.com/website//archive/templates/item/product_list.asp?iSecId=624&category=624), staženo 14.05.2007.
40. <http://www.noackgroup.com/mmedia/2006.06.06/1149596502.pdf>, staženo 14.05.2007.
41. [http://www.elisas.com.au/allergens/allergen\\_11/index.htm](http://www.elisas.com.au/allergens/allergen_11/index.htm), staženo 14.05.2007.
70. Hasselberg A., Kruse B., Yman I. M.: *Proceedings of the 18th Meeting working group on prolamin analysis and toxicity. Stockholm, 2–5 October, 2003.* (Stern M., ed.) str. 109. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2004.
71. Skerritt J. H., Hill A. S.: *Lancet* 337, 379 (1991).
72. Ellis H. J., Freedman A. R., Ciclitira P. J.: *Clin. Chim. Acta* 189, 123 (1990).
73. Perrocheau L., Rogniaux H., Boivin P., Marion D.: *Proteomics* 5, 2849 (2005).
74. Lafiandra D., Kasarda D. D.: *Cereal Chem.* 62, 314 (1985).
75. Morel M. H.: *Cereal Chem.* 71, 238 (1994).
76. Werner W. E., Wiktorowicz J. E., Kasarda D. D.: *Cereal Chem.* 71, 397 (1994).
77. Curioni A., Dal Belin Peruffo A., Pogna N. E.: *Electrophoresis* 11, 462 (1990).
78. Sondergaard I., Jensen K., Krath B. N.: *Electrophoresis* 15, 584 (1994).
79. Lookhart G. L., Bean S. R.: *Cereal Chem.* 73, 81 (1996).
80. Day L., Greenwell P., Lock S., Brown H.: *J. Chromatogr., A* 836, 147 (1999).
81. Bean S. R., Lookhart G. L.: *Electrophoresis* 19, 3190 (1998).
82. Lookhart G. L., Bean S. R., Jones B. L.: *Electrophoresis* 20, 1605 (1999).
83. Bean S. R., Lookhart G. L.: *Cereal Chem.* 74, 758 (1997).
84. Van Eckert R., Jordan T. W.: *Proceedings of the 19th Meeting working group on prolamin analysis and toxicity. Prague, 30 September – 3 October, 2004.* (Stern M., ed.), str. 27. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2005.
85. Batey I. L., Gupta R. B., MacRitchie F.: *Cereal Chem.* 68, 207 (1991).
86. Bietz J. A.: *J. Chromatogr., A* 255, 219 (1983).
87. Bietz, J. A., Simpson D. G.: *J. Chromatogr., A* 624, 53 (1992).
88. Huebner F. R., Bietz J. A.: *Cereal Chem.* 70, 506 (1993).
89. Larroque O. R., Gianibelli M. C., Batey I. L., MacRitchie F.: *Electrophoresis* 8, 1064 (1997).
90. Popineau Y., Pineau F.: *J. Cereal Sci.* 5, 215 (1987).
91. Camafeita E., Alfonso P., Acevedo B., Mendez E.: *J. Mass Spectrom.* 32, 444 (1997).
92. Hernando A., Valdes I., Mendez E. J.: *Mass Spectrom.* 38, 862 (2003).
93. Cunsolo V., Foti S., Saletti R.: *Eur. J. Mass Spectrom.* 10, 359 (2004).
94. Cornell H. J., McLachlan A., Cullis P. G.: *J. Biochem., Mol. Biol. Biophys.* 6, 151 (2002).
95. Šalplachta J., Allmaier G., Chmelík J.: *Chem. Listy* 99, 967 (2005).
96. Řehulka P., Allmaier G., Chmelík J.: *Chem. Listy* 100, 1111 (2006).
97. Blažková M., Karamonová L., Fukal L., Rauch P.: *Chem. Listy* 99, 467 (2005).
98. Koppel E., Stadler M., Jurg L., Hubner P.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 206, 399 (1998).
99. Dahinden I., Von Buren M., Luthy J.: *Eur. Food Res. Technol.* 212, 228 (2001).
100. Sandberg M., Lundberg L., Ferm M., Malmheden Y. I.: *Eur. Food Res. Technol.* 217, 344 (2003).
101. Henterich N., Osman A., Mendez E., Mothes T.: *Nahrung* 47, 345 (2003).

**P. Hulín<sup>a</sup>, P. Dostálek<sup>a</sup>, and I. Hocheľ<sup>b</sup>**  
<sup>a</sup>Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, <sup>b</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic): **Methods for Determination of Gluten Proteins in Food**

The prolamin protein fraction from wheat, barley and rye can cause some adverse effects when ingested by people with the coeliac disease. The only treatment of coeliac sprue consists in the adherence to a strict diet free of toxic cereal proteins even in trace amounts. It is one of the most frequent food allergies occurring presumably in one in 300 people in Europe. There is still a need for analytical methods with acceptable reliability and specificity in food control and food analysis of gluten, i.e. prolamins. Electrophoresis and chromatography are widely used for fractionation of a complex mixture of hordeins, but immunochemical techniques are utilized in a very sensitive and specific determination of hordein and its derivatives. A number of ELISA systems have been produced, mainly for the purpose of wheat gliadin detection. The systems are usually based on monoclonal antibodies. The immunochemical analytical systems used for prolamin detection are reviewed.