

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA NĚKTERÝCH HOŘKÝCH PEPTIDŮ Z KASEINU

MICHAELA VÍTKOVÁ^a, LADISLAV FUKAL^a,
GARY BRETT^b a PAVEL RAUCH^a

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bInstitute of Food Research, Colney Lane, NR4 7UA Norwich, United Kingdom
e-mail: Ladislav.Fukal@vscht.cz

Došlo dne 9.I.2002

Klíčová slova: hořké peptidy, enzymová imunoanalýza, kasein, zrání sýrů

Úvod

Důležitým procesem během zrání sýrů je proteolytické štěpení molekul kaseinů i jejich fragmentů způsobující změnu textury kaseinové hmoty za vzniku senzorycky významných látek, které dávají jednotlivým typům sýrů charakteristickou chuť a vůni¹; vedle nich však mohou vznikat i nežádoucí hořké peptidy². Reziduální množství proteolytických enzymů, která se podílejí na těchto pochodech, mohou představovat v syrářské technologii přidávaná syřidla, proteolytický systém přidávaných startovacích mléčných bakteriálních kultur i přirozeně kontaminujících mléčných bakterií a také endogenní proteiny mléka. Průběh a produkty proteolýzy jsou ovlivňovány nejenom koncentrací a specifiitou působících enzymů, ale také fyzikálně-chemickými podmínkami při technologii (pH, koncentrace solí, obsah vody, teplota)³. Jako první je v kaseinové micelle atakována syřidlovými proteasami molekula κ -kaseinu, která je na povrchu micely. Odštěpením makropeptidu je κ -kasein konvertován na tzv. para- κ -kasein, což destabilizuje kaseinové micely do té míry, že agregují a vypadávají z roztoku v podobě sraženiny. Během další technologie pak dochází k proteolýze α_{s1} -kaseinu, α_{s2} -kaseinu i β -kaseinu, zatímco para- κ -kasein je již k účinku proteas odolný. Nejprve jsou uvolňovány velké, ve vodě nerozpustné peptidy, které jsou postupně štěpeny na menší⁴. Bylo zjištěno, že hořké kaseinové peptidy mají průměrnou hydrofobicitu vztaženou na jednu aminokyselinu vyšší než 5860 J.mol⁻¹, zatímco fragmenty s hodnotou této veličiny nižší než 5440 J.mol⁻¹ hořké nejsou⁵. Pro případná technologická opatření proti hořké chuti sýrů je nezbytné posouzení, zda se vznikající hořký peptid v sýru akumuluje, nebo zda je dále hydrolyzován na nehořké fragmenty. Při studiu peptidů odštěpovaných během zrání sýrů je extrakt obvykle frakcionován podle rozpustnosti nebo velikosti molekuly, pomocí HPLC na reverzní fázi jsou separovány jednotlivé peptidy, které jsou finálně identifikovány Edmanovým odbouráváním nebo hmotnostní spektrometrií^{4,6}.

Pokud jsou předmětem separace hořké peptidy, je intenzita hořké chuti jednotlivých frakcí porovnávána s chutí standardních roztoků chininu nebo kofeinu. Tento analytický postup je však pro provozní kontrolu velice nákladný a zdlouhavý. Za určitých okolností by mohly být vhodným nástrojem ke sledování konkrétního peptidu z molekuly kaseinu imunochemické metody.

Pomocí imunostanovení makropeptidu uvolňovaného z κ -kaseinu proteasami psychrotrofních bakterií byla predikována trvanlivost mléka při skladování⁷. Enzymovou imunoanalýzou sledované koncentrace odštěpeného fosfopeptidu (f1–28) z β -kaseinu při zrání sýra umožnily hodnotit jeho stáří⁸. Senocq a spol.⁹ použili protilátky proti pěti peptidům z molekuly β -kaseinu k monitorování proteolýzy tohoto proteinu plasminem a chymosinem.

V této práci jsme připravili protilátky proti pěti dříve identifikovaným hořkým peptidům, které jsou odštěpovány z α_{s1} -kaseinu a β -kaseinu během zrání sýrů^{10,11}. Se získanými protilátkami byly sestaveny a charakterizovány postupy enzymové imunoanalýzy (ELISA) ke stanovení jednotlivých peptidů.

Experimentální část

Chemikálie

Hovězí sérový albumin (BSA), *o*-fenylendiamin a Tween 20 byly získány od Sigma Chemical Company, St. Louis, USA; želatina byla od firmy Fluka AG, SRN; konjugát peroxidasy s „druhými“ protilátkami (prasečími imunoglobuliny proti králíčím imunoglobulinům) byl získán od Sevapharmy, Praha (v katalogu označován jako SwAR/Px; koncentrace imunoglobulinů 8,1 mg.cm⁻³, molární poměr peroxidasa/imunoglobulin byl 1,15). Polystyrenové mikrotitrační destičky 8×12 jamek Costar 9018 byly dodány firmou Corning Costar, USA.

Pufrové roztoky

Tři nejčastěji používané pufrы při enzymové imunoanalýze byly značeny následujícími zkratkami: PBS („phosphate buffered saline“) – fosfátový pufr 0,01 mol.l⁻¹, pH 7,4, obsahující 0,8% NaCl, PBS-Tw – promývací pufr, PBS obsahující 0,05% Tween 20, PBS-Tw (s 1% želatinou) – ředicí pufr pro všechny imuno-reaktanty.

Peptidy

Bylo syntetizováno celkem 5 peptidů. Čtyři úseky z molekuly α_{s1} -kaseinu: ¹⁴EVLN¹⁷ (označení GB29), ¹⁷NENLL²¹ (GB30), ²⁶APFPQVF³² (GB31), ²⁶APFPQVFG³³ (GB34) a jeden úsek z β -kaseinu: ⁶¹FPFGPIPN⁶⁹ (GB33). Syntéza byla provedena na automatickém syntetizátoru peptidů Novasyn

Crystal (Calbiochem-Novabiochem, V. Británie). Čistota připravených peptidů (>95 %) byla kontrolována pomocí HPLC na reverzní fázi s použitím náplně kolon C_{18} o velikosti částic $5\ \mu\text{m}$ (Phenomenex, V. Británie), eluce gradientem acetonitril/voda. Identita peptidů byla kontrolována hmotnostní spektrometrií. Protože molekulová hmotnost všech uvedených peptidů je natolik nízká, že nemohou ve volné podobě provokovat tvorbu protilátek, byly pro potřeby imunizace syntetizovány imunogenní konjugáty peptidů s BSA. Pro tyto účely byla na volnou aminoskupinu peptidu zavedena sulphydrylová skupina pomocí 2-iminothiolan hydrochloridu (tzv. Trautovo činidlo). Takto modifikovaný peptid spontánně konjuguje s BSA, který byl aktivován pomocí sukcinimidyl 4-(*N*-maleinimidomethyl) cyklohexan-1-karboxylátu¹². Tyto konjugáty byly použity nejen jako imunogeny k imunizaci, ale také při vlastním imunochemickém stanovení jako molekuly obsahující epitopy, se kterými interagují připravené protilátky. V systému ELISA byly konjugáty imobilizovány na pevnou fázi.

Protilátky

Polyklonální antiséra proti každému z pěti syntetizovaných peptidů byla připravena imunizací králíků postupem detailně popsáným dříve¹³. Jako imunogeny byly použity konjugáty peptidů s BSA. Imunoglobulinová frakce každého antiséra byla izolována a purifikována afinitní interakcí s Proteinem A pomocí komerčních kolonek Prosep A (Sigma Chemical Company, USA), mrazově sublimována, a dále uchovávána při $-18\ ^\circ\text{C}$. Pro experimenty byl základní roztok protilátky o ředění 1:100 připravován rozpouštěním 1 mg sublimátu v 10 ml PBS.

Enzymová imunoanalýza

Byla použita kompetitivní nepřímá enzymová imunoanalýza (ELISA) se separací vázaných a volných imunoreaktantů prostřednictvím zakotvení na pevnou fázi. Nejprve byl na stěny jamek mikrotitračních destiček zakotven prostou sorpcí příslušný protein (konjugát peptidu s BSA nebo kasein) – zásobní roztok proteinu byl vhodně naředěn karbonát–bikarbonátovým pufrém ($0,05\ \text{mol.l}^{-1}$, pH 9,6) a pipetován do jamek v množství 200 μl ; po inkubaci 18 hodin při $4\ ^\circ\text{C}$ byl roztok proteinu vylit a jamky čtyřikrát promyty 200 μl PBS-Tw. Vlastní kompetitivní imunochemická interakce byla zahájena pipetováním 50 μl roztoku peptidu (či jiné testované látky) v PBS-Tw (s 1 % želatinou) a 50 μl vhodně naředěné anti-peptidové protilátky v PBS-Tw (s 1 % želatinou). Reakční roztoky byly inkubovány 1 hodinu při $37\ ^\circ\text{C}$ za mírného třepání. Poté byly jamky čtyřikrát promyty 200 μl PBS-Tw. Kvantifikace anti-peptidové protilátky, která byla zprostředkovávána imunochemickou reakcí zakotvena na stěny jamek, byla učiněna pomocí tzv. druhé protilátky značené peroxidasou. Do jamek bylo pipetováno 100 μl konjugátu SwAR/Px ředěného 1:2000 v PBS-Tw (s 1 % želatinou). Po inkubaci 1 hodinu při $37\ ^\circ\text{C}$ byl nenavázaný konjugát odstraněn čtyřmi promyvy 200 μl PBS-Tw. Dále bylo do jamek pipetováno 100 μl roztoku peroxidasového substrátu chromogenní látky ($0,03\%$ H_2O_2 v citrátovém pufru $0,1\ \text{mol.l}^{-1}$, pH 5,0, s $0,05\%$ *o*-fenylen-diaminem). Enzymová reakce byla po 15 minutách inkubace při $37\ ^\circ\text{C}$ zastavena přidávkou 50 μl H_2SO_4 ($2\ \text{mol.l}^{-1}$). Absorbance reakční směsi byla měřena v jamkách mikrotitrační

destičky na přístroji Multiscan MCC/340 (Labsystems, Finsko).

Vyhodnocení výsledků

Sigmoidní kalibrační křivky byly prokládány počítačovým programem Microsoft Excel pomocí čtyřparametrové regresní funkce

$$A = C + \frac{D - C}{1 + \exp(-2 \times (\alpha + \beta \times x))} \quad (1)$$

kde A je absorbance při 492 nm, C je dolní asymptota křivky, D je horní asymptota, α charakterizuje posun lineární části sigmoidní křivky v systému souřadnic, β charakterizuje sklon lineární části sigmoidní křivky, x je dekadický logaritmus koncentrace antigenu ($\log c$).

Detekční limit byl počítán jako koncentrace $c_{80\%}$ odpovídající hodnotě absorbance, jež představuje 80 % z rozmezí $D - C$ (označeno jako $A_{80\%}$) podle rovnice

$$\log(c_{80\%}) = \frac{\frac{\ln\left(\frac{D - A_{80\%}}{A_{80\%} - C}\right)}{-2} - \alpha}{\beta} \quad (2)$$

kde $A_{80\%} = C + 0,8(D - C)$

Podobně může být vyjádřen další charakteristický parametr kalibrační křivky $c_{50\%}$ pomocí $A_{50\%}$. A pomocí stejné rovnice (2) lze vypočítat koncentraci analytu v analyzovaném vzorku ze změřené hodnoty absorbance.

Výsledky a diskuse

Bylo syntetizováno pět peptidů, které jsou odštěpovány z α_s -kaseinu a β -kaseinu během zrání sýrů, a proti nim byly připraveny polyklonální protilátky. Se získanými protilátkami byly sestaveny a charakterizovány postupy enzymové imunoanalýzy (ELISA) ke stanovení jednotlivých peptidů.

Metoda kompetitivní nepřímé ELISA používá obecně platné uspořádání analytické procedury. Nejprve je standard antigenu imobilizován na stěny jamek na mikrotitračních destičkách, potom je do jamek napipetována protilátka proti stanovovanému analytu (tzv. „první“ protilátka) a analyzovaný vzorek s analytem (nebo roztok standardu analytu). Po ustavení rovnováhy a vymytí všech reakčních složek nefixovaných na stěnu jamky je přidán přebytek konjugátu enzymu s tzv. „druhou“ protilátkou (protilátka proti „první“ protilátce). Finálně kvantifikovaná aktivita enzymu, který je zprostředkovává fixován na jamku destičky, je pak přímo úměrná množství „druhé“, a tím i „první“ protilátky fixované na jamku, a tudíž nepřímou úměrnou koncentraci analytu ve vzorku. Citlivost a specifita popsané procedury ovlivňuje kombinace celé řady faktorů, jako jsou např. sorpční vlastnosti destiček, koncentrace standardu antigenu v potahovacím roztoku, afinita a specifita „první“ protilátky a její koncentrace v systému.

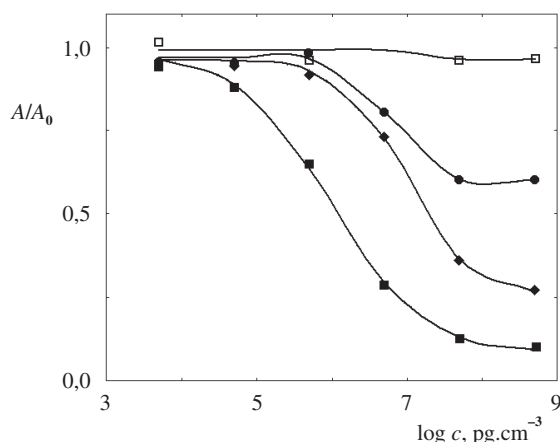
Pro každý ze sledovaných pěti peptidů byly nejprve zjištěny hodnoty vhodných koncentrací antigenu v roztoku pro imo-

Tabulka I

Charakteristika kalibračních křivek ELISA s protilátkami proti peptidům

Peptid	Ředění protilátky v ELISA	Látka imobilizovaná na pevnou fázi (koncentrace ^a [mg.cm ⁻³])	Detekční limit [μg.cm ⁻³]	
			<i>c</i> _{50%}	<i>c</i> _{80%}
GB29	1:200	BSA-GB29 (2)	ND ^b	ND ^b
GB30	1:500	BSA-GB30 (2)	ND ^b	ND ^b
GB31	1:1000	BSA-GB31 (2)	13,5	4,1
GB34	1:4000	BSA-GB34 (2)	9,7	2,5
GB33	1:1000	BSA-GB33 (2)	14,4	4,6
GB29	1:1000	α-kasein (4)	6,9	2,1
GB30	1:1000	α-kasein (4)	6,6	1,1
GB31	1:500	α-kasein (10)	11,4	2,6
GB33	1:500	β-kasein (10)	7,6	2,8

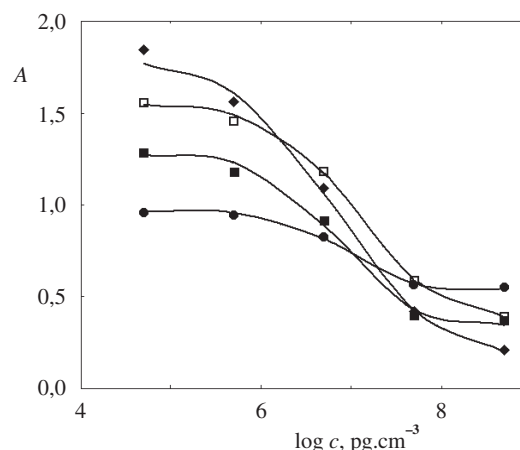
^a Koncentrace v roztoku pro imobilizaci, ^b nebylo možné sestavit kalibrační křivku pro stanovení peptidu (peptid v roztoku neinhiboval interakci protilátky s látkou imobilizovanou na pevnou fázi)



Obr. 1. Kalibrační křivky pro různé kompetitory v systému ELISA s imobilizovaným konjugátem BSA-GB34 a s protilátkami proti tomuto konjugátu: ● peptid GB34, □ BSA, ● α-kasein, ■ konjugát BSA-GB34

bilizaci ve spojitosti s konkrétní koncentrací příslušné protilátky. Aplikovaný experiment představoval proceduru prezentované metody ELISA bez přidávání roztoku analytu do kompetice. Jednotlivé řádky a sloupce jamek na destičkách se lišily koncentrací antigenu v roztoku pro imobilizaci a koncentrací „první“ protilátky. Naměřené hodnoty absorbancí odpovídají parametru *D* v rovnici (1) (horní asymptota kalibrační křivky). Vhodné pro další experimenty ELISA jsou takové dvojice hodnot koncentrací uvedených imunoreagencií, při kterých je dosaženo absorbance v rozpětí hodnot 0,8 až 1,5.

V experimentech, kdy byl na stěny jamek imobilizován konjugát příslušného peptidu s BSA, se podařilo sestavit kalibrační křivky pouze pro peptidy GB31, GB34 a GB33. Tabulka I sumarizuje důležité parametry těchto kalibračních křivek. Pro koncentrace uvedených peptidů blízkých hodnotě *c*_{50%} byla hodnota relativní směrodatné odchylky menší než 12 % (pro deset stanovení v rámci jedné destičky) a menší než 9 % (pro stanovení na čtyřech destičkách). Příklady křivek



Obr. 2. Kalibrační křivky v systému ELISA s imobilizovaným kaseinem a s protilátkami proti příslušnému konjugátu BSA-peptid: ■ GB29, ● GB30, □ GB31, ● GB33

získaných v tomto systému s protilátkami proti GB34 jsou uvedeny na obr. 1. Pro všechny tři zmíněné peptidy lze shrnout, že interakci protilátky s konjugátem BSA-peptid fixovaným na pevnou fázi vůbec neinhibuje BSA, do značné míry ji inhibuje kasein, ze kterého peptid pochází, mnohem více však příslušný peptid a jeho konjugát s BSA. Zbývající dva peptidy (GB29 a GB30) ani ve vysokých koncentracích nepůsobily významné snížení hodnoty absorbance dosahované v systému s nulovou koncentrací peptidu v roztoku. To vypovídá o tom, že schopnost interagovat s protilátkou má konjugát, ale ne samotný peptid. Může to být způsobeno tím, že se jedná o poměrně krátké peptidy (tetrapeptid a pentapeptid). Dosavadní práce o imunochemickém stanovení kaseinových peptidů se zabývají strukturami s 10–20 aminokyselinovými zbytky^{14,15}.

Bylo zjištěno, že α-kasein interaguje s protilátkami proti GB29, GB30, GB31 a GB34 a že β-kasein interaguje s protilátkami proti GB33. Této skutečnosti jsme využili pro sest-

vení ELISA, při kterých je na stěny jamek imobilizován kasein, jehož součástí je sekvence sledovaného peptidu. Ve všech případech bylo možno sestavit kalibrační křivky (obr. 2). Pro koncentrace analytů blízkých $c_{50\%}$ byla hodnota relativní směrodatné odchylky menší než 15 % (pro stanovení v rámci jedné destičky) a menší než 11 % (pro stanovení na třech destičkách). Z důvodu interakce kaseinů s protilátkami proti peptidům musí být před imunochemickým stanovením těchto peptidů v extraktech sýrů předem odstraněny proteiny a vysokomolekulární peptidy.

Závěr

Za použití polyklonálních protilátek proti peptidům byly vypracovány a charakterizovány analytické postupy kompetitivní nepřímé enzymové imunoanalýzy. Detekční limity pro jednotlivé peptidy se pohybovaly v rozmezí 1–5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Pro koncentrace ve středu kalibrační křivky byly stanoveny hodnoty relativních směrodatných odchylek menší než 15 %. Pomocí výše prezentovaných imunochemických postupů bude sledována tvorba hořkých peptidů během zrání sýrů s cílem zjistit podmínky, při kterých k jejich tvorbě (resp. kumulaci) nedochází.

Práce byla finančně podporována GA ČR, je součástí projektu GA ČR 525/99/1507.

LITERATURA

1. Fox P. F., Mc Sweeney P. L. H.: *Food Rev. Int.* 12, 457 (1996).
2. Habibi-Najafi M. B., Lee B. H.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, 397 (1996).
3. Exterkate F. A., Lagerwerf F. M., Haverkamp J., Van Schalkwijk S.: *Int. Dairy J.* 7, 47 (1997).
4. Singh T. K., Fox P. F., Healy A.: *J. Dairy Res.* 64, 433 (1997).
5. Ney K. H.: *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 147, 64 (1971).

6. Gagnaire V., Mollé D., Herrouin M., Léonil J.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 4402 (2001).
7. Picard C., Plard I., Rongdaux-Gaida D., Collin J.-C.: *J. Dairy Res.* 61, 395 (1994).
8. Pizzano R., Nicolai M. A., Padovano P., Ferranti P., Barone F., Addeo F.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 4555 (2000).
9. Senocq D., Dupont D., Rolet-Repecaud O., Faurie F., Levieux D.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 1571 (2001).
10. Richardson B. C., Creamer L. K.: *N. Z. J. Dairy Sci. Tech.* 8, 46 (1973).
11. Huber L., Klostermeyer H.: *Milchwissenschaft* 29, 449 (1974).
12. Bieniarz C., Husain M., Barnes G., King C. A., Welch C. J.: *Bioconjugate Chem.* 7, 88 (1996).
13. Vítková M., Rauch P., Fukal L.: *Czech J. Food Sci.* 20, 76 (2002).
14. Pizzano R., Nicolai M. A., Addeo F.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 766 (1998).
15. Black C. L., Reynolds E. C.: *J. Immunol. Meth.* 214, 63 (1998).

M. Vítková^a, L. Fukal^a, G. Brett^b, and P. Rauch^a (^a*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*, ^b*Institute of Food Research, Norwich, UK*): **Enzyme Immunoassay of Bitter Peptides from Caseins**

Five peptides have been targeted to be synthesised which are correlated to bitter flavour of cheeses. Four are from α_{s1} -casein ($^{14}\text{EVLN}^{17}$, $^{17}\text{NENLL}^{21}$, $^{26}\text{APFPQVF}^{32}$, and $^{26}\text{APFPQVFG}^{33}$) and the fifth from β -casein ($^{61}\text{PFPGIPNS}^{69}$). Using rabbit polyclonal antibodies raised against conjugates of these peptides with bovine serum albumine, competitive indirect ELISA methods for determination of peptides have been constructed and characterised. The detection limits for individual peptides are in the range 1–5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. For concentrations in the centre of standard sigmoid curves, values of relative standard deviation were estimated to be less than 15 %.