

EVA GREEN REAL-TIME PCR USED TO DETECT CELERY AS AN ALLERGEN IN FOOD.

Ondrej Škultéty, Jurčáková Andrea

ABSTRACT

EvaGreen® Real-Time PCR method has been used for celery (*Apium graveolens*) allergen detection. A primer designed in mannitol dehydrogenase gene region has been used for specific celery identification in sample. The results show possibility to create calibration curve using artificially adulterated samples. An increasing variability between parallel calibration of celery samples has been observed from 0.1 % to 100%. The detection limit has been set to value 0.1% in celery representing 1000 ppm. Fluorescent signal has been presented even in samples with lower percentage addition of celery but these samples have been excluded according to unspecific melting curve.

Keywords: apium graveolens; food analysis; detection limit; polymerase chain reaction

ÚVOD

Potravinové alergény sa stávajú čoraz viac a viac sledované medzinárodným potravinovým obchodom a orgánmi pre bezpečnosť potravín. To poskytuje spotrebiteľovi informácie, ako sa vyhnúť zdravotnému riziku spôsobenému potenciálnym alergénom v potravine (Hupfer et al., 2007). Potravinová alergia je definovaná ako "hypersenzitivita zapríčinená imunologickými mechanizmami" (Johansson et al., 2001). Alergia na potraviny ovplyvňuje asi 3% až 4% dospeljej populácie (Sampson, 2004). Výsledok celého procesu je okamžitá alergická reakcia sprevádzaná procesom, ktorý môže mať za následok lokálne príznaky v mieste kontaktu, napr. v ústnej dutine. Môže vzniknúť aj žalúdočno-črevná precitlivosť s nevoľnosťou, zvracaním alebo hnačkou, povrchové príznaky ako žihľavka a ekzém, dýchacie príznaky, systémové anafylaxie s kardiovaskulárnymi a žalúdočno-črevnými príznakmi ktoré niekedy vedú k šoku (Isacsson et al., 2000). Aj keď väčšina potravinových alergénov spôsobuje mierne reakcie, v niektorých prípadoch môžu spôsobiť ohrozenie života. Vylúčenie potraviny je momentálne jediná dostupná liečba (Sampson, 2003). Aktuálne metódy používané k detegovaniu alergénov v potravinách sú hlavne ELISA, PCR a Real-time PCR (Van Hengel, 2007; Bošiak, Židek a Golian, 2009; Bajzik et al., 2010; Revák, Židek a Golian, 2010; Zelenáková et al., 2010). Real-time PCR je založená na meraní fluorescenčného signálu, ktorý sa zväčšuje počas amplifikácie PCR produktu. Esovité krivky získané z hodnoty fluorescencie v danom počte cyklov je používaná na kvantifikáciu cieľovej DNA vo vzorke. Kvantifikácia je založená na prahovom cykle, teda cykle, v ktorom môžeme rozoznať fosforeskujúci signál od šumu pozadia. Real-time PCR metóda umožňuje zistenie alergénnej zložky v potravine na úrovni 10 mg.kg⁻¹ a nižšej (Stephan et al., 2004; Hird et al., 2003).

MATERIÁL A METÓDY

Príprava vzoriek

Príprava vzorky zo zakúpenej hlúzy zeleru spočívala v umytí hlúzy, ošúpaní, nastrúhaní jadra hlúzy a následným sušením pri teplote 60 °C 12 hodín. Po vysušení sme jednotlivé kúsky rozomleli mixérom na jemný prášok a zhomogenizovali 10 minút pri 10 000 otáčkach za minútu v homogenizátore (Ovidomix). Na prípravu rôznych koncentrácií sme použili hladkú

múku. Podobným spôsobom pripravovali vzorky aj autori Hupfer et al. (2007).

Pafundo et al. (2009) pri príprave vzoriek riedili samotnú DNA, čo je v porovnaní s našou metódou síce jednoduchšie, ale pri zostavovaní kalibračnej krivky sú v tomto prípade skreslené výsledky. Zelerový prášok s múkou sme miešali desiatkovým systémom riedenia nasledovne: 0,5g vzorky zeleru na 4,5g hladkej múky. Vzorky sme vážili na analytických váhach s presnosťou na 3 desatinné miesta. Po navážení sa vzorky dokonale premiešali za pomoci Vortexu (Biosan) približne 1 minútu. Takýmto spôsobom sme pripravili 9 riedení od 100% kontrolnej vzorky (vzorka čistého zelerového prášku) až po vzorku s obsahom zeleru 0,000001%. Všetky hodnoty sú uvedené v tabuľke č.1.

Tabuľka 1 Navážka vzoriek a identifikácie detekčného limitu

Poradie vzorky	Obsah zeleru vo vzorke [%]	PCR
vzorka 1	100	+
vzorka 2	10	+
vzorka 3	1	+
vzorka 4	0,1	+
vzorka 5	0,01	-
vzorka 6	0,001	-
vzorka 7	0,0001	-
vzorka 8	0,00001	-
vzorka 9	0,000001	-
Neg. kontrola	0	-

Extrakcia DNA

Extrakciu DNA zo vzoriek sme robili za pomoci komerčného kitu určeného na gonomicnú purifikáciu DNA z potravín NucleoSpin®Food (Macherey-Nagel, Suisse) podľa priloženého protokolu.

Primery

Na detekciu prítomnosti zeleru vo vzorke sme použili primery na detekciu manitol dehydrogenázy (GenBank, Accession No. AF067082). Primery sme použili od autorov (Dovičovičová et al., 2004). Autori navrhli primery celF 5'-CAGCCTGTTTCCCGTACGAGAT -3' a celR 5' -TGCCAAATAAAGATTCGAGATTGT -3'. Primery boli navrhnuté a otestované programom Primer Express software (Applied Biosystem) s teoretickou teplotou topenia 60 °C. Primery boli otestované s nehomologickými DNA sekvenciami iných rastlín použitím softvéru Blast 2.1

(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md., USA), (Jurčáková et al., 2011).

PCR reakcia:

EvaGreen Real-Time PCR

Reakčná zmes na jednu vzorku pre PCR v celkovom objeme 20µl bola pripravená z 10µl Fast EvaGreen® qPCR Master Mix (Biotium), 6µl bidestilovanej vody, 2µl templátovej DNA a primermi celF a celR po 1µl, tak, ako to stanovuje výrobca v užívateľskom manuáli.

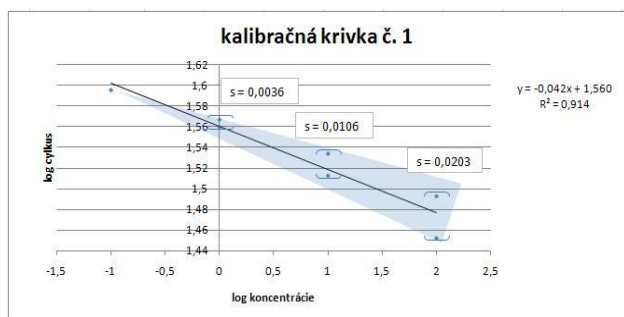
Tabuľka 2 Zloženie mastermixu pre vzorku

Komponenty PCR reakcie	Koncentrácia zásobného roztoku	Koncentrácia použitého roztoku
Fast EvaGreen® qPCR Master Mix	2x	1x
celF	10 pmol/µl	0,50 pmol/µl
celR	10 pmol/µl	0,50 pmol/µl
DNA	-	2

PCR reakcia bola zahájená počiatočnou denaturáciou prebiehajúcou pri teplote 95 °C po dobu 5 minút a následne v 40 cykloch tieto 3 kroky: denaturácia pri 94 °C po dobu 30 sekúnd, annealing pri 59 °C po dobu 30 sekúnd, polymerizácia pri 72 °C po dobu 1 minúty, po ktorej nasledovalo meranie fluorescencie. V ďalšom kroku nasledovala konečná polymerizácia pri 72 °C, po dobu 8 minút, po ktorej prebiehal melting pri teplote 95 °C s následným ochladením na 65 °C s výdržou 15 sekúnd. Real-Time PCR prebiehala v prístroji LightCycler 1,5 (Roche). Analýza vzoriek bola vykonaná v programe LightCycler Software 4.05 pomocou procedúry „Absolute Quantification“ a „Tm Calling“. Získané dáta boli spracované do tabuliek v programe EXCEL 2007.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

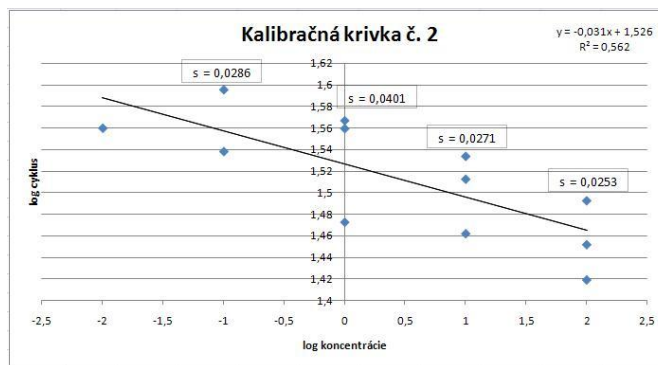
Vzorky zámerné kontaminované prímiesou zeleru boli paralelne testované za účelom vyhodnotenia variability kalibračnej krivky v rámci jednej PCR reakcie.



Obrázok 1 kalibračná krivka paralelných kalibračných vzoriek zeleru v jednom PCR mixe

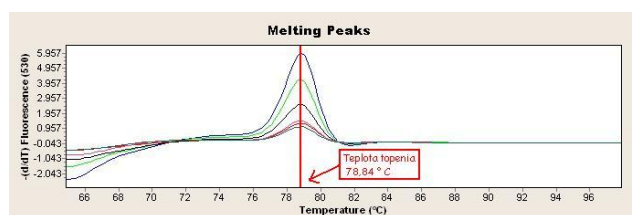
Na osi x sú logaritmované hodnoty koncentrácie zeleru vo vzorke a na osi y je logaritmus cyklu v ktorom vzorka prekročila nešpecifické pozadie. Na základe koncentrácie PCR produktu v jednotlivých cykloch sme zostavili

kalibračnú krivku, ktorej smerodajné odchýlky sa znižujú od 100% čistej kontrolnej vzorky smerom k riedenej 0,1% vzorke zeleru. Z toho vyplýva, že keď stanovujeme v detekčnom limite (do 0,1%) vzorku, najmenšia odchýlka bude pri najviac riedenej vzorke a naopak najväčšia je pri 100% čistej kontrolnej vzorke zeleru. Dochádza však ku kalibračnej chybe pri paralelných vzorkách v rámci rovnakého PCR mixu. Napriek tejto variabilite kalibračných vzoriek je determinačný koeficient vysoký, z čoho vyplýva, že regresná rovnica je vhodná na predpovedanie hodnoty y s koeficientom determinácie 0,914.



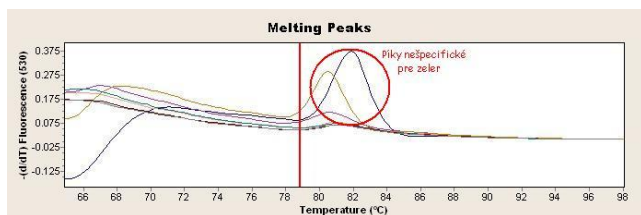
Obrázok 2 Kalibračná krivka detekcie zeleru pri opakovaných vzorkách v rôznych PCR mixoch

Veľká variabilita, ktorú môžeme sledovať na obrázku 2 spôsobuje, že pri opakovaných vzorkách sa síce dá vytvoriť kalibračná krivka, avšak má malú spoľahlivosť. Smerodajné odchýlky sú rozdielne, najvyššia je však pri hodnote 0, čiže pri 1% koncentrácií zeleru vo vzorke. Pri hodnote 2, čiže vzorke s koncentráciou zeleru 100% je smerodajná odchýlka najnižšia. Determinačný koeficient dosahuje hodnotu 0,5627, čiže spoľahlivosť interpolácie výsledkov je 74,9 % a daná regresná rovnica sa nedá používať paušálne, teda vždy musíme pri detekcii použiť aspoň jednu kalibračnú vzorku, aby sme mohli určiť tvar kalibračnej krivky, z ktorej si potom môžeme zostaviť regresnú rovnicu, na základe ktorej budeme predpovedať hodnoty y.



Obrázok 3 Krivky topenia PCR produktov

Na tomto obrázku vidíme krivky topenia fragmentu špecifického pre zeler. Na osi x je teplota a na osi y derivácia fluorescencie. Teplota topenia je 78,84 °C. Wu et al. (2010) uvádzajú teplotu topenia špecifického zelerového fragmentu 67,8 °C pri využití SYBR® Green Real-Time PCR s použitím iných primerov. Intenzita fluorescencie je najvyššia pri vzorke so 100% obsahom zeleru a postupne klesá pri vzorkách s nižším obsahom zeleru vo vzorke. Na základe intenzity fluorescencie by sa mohol zeler vo vzorke kvantifikovať, tak ako to vo svojich prácach uvádzajú autori Pafundo et al. (2009) a (Wu et al., 2010), avšak táto metóda je len orientačná a na základe nej nemôžeme stanoviť presný obsah zeleru vo vzorke.



Obrázok 4 Krivky topenia PCR produktov

Na obrázku 4 pozorujeme nešpecifické pozadie u vzoriek s nízkou koncentráciou DNA zeleru (0,01 a nižšej), ktorých teplota topenia sa výrazne líši od teploty špecifickej pre zeler a tým pádom nevieme touto metódou identifikovať vzorky s koncentráciou zeleru nižšou ako 0,1%. **Dovičovičová et al. (2004)** vo svojej práci, zameranej na dôkaz zeleru za pomoci PCR s vizualizáciou na gély, uvádzajú rovnaký detekčný limit s použitím rovnakých primerov. **Wu et al. (2010)** sa zameriavali na SYBR[®] Green Real-Time PCR s použitím iných primerov ako my a ich detekčný limit pri surovom zeleri bol 0,001% a pri tepelne ošetrených vzorkách 0,01%. **Hupfer et al. (2007)** použili na stanovenie detekčného limitu Taqman[™] sondu a dokázali identifikovať zeler vo vzorke s koncentráciou 0,001%.

ZÁVER

Alergické reakcie na potraviny vyplývajú z nárastu imunitných odpovedí na glykoproteínové zložky prítomné v potravinách a predstavujú častý zdravotný problém. Zeler je uznaný ako jeden z hlavných potravinových alergénov, ktoré môžu byť prítomné v potravinách a z uvedeného dôvodu musí byť jeho prítomnosť označená. Na to, aby mohla byť zložka potravín kvantifikovaná, je potrebné zostrojiť kalibračnú krivku. Pre získanie kalibračnej krivky boli použité vzorky s rôznym podielom zelerového prášku vo vzorke. Môžeme konštatovať, že primerový pár špecifický pre prítomnosť zeleru navrhnutý autormi **Dovičovičová et al. (2004)**, je schopný korektne detegovať prítomnosť prímеси zeleru len do koncentrácie 0,01 %. Pri nižšom zastúpení zeleru vo vzorke primerový pár nešpecificky reaguje a vytvára produkty, ktoré by u náhodnej vzorky nebolo možné jasne definovať.

LITERATÚRA

BAJZÍK, P., GOLIAN, J., ŽIDEK, R., ČAPLA, J., BELEJ, Ľ., ONDREJKA, M., MRÁZOVÁ, Ľ., MARŠÁLKOVÁ, L. 2010. Methods for fish species identification in food products. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 2, p. 1-5.

BOŠIAK, M., ŽIDEK, R., GOLIAN, J. 2009. Soy quantification on food products by real-time polymerase chain reaction. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 1, p. 3-5.

DOVIČOVIČOVÁ, Ľ., OLEXOVÁ, L., PANGALLO, D., SIEKEL, P., KUČHTA, T. 2004. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of celery (*Apium graveolens*) in food. In *Eur Food Res Technol*, vol. 218, 2004, p. 493-495

HIRD, H., LLOYD, J., GOODIER, R., BROWN, J., REECE, P. 2003. Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. In *Eur Food Res Technol*, vol. 217, 2003, p. 265-268

HUPFER, Ch., WAIBLINGER, H. U., BUSCH, U. 2007. Development and validation of a real-time PCR detection method for celery in food. In *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 225, 2007, p. 329-335

ISACSSON, J., CAO H., OHLSSON, L., NORDGREN, S., SVANVIK, N., WESTMAN, G., KUBISTA, M., SJÖBACK, R., SEHLSTEDT, U. 2000. Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. In *Molecular and Cellular Probes*, vol. 14, 2000, p. 321-328

JOHANSSON, S., HOURIHANE, J., BOUSQUET, J., BRUIJNZEEL-KOOMEN, C., DREBORG, S., HAAHTELA, T., KOWALSKI, M., MYGIND, N., RING, J., VAN CAUWENBERGE, P., VAN HAGE-HAMSTEN, M., WÜTHRICH, B. 2001. A revised nomenclature for allergy. In *Allergy*, vol. 56, 2001, p. 813-824

JURČÁKOVÁ, A., REVÁK, O., ŠKULTÉTY, O. 2011. Molecular – genetics methods for the determination of celery (*Apium Graveolens*) as an allergen in food. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, mimoriadne číslo, p. 134-136

PAFUNDO, S., GULLI, M., NELSON, M. 2009. SYBR[®]GreenER[™] Real-Time PCR to detect almond in traces in processed food. In *Food Chemistry*, vol. 116, 2009, p. 811-815

REVÁK, O., ŽIDEK, R., GOLIAN, J. 2010. Lupina biela ako nová hrozba pre alergikov a jej stanovenie pomocou optimalizovanej PCR reakcie. In *Food Hygiene and Technology 40th Lenfeld s and Hokls Days*, Brno, s. 155-158 ISBN 978-80-7305-121-1

SAMPSON, H. A. 2003. Anaphylaxis and emergency treatment. In *Pediatrics*, vol. 111, 2003, p.1601-1608

SAMPSON, H. A. 2004. Update on food allergy. In *J Allergy Clin Immunol*, vol. 113, 2004, p.805-819

STEPHAN, O. – VIETHS, S. 2004. Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. In *J Agric Food Chem*, vol. 52, 2004, p. 3754-3760

VAN HENGEL, A. J. 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. In *Anal Bioanal Chem*, vol. 389, 2007, p.111-118

WU, Y., CHEN, Y., WANG, B., GAO, Y., BAI, L., WANG, H. 2010. SYBR Green Real-Time PCR used to detect celery in food. In *Journal of AOAC International*, vol. 93, 2010, no. 5, p. 1530-1536

ZELEŇÁKOVÁ, L., ŽIDEK R., ČANIGOVÁ, M., POULOV, J., GALLICOVÁ, T. 2010. Evaluation of Elisa method to detection of cow-lactoglobulin in sheep milk and sheep milk products. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 4, p. 80-84

Acknowledgments:

This work was supported by grant KEGA 3/7255/09 and VEGA 1/0619/10.

Contact address:

Ondrej Škultéty, Student, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia E-mail: orey7th@gmail.com

Ing. Andrea Jurčáková. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: andrea.jurcakova@gmail.com