

ENTWICKLUNG EINES SANDWICH-ELISAS ZUR DETEKTION VON LUPINEPROTEINEN IN LEBENSMITTELN

Christina Ecker, Margit Cichna-Markl

Institut für Analytische Chemie, Universität Wien; Währinger Straße 38, 1090 Wien

EINLEITUNG

Lupine zählt mit einem Proteingehalt von mehr als einem Drittel des Trockengewichtes zu den proteinreichsten Hülsenfrüchten [1]. Insbesondere die weiße Süßlupine (*Lupinus albus*) wird auf Grund ihrer Eignung für Milcheiweißallergiker sowie für Zöliakie-Patienten in verschiedenen Speisen verwendet. Der hohe Gehalt an Kleberproteinen qualifiziert Lupine als Zusatz zu Weizenmehl sowie als Ersatz von Sojabohnen und Sojamehl und erleichtert die Produktion von glutenfreien und veganen Produkten wie Brot, Keksen, Nudeln, Soßen und Fleischersatzprodukten. In den letzten zehn Jahren stieg die Anzahl lupinehaltiger Produkte signifikant, wodurch auch die Prävalenz von allergischen Reaktionen auf Lupine zunahm [2, 3, 4]. In den Samen der Süßlupine enthaltenes Conglutin wurde als Allergen identifiziert [5]. In Folge des allergenen Potenzials ist eine Kennzeichnung von lupinehaltigen Produkten in der EU gesetzlich vorgeschrieben [6]. Um Lupine auch in Spuren nachzuweisen, müssen empfindliche Analysemethoden entwickelt werden, welche auch bei verarbeiteten Produkten ohne aufwendige Probenaufarbeitung rasch ein Ergebnis liefern können.

Als einfaches Screening-Verfahren für die Detektion von Lebensmittelallergenen eignen sich Enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs). Sandwich-ELISAs zeichnen sich durch niedrige Nachweisgrenzen sowie durch eine hohe Selektivität aus, da es zur Anwendung von zwei gegen verschiedene Epitope gerichteten Antikörpern kommt.

ELISAs zur Detektion von Lupineproteinen in Lebensmitteln, welche allerdings gewisse Kreuzreaktivitäten aufweisen, sind bereits bekannt und kommerziell erhältlich [7, 8, 9]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA für die Detektion von Lupineproteinen in Lebensmitteln entwickelt, optimiert und validiert.

EXPERIMENTELLES

Proteinextrakte. 10 g der geriebenen oder mittels Küchenmixer zerkleinerten Proben wurden für 2 min mittels Ultraturrax in 50 mL eines Extraktionspuffers (0.1 M Tris / 0.5 M Glycin, pH 8.7) homogenisiert. Das Gemisch wurde für 30 min bei 1500 g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert, der Überstand filtriert, zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Proteinextrakte wurde mittels Bradford Assay bestimmt, als Standardprotein diente Bovines Serumalbumin (BSA).

Universeller Arbeitspuffer. Ein PBS-Puffer, pH 7.6, wurde für alle weiteren Verdünnungsschritte verwendet. Zur Herstellung wurden 21.25 g NaCl, 31.15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 3.9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 2.5 L Wasser gelöst.

Herstellung der Antikörper. Zwei Hühner und zwei Kaninchen wurden in regelmäßigen Abständen mit einem Lupine-Proteinextrakt der Konzentration 1 mg/mL immunisiert. Der Proteinextrakt wurde hergestellt, indem 1 g Lupinemehl (*Lupinus albus*) in 10 mL des Extraktionspuffers über Nacht bei 45°C in einem Wasserbad gerührt wurde. Nach Zentrifugation und Filtration wurde die Konzentration mittels Bradford Assay bestimmt und der Extrakt mit PBS-Puffer verdünnt.

Herstellung von IgG in Kaninchen: Der Proteinextrakt wurde fünf Mal während eines Zeitraums von zwei Monaten in zwei Kaninchen injiziert. Sieben Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere ausgeblutet, das Antiserum wurde aliquotiert und ohne weitere Reinigungsschritte für die Entwicklung des ELISAs verwendet.

Herstellung von IgY in Hühnern: Zwei Hühner wurden mit einem Proteinextrakt der Konzentration 1 mg/mL von M. Hermann (Institut für Molekulare Pathologie (IMP), Medizinische Universität Wien) über einen Zeitraum von dreieinhalb Monaten alle zwei Wochen immunisiert. Antikörper wurden aus Eiern, welche je sieben Tage nach den jeweiligen Immunisierungszeitpunkten gelegt wurden, mittels Ammonsulfatfällung isoliert.

Puffer zur Durchführung des ELISAs. Alle Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

Coating-Puffer: Der verwendete Carbonatpuffer mit pH 9.6 wurde durch Lösen von 1.59 g Na_2CO_3 , 2.93 g NaHCO_3 und 0.2 g NaN_3 in 1 L Wasser hergestellt.

Waschpuffer: Zur Herstellung einer Stocklösung eines TBST-Puffers, pH 7.6, wurden 51 g NaCl, 9.36g NaH₂PO₄·2H₂O, 74.76 g Na₂HPO₄·2H₂O und 30 mL Tween 20 in 1 L Wasser gelöst. 30 mL dieser Stammlösung wurden mit Wasser auf 1.8 L verdünnt und zum Waschen der Mikrotiterplatte verwendet.

Substratpuffer: Ein Citratpuffer, pH 4.5, wurde hergestellt, indem 46.04 g Kaliumdihydrogencitrat und 0.1 g Sorbinsäure in 1 L Wasser gelöst wurden.

Tetramethylbenzidinlösung: 0.375 g Tetramethylbenzidin wurden in 5 mL Dimethylsulfoxid und 20 mL Methanol gelöst.

Substratlösung: 0.5 mL der Tetramethylbenzidinlösung wurden mit 25 mL Citratpuffer verdünnt und 100 µL 1%iges H₂O₂ wurden zugesetzt.

Als Stopplösung diente eine 0.5 M H₂SO₄.

Durchführung des ELISAs. Der Assay wurde mit Mikrotiterplatten (F96 Nunc immuno plate) durchgeführt. Die Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte auf einem automatischen Schüttler (IKA MTS 2/4 digital). Auf jeden Inkubationsschritt folgte ein Waschschrift, welcher mit einem automatisierten Immunoplatewasher (BioRad, Modell 1575) durchgeführt wurde. Die Optische Dichte bei 450 nm wurde mit einem 680 XR Microtiterplaterereader (BioRad) gemessen, zur Auswertung der Daten wurde eine nichtlineare Regression über eine logistische Funktion mittels Sigma Plot durchgeführt.

Optimierte Standardprozedur.

- 1) Coating: 200 µL einer Lösung von IgY in Coating Puffer mit einer Konzentration von 14 µg/mL wurden auf die Mikrotiterplatte aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert.
- 2) Blocking: 300 µL einer 2 %igen Casein-Lösung in PBS wurden aufgebracht und für 60 min bei 25 °C unter Schütteln inkubiert.
- 3) Aufbringen der Standards bzw. Proben: Je 100 µL der in PBS hergestellten Standardlösungen bzw. der 1:10 mit PBS verdünnten Probelösungen wurden für 30 min inkubiert.
- 4) Aufbringen des sekundären Antikörpers: Das Antiserum wurde 1:15000 mit PBS verdünnt, je 200 µL davon wurden aufgebracht und für 30 min inkubiert.
- 5) Inkubation des enzymmarkierten Antikörpers: Ein kommerzieller anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege markiert mit Meerrettichperoxidase wurde mit PBS 1:70000 verdünnt, 200 µL wurden aufgebracht und für 60 min inkubiert.

- 6) Aufbringen der Substratlösung: Je 200 μL der Substratlösung wurden in jede Kavität pipettiert, nach Auftreten einer Blaufärbung (ca. 10 min) wurde die enzymatische Reaktion mit 100 μL einer 0.5 M H_2SO_4 gestoppt.
- 7) Messung der Optischen Dichte, Auswertung.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Optimierung des Sandwich-ELISAs. Die optimierte Standardprozedur wurde durch Variation folgender Schritte ermittelt: Coating, Blocking, Aufbringen des sekundären Antikörpers, Aufbringen des enzymmarkierten Antikörpers. Die Eignung von sowohl IgG als auch IgY als Coatingreagens respektive als sekundärer Antikörper wurde untersucht. In den durchgeführten Experimenten zur Optimierung wurden folgende Parameter variiert:

- Coatingtemperatur: 4 °C, 37 °C
- Coatingkonzentration: 1:5000, 1:10000, 1:15000, 1:30000, 1:50000
- Blockzeit: 15 min, 30 min, 45 min, 60 min
- Konzentration des sekundären Antikörpers: 1:50000, 1:30000, 1:15000, 1:10000
- Inkubationszeit des sekundären Antikörpers: 30 min, 45 min, 60 min
- Konzentration des enzymmarkierten Antikörpers: 1:30000, 1:50000, 1:70000

Die Steilheit der Kalibrationskurve, die Größe des dynamischen Bereichs sowie das Leerwertsignal wurden herangezogen, um die jeweils optimalen Bedingungen zu selektieren. Eine repräsentative Kalibrationskurve ist Abbildung 1 zu entnehmen. Die Nachweisgrenze des entwickelten Sandwich-ELISAs betrug 1.9 ng/mL, die Bestimmungsgrenze 5.0 ng/mL.

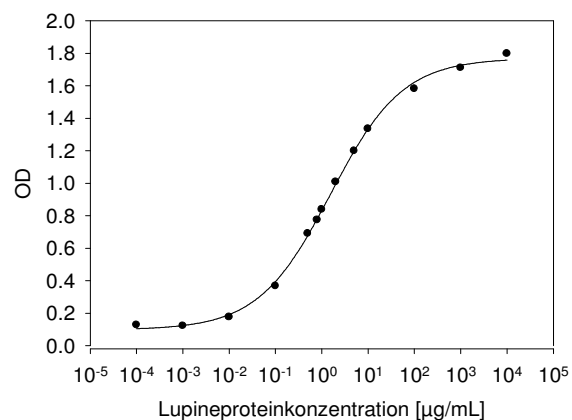


Abb. 1: Repräsentative Kalibrationskurve

Matrix- und Puffereffekte. Um zu prüfen, ob komplexe Matrizes die Analysenergebnisse beeinflussen, wurden 8 verschiedene lupinefreie Lebensmittel extrahiert. Die Extrakte wurden zur Verdünnung des Lupineproteinextraktes und in Folge zur Erstellung von Kalibrierfunktionen verwendet. Die so erhaltenen Kalibrationskurven wurden mit solchen, welche durch Verdünnung mit PBS hergestellt wurden, verglichen. Ein Einfluss auf die Steilheit der Kalibrationskurven wurde beobachtet. Um eine Beteiligung der unterschiedlichen pH-Werte des Extraktionspuffer (pH 8.7) und des PBS-Puffers (pH 7.6) an diesem Effekt zu untersuchen, wurden Mischungen aus den beiden Puffern in verschiedenen Verhältnissen hergestellt und zur Verdünnung von Proteinextrakten verwendet. Der bei den dadurch erhaltenen Kalibrierfunktionen beobachtete Effekt konnte somit als Puffereffekt identifiziert werden. Der Einfluss des pH-Wertes des Extraktionspuffers kann durch eine Verdünnung des Proteinextraktes von mindestens 1:10 mit PBS aufgehoben werden, auch Matrixeffekte sind bei hinreichender Verdünnung nicht zu beobachten.

Kreuzreaktivität.

Die Kreuzreaktivität des entwickelten Sandwich-ELISAs wurde mit 33 Zutaten, welche typischerweise in lupinehaltigen Lebensmitteln verwendet werden, wie Nüssen, Leguminosen, Cerealien und Samen getestet. Als Maß für die Kreuzreaktivität wurde das Verhältnis der Konzentrationen der halben Sättigung des Antikörpers mit Probe und Lupinestandard herangezogen ($KR [\%] = c_{50}(\text{Lupine}) / c_{50}(\text{Probe}) * 100$). Keiner der 33 Proteinextrakte zeigte eine Kreuzreaktivität über 0,01%.

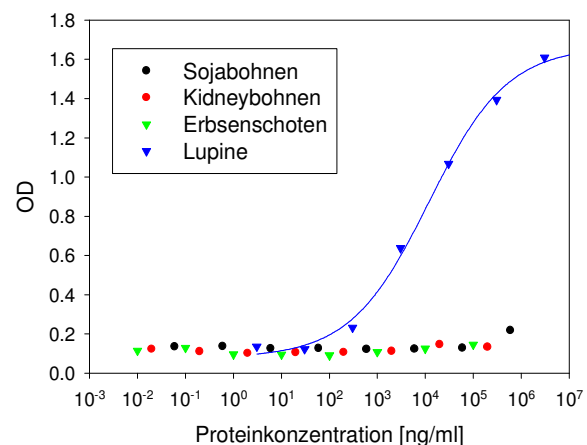


Abb. 2: Kreuzreaktivitätstest mit Leguminosen

Detektierbarkeit anderer Lupinespezies.

Die Anwendbarkeit des Sandwich-ELISAs auf blaue und gelbe Lupine wurde untersucht, indem Proteinextrakte aus Samen verschiedener Lupinespezies aufgetragen wurden und mit Standardkurven von weißer Lupine verglichen wurden. Sorten der blauen (*Lupinus angustifolius*) und gelben Lupine (*Lupinus luteus*) können detektiert werden, Standardkurven der blauen Lupine unterscheiden sich nur leicht von denen der weißen Lupine.

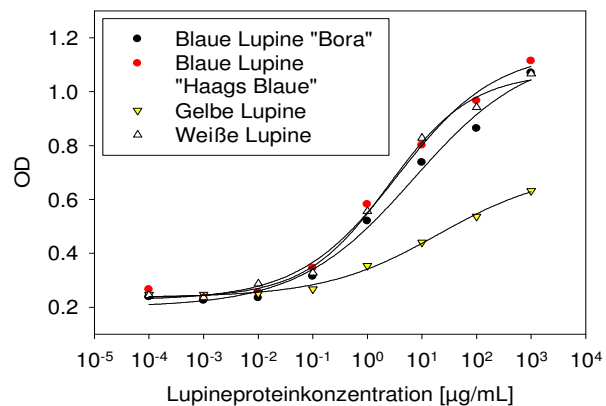


Abb. 3: Standardkurven verschiedener Lupine-Spezies

LITERATUR:

- [1] Duranti, M.; Consonni, A.; Magni, C.; Sessa, F.; Scarafoni, A. The Major Proteins of Lupin Seed: Characterisation and Molecular Properties for Use as Functional and Nutraceutical Ingredients. Trends Food Sci. Technol. 19 (2008) 624-633
- [2] De las Marinas, D.; Cojocariu, Z.; Escudero, R.; Pardo, N.; Sanz, M.L.; Anaphylaxis Induced by Lupine as a Hidden Allergen. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 17 (2007) 283-284.
- [3] Moneret-Vautrin, D.-A.; Guerin, L.; Kanny, G.; Flabbee, J.; Fremont, S.; Morisset, M. Cross-allergenicity of peanut and lupine: The risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. J. Allergy Clin. Immunol. 104 (1999) 883-888.
- [4] Peeters, K.A.B.M.; Nordlee, J.A.; Penninks, A.H.; Chen, L.; Goodman, R.E.; Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M.; Hefle, S.L.; Taylor, S.L.; Knulst, A.C. Lupine allergy: Not simply cross-reactivity with peanut or soy. J. Allergy Clin. Immunol. 120 (2007) 647-653.
- [5] Goggin, D. E.; Mir, G; Smith, W. B.; Stuckey, M.; Smith, P. M. C. Proteomic Analysis of Lupine Seed Proteins to Identify Conglutin β as an Allergen, Lup an 1. J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 6370-6377
- [6] RICHTLINIE 2007/68/EG DER KOMMISSION vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten. Amtsblatt der Europäischen Union vom 28. November 2007
- [7] Holden, L.; Faeste, C.K.; Egaas, E. Quantitative Sandwich ELISA for the Determination of Lupine (*Lupinus* spp.) in Foods. J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 5866-5871.
- [8] Holden, L.; Moen, L.H.; Sletten, G.B.G.; Dooper, M.M.B.W. Novel Polyclonal-Monoclonal-Based ELISA Utilized to Examine Lupine (*Lupinus* species) Content in Food Products. J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 2536-2542.
- [9] Kaw, C. H.; Hefle, S. L.; Taylor, S. L. Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of Lupine Residues in Foods. J. Food Sci. 73(2008) 135-140