
COMPARISON OF TWO DIFFERENT PROCEDURES FOR FLUORESCENT LABELING OF DNA USED TO IDENTIFY THE ALLERGEN OF CELERY

Škultéty O., Židek R.

Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences,
Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76, Nitra, Slovak
Republic

E-mail: Orey7th@gmail.com

ABSTRACT

Two separate methods EvaGreen® and SYBRGreen® Real-Time PCR was used to detection celery (*Apium graveolens*), as an allergenic food ingredients. On the specific identification of the presence of celery in the sample was used species-specific primer designed in the gene for mannitol dehydrogenase. Different variability and specificity was observed in parallel multiple calibration samples. The result is two different assessment procedures for fluorescent labeling of DNA used to identify the allergen of celery.

Key words: *Apium graveolens*, celery, Real-Time PCR

ÚVOD

Potravinové alergény sa stávajú čoraz viac a viac sledované medzinárodným potravinovým obchodom a orgánmi pre potravinovú bezpečnosť. 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 % dospelaj 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 byť spôsobená aj žalúdočno-črevná precitlivosť s nevoľnosťou, zvracaním alebo hnačka, povrchové príznaky ako žihľavka a ekzém, dýchacie príznaky, systémové anafylaxie s kardiovaskulárnym 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 detekovaniu alergénov v potravinách sú hlavne ELISA, PCR a Real-time PCR (**Van Hengel, 2007; Bošiak, Židek a Golian, 2009; Bajzík et al., 2010; Revák, Židek a Golian, 2010; Zeleňáková et al., 2010**).

MATERIÁL A METODIKA

Príprava vzoriek

Príprava vzorky zo zakúpenej hľuzy zeleru spočívala v umytí hľuzy, ošúpaní, nastrúhaní jadra hľuzy a následným sušením pri teplote 60 °C 12 hodín. Po vysušení sme jednotlivé kusky 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: 0,5 g vzorky zeleru na 4,5 g 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.

Názov vzorky	Obsah zeleru vo vzorke [%]
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

Tabuľka č. 1 Navázka vzoriek

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'-CAGCCTGTTCCCGTACGAGAT-3' a celR 5'-TGCCAAATAAAGATTTCGAGATTGT-3'. Primery boli navrhnuté a otestované programom Primer Express software (Applied Biosystem) s teoretickou teplotou topenia okolo 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 20 µl bola pripravená z 10µl Fast EvaGreen® qPCR Master Mix (Biotium), 6 µl bidestilovanej H₂O, 2 µl templátovej DNA a primermi celF a celR po 1 µl, tak ako to stanovuje výrobca v užívateľskom manuáli.

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

Tabuľka č. 2 Zloženie Fast EvaGreen[®] mastermixu pre vzorku

SYBRGreen[®] Real-Time PCR

Reakčná zmes na jednu vzorku pre PCR v celkovom objeme 20 μl bola pripravená z 2 μl SYBRGreen I, 0,8 μl SYBR MgCl₂, 13,2 μl SYBR H₂O, 2 μl templátovej DNA a primermi celF a celR po 1 μl, tak ako to stanovuje výrobca v užívateľskom manuáli.

Komponenty PCR reakcie	Koncentrácia zásobného roztoku	Koncentrácia použitého roztoku
SYBRGreen I	10x	1x
SYBR MgCl ₂	25 mM	1 mM
celF	10 pmol/μl	0,50 pmol/μl
celR	10 pmol/μl	0,50 pmol/μl

Tabuľka č. 3 Zloženie SYBRGreen[®] mastermixu pre vzorku

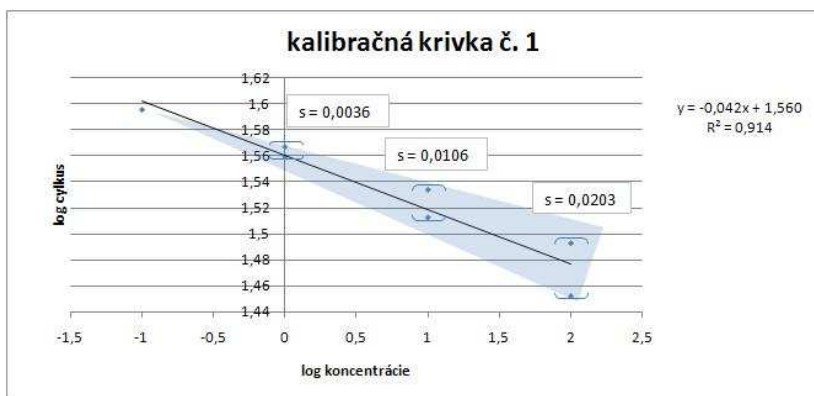
PCR reakcia bola zahájená počiatočnou denaturáciou prebiehajúcou pri teplote 95 °C po dobu 5 minút a následne v 40 cykloch (EvaGreen[®] Real-Time PCR) a v 50 cykloch (SYBRGreen[®] Real-Time PCR) tieto 3 kroky: denaturácia pri 94 °C po dobu 30 sekúnd, annealing pri 59 °C po dobu 30 sekúnd, polymerizácia pri 72 °C po dobu 1 minúty po ktorej nasledovalo meranie fluorescence. 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 DISKUZE

V tabuľke číslo 4 môžeme vidieť porovnanie detekčného limitu rovnakých vzoriek dvomi rozdielnymi metódami. Pri EvaGreen bol detekčný limit 0,1 % a pri SYBRGreen 1 %.

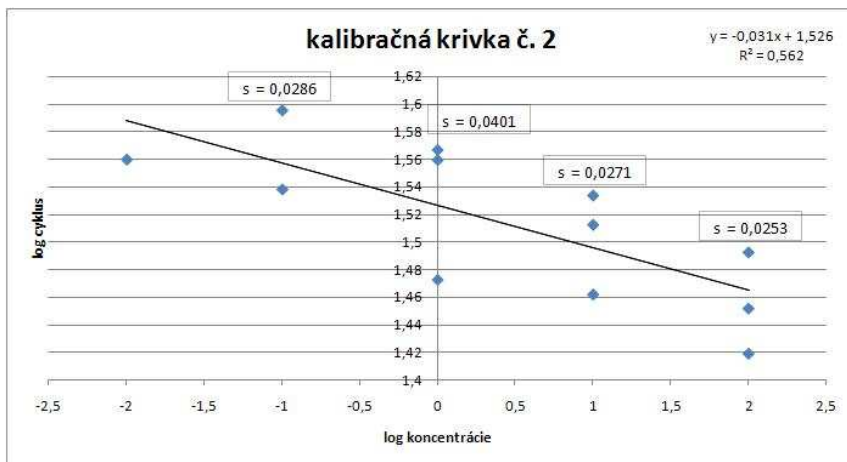
Obsah zeleru vo vzorke [%]	EvaGreen® Real-Time PCR	SYBRGreen® Real-Time PCR
100	+	+
10	+	+
1	+	+
0,1	+	-
0,01	-	-
0,001	-	-
0,0001	-	-
0,00001	-	-
0,000001	-	-
0	-	-

Tabuľka č. 4 Identifikácia detekčného limitu



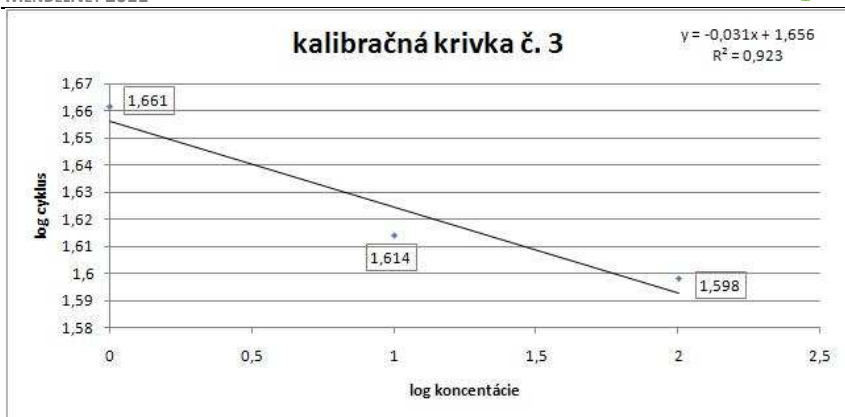
Obrázok č.1 Kalibračná krivka detekcie zeleru - EvaGreen® Real-Time PCR

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. Determinačný koeficient je vysoký z čoho vyplýva že regresná rovnica je vhodná na predpovedanie hodnoty y s percentom pravdepodobnosti 0,956.



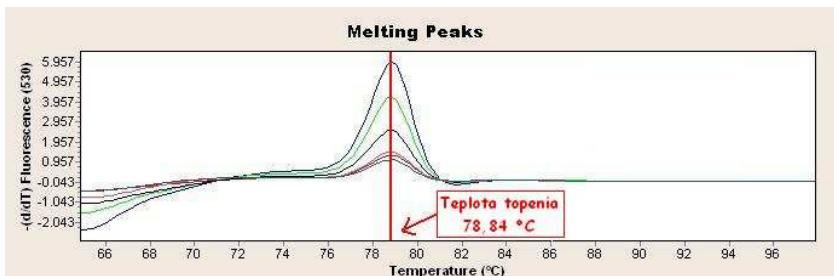
Obrázok č. 2 Kalibračná krivka detekcie zeleru - EvaGreen® Real-Time PCR

Veľká variabilita, ktorú môžeme sledovať na obrázku č. 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 percento pravdepodobnosti je 0,749 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.

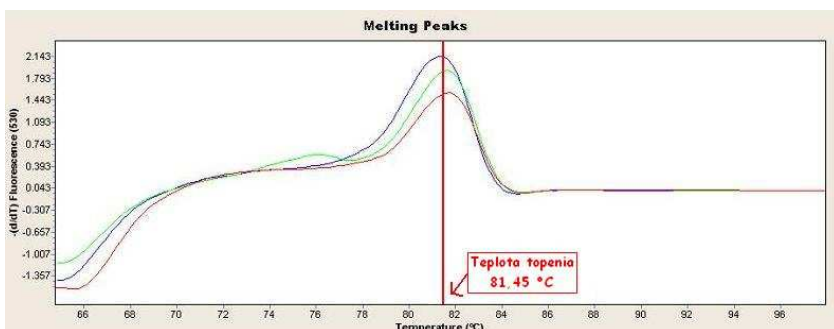


Obrázok č. 3 Kalibračná krivka detekcie zeleru - SYBRGreen® Real-Time PCR

Determinačný koeficient má hodnotu 0,923 z čoho vyplýva že regresná rovnica je vhodná na predpovedanie hodnoty y s percentom pravdepodobnosti 0,960.

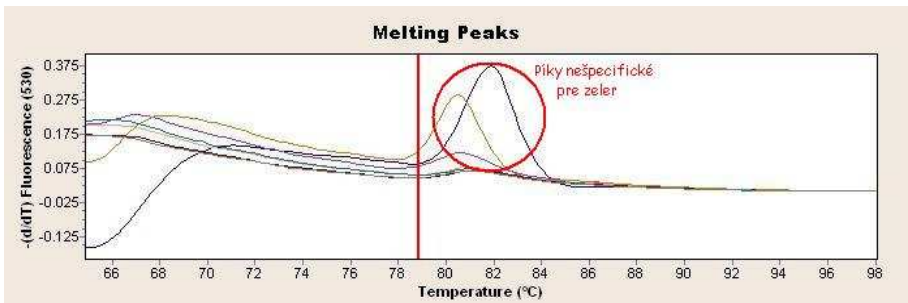


Obrázok č. 4 Krivky topenia EvaGreen® Real-Time PCR



Obrázok č. 5 Krivky topenia SYBRGreen® Real-Time PCR

Na týchto obrázkoch jasne vidíme krivky topenia fragmentu špecifického pre zeler. Na osi x je teplota a na osi y derivácia fluorescence. Pri EvaGreen® Real-Time PCR je teplota topenia fragmentu 78,84 °C a pri SYBRGreen® Real-Time PCR je teplota topenia fragmentu 81,45 °C. Pri porovnaní týchto dvoch priemerných hodnôt teploty zisťujeme u každej metódy iné hodnoty topenia zelerového fragmentu pri použití rovnakých primerov. **Wu et al. (2010)** uvádzajú teplotu topenia špecifického zelerového fragmentu 67,8 °C pri využití SYBRGreen® Real-Time PCR s použitím iných primerov. Intenzita fluorescence je najvyššia pri vzorke so 100% obsahom zeleru a postupne klesá pri vzorkách s nižším obsahom zeleru vo vzorke. Na základe intenzity fluorescence 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 č. 6 Krivky topenia 2 EvaGreen® Real-Time PCR

Na obrázku č. 6 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 použitým 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 ošetrovaných vzorkách 0,01 %.

Hupfer et al. (2007) použili na stanovenie detekčného limitu Taqman™ sondu a dokázali identifikovať zeler vo vzorke s koncentráciou 0,001 %.

ZÁVĚR

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 korektné detegovať prítomnosť prímеси zeleru len do koncentrácie 0,01 %. Pri nižšom zastúpení zeleru vo vzorke primerový pár nešpecificky reaguje a vytvára iné produkty.

LITERATURA

- BAJŽÍK, P., GOLIAN, J., ŽIDEK, R., ČAPLA, J., BELEJ, E., ONDREJKA, M., MRÁZOVÁ, E., 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, L. et al. 2004. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of celery (*Apium graveolens*) in food. In *Eur Food Res Technol*, vol. 218, 2004, p. 493-495
- 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. et al. 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. et al. 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, no. 2, 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
- 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. et al. 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