



Finns det gluten i glutenfri mat?

Den här laborationen visar en metod för att analysera mycket små mängder gluten i livsmedel. Det är en metod som utnyttjar förmågan hos en antikropp att mycket specifikt binda till en antigen, i det här fallet proteinet gliadin som ingår i gluten. Vi vill besvara frågorna:

- Hur kan vi detektera gluten?
- Vilka olika slag av livsmedel kan innehålla gluten?
- Är glutenfria livsmedel verkligen glutenfria?
- Hur kan vi koppla undersökningarna av gluteninnehåll till medicinska problem med glutenintolerans?

Bakgrund

Gluten finns i sädeslagen vete, råg och korn. Det består till lika delar av prolaminer som är lösliga i alkohol (gliadin hos vete, sekalin hos råg och hordein hos korn) och gluteniner som är lösliga i alkali. Man räknar med att gliadin motsvarar 50% av totala gluteninnehållet. Gluten skadar tarmen hos patienter som lider av sjukdomen celiaki och kosten för dessa patienter måste vara glutenfri. Havre kan ingå i kosten för de flesta som är glutenintoleranta. Havreproteinet avenin har en annan aminosyrasekvens än de proteiner som orsakar besvär.

Produkter som passar för personer med glutenintolerans är dels produkter baserade på vete-stärkelse, där man så långt det är möjligt tagit bort protein, dels produkter baserade på exempelvis majs, ris, hirs och bovete.

Det ELISA-test som vi använder är förstavalsmetod för analys av gluten i livsmedel. Den kan användas på både råvaror och upphettade produkter.

För extraktion av gluten används en särskild extraktionslösning och vid analys av produkter som innehåller kakao tillsätts skummjörkspulver till provet före extraktion. Tanniner (polyfenoler i kakao) stör annars mätmetoden.

Metodens detektionsgräns är 1,5 ppm gliadin, vilket motsvarar 3 ppm gluten. Det glutenliknande proteinet i havre (avenin) detekteras inte med metoden, inte heller majs och hirs.

Princip

Metoden är en direkt sandwich EIA (enzyme immuno assay), baserad på en monoklonal antikropp (R5) riktad mot den toxiska epitopen QQFPF i sekalin. Epitopen finns även repeterande i α -gliadin, ω -gliadin och i hordein.

Den primära antikroppen sitter fäst i botten på en mikrotiterplatta och fångar in gliadiner och motsvarande proteiner från råg och korn i provet. Ett antigen-antikropps-komplex bildas. Efter inkubation och tvätt tillsätts en peroxidämärkt sekundär antikropp. Denna antikropp är samma antikropp som den primära. Den peroxidämärkta antikroppen binder till det bundna gliadin-antikropps-komplexet.



I nästa steg tillsätts ett substrat (urea/väteperoxid) för enzymet samt en kromogen (TMB) vilket leder till att en blå färg utvecklas.

Efter tillsats av stopplösning övergår den blå färgen till gult. Färgens intensitet, som kvantifieras genom mätning i en spektrofotometer vid våglängden 450 nm är proportionell mot mängden gliadin i provet.

Gliadinkoncentrationen i provet beräknas med hjälp av en standardkurva där olika koncentrationer av gliadin avsatts mot absorbansen. Glutenhalten i provet beräknas genom att 50% av gluteninnehållet antas utgöras av gliadin.

Testkit, lösningar och utrustning

Testkitet innehåller en 96-håls mikrotiterplatta (12 strips med 8 brunnar var). Brunnarna är täckta av med monoklonala antikroppar (R5). Kitet innehåller alla reagens utom extraktionsbuffert, 2-propanol och mjölkpulver. Kitet förvaras i kylskåp (+2 °C – 8°C). Extraktionslösningen förvaras i rumstemperatur. När testet genomförs ska alla komponenter hålla rumstemperatur.

Vatten: Använd vatten som renats med jonbytare och har minst resistiviteten 18 MΩ.

Extraktionsbuffert (köps separat): Extraktion av alla prover har gjorts i förväg. Beskrivning av utförandet ingår i originalbeskrivningen, men tas inte upp här.

Tvättbuffert för tvätt av mikrotiterplattans brunnar: Spädning av den koncentrerade bufferten har gjorts i förväg (hållbar 1 månad vid förvaring i kylskåp). Eventuella kristaller löses genom att bufferten placeras vattenbad 37°C. (Spädning 1:10 med avjonat vatten.)

Sample diluent (spädningsbuffert för spädning av provextrakt): Den koncentrerade spädningsbufferten späds 5 gånger genom att ta en del spädningsbuffert och 4 delar vatten.

Referensprov: Provet innehåller ca 10 ppm gliadin. Det behandlas på samma sätt som proverna.

Gliadinstandarder: I testkitet ingår 6 standardlösningar med 0 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 40 ppb, och 80 ppb gliadin i lösning. Lösningarna ska inte spädas.

Konjugat: Konjugatet består av peroxidaskonjugerade anti-gliadin antikroppar. Lösningen späds med vatten i förhållandet 1 del konjugat och 10 delar avjonat vatten (1:11). För 3 strips späds 300 µl konjugat med 3 ml vatten.

Substratlösning: Lösningen innehåller urea/väteperoxid. Ingen spädnings ska göras.

Kromogenlösning: Lösningen består av TMB (tetrametylbendizid). Ingen spädnings ska göras.

Stopplösning: Lösningen innehåller svavelsyra (1N), frätande, undvik kontakt med hud. Ingen spädnings ska göras.

Utrustning:

- Vortexmixer
- Värmesåp eller vattenbad, 50°C
- Centrifug, för 15 ml eller eppendorfrör, minst 2500 rpm
- Falconrör med skruvlock
- Eppendorfrör
- Automatpipetter, 50-1000 µl, 5 ml, 10 ml
- Mikrotiterplattläsare med ett filter för avläsning vid 450 nm



Beredning av provextrakt

1. Alla redskap som exempelvis mortlar, glasbägare och spatlar måste rengöras noggrant mellan varje prov och efter avslutad provberedning för att undvika kontamination.
2. Sätt på värmeinkubatorn med skakfunktion, $60 \pm 5^\circ\text{C}$.
3. Märk ett 15 mL Falconrör för varje livsmedel, samt ytterligare ett för positiv kontroll (referensprov).
4. Homogenisera minst 5 g eller 5 ml av livsmedelsproverna genom att exempelvis mortla och blanda så att ett homogent material erhålls med så små partiklar som möjligt.

Arbeta i dragskåp och med handskar:

- Prover i vätskeform: Blanda 0,25 ml av det homogeniserade provet + 2,5 ml av extraktionslösningen (vortexa).
 - Andra livsmedelsprover: 0,25 g av det homogeniserade provet + 2,5 ml av extraktionsbufferten blandas (vortexa).
 - Livsmedel med soja, hirs, quinoa, bovete och choklad/kakao, kaffe, kastanj och kryddor: 0,25 g av det homogeniserade provet + 0,25 g mjölkpulver + 2,5 ml av extraktionsbufferten blandas (vortexa).
 - Kött och korv: En större mängd, 50 g, homogeniseras eftersom gliadinet kan vara ojämnt fördelat. Väg upp 0,25 g homogeniserat prov och blanda med 2,5 ml extraktionsbuffert (vortexa).
5. Inkubera proverna 15 min i 60°C under skakning.
 6. Låt proverna svalna och tillsätt sedan 7,5 ml 68% 2-propanol. (Spädning: 68 ml 2-propanol + 32 ml destillerat vatten).
 7. Inkubera proverna i 10 minuter 1 timme i vattenbad vid 60°C .
 8. Centrifugera proverna vid 2500 rpm i 10 min vid rumstemperatur och eller filtrera extraktet. Alternativt kan 2 ml av extraktet centrifugeras med hög hastighet i 10 minuter i en mikrocentrifug.

Centrifugeringen kan också göras två gånger för att försäkra sig om att partiklar centrifugerats ner. Överför i så fall supernatanten från första centrifugeringen till nya Falconrör och rören vid 2500 rpm i 10 min vid rumstemperatur.
 9. Häll supernatanten i rör med skruvlock.
 10. Provextrakten (spädda 1:40) kan efter centrifugering förvaras i mörker och i rumstemperatur upp till 4 veckor. Extraktet får inte förvaras i kylskåp, då faller glutenproteinerna ut.

pre-ELISA

Ta ut ELISA-kitet från kylan och låt samtliga komponenter bli rumstempererade före användning.

Provextrakten och referensprovet måste spädas ytterligare minst 1:12,5 ggr före ELISA analysen annars stör kemikalierna i extraktionsbufferten immunoassayen. Dessa späds med sample diluent som i sin tur måste spädas (1:5) först. Se nedan.

Spädning av sample diluent:

Späd den koncentrerade sample diluent 5 gånger genom att ta 1 del spädningsbuffert och 4 delar avjonat vatten. (Ex: 10 ml sample diluent + 40 ml avjonat vatten. Gör bara den mängd, som åtgår vid analystillfället.)



Spädning av prov och referens (1:12,5):

100 µL av provextraktet späds med 1150 µL av den spädda sample diluent (1:5). Den totala spädningen blir då 500 gånger. (Om ytterligare spädningar behöver göras används extrakten (spädda 1:500) och späds med lika sample diluent i seriespädning.)

ELISA – Utförande

1. Ta ut det antal mikrotiterbrunnar som behövs till analysen.
2. Tillsätt till mikrotiterbrunnarna:
 - a. Pipettera 100 µL av vardera av gliadin standarderna (1 – 6) till resp. brunn enligt ELISA-mallen. Dessa används för konstruktion av standardkurvan.
 - b. Pipettera 100 µL av de utspädda provextrakten samt det utspädda referensprovet till respektive brunn enligt ELISA mallen.
3. Täck mikrotiterbrunnarna med aluminiumfolie och inkubera plattan i rumstemperatur i 30 min. Skaka inte.
4. Töm brunnarna genom att vända plattan upp och ner på ett mjukt underlag av pappershanddukar. Slå plattan försiktigt mot underlaget tills brunnarna tömts. Skölj brunnarna 5 ggr med den spädda tvättbufferten och töm vätskan mellan varje gång på samma sätt som ovan. Se till att brunnarna har tömts helt när sköljningen är avslutad.
5. Tillsätt 100 µL av den spädda konjugatlösning till samtliga brunnar. Blanda försiktigt med en cirkulerande rörelse. Täck brunnarna med aluminiumfolie och inkubera i rumstemperatur 30 min.
6. Töm brunnarna och skölj 5 ggr med den spädda tvättbufferten på samma sätt som ovan.
7. Tillsätt 50 µL substratlösning och 50 µL kromogenlösning per brunn. (De båda lösningarna blandas strax före tillsättningen och 100 µL av blandningen sätts till varje brunn). Blanda försiktigt genom en cirkulerande rörelse. Täck plattan med aluminiumfolie och inkubera i rumstemperatur i 30 min.
8. Stoppa reaktionen genom att tillsätta 100 µL stopplösning till alla brunnarna. Färgen i brunnarna övergår då från blått till gult. Blanda försiktigt genom en cirkulerande rörelse och avläs sedan absorbansen vid 450 nm. Avläsningen bör ske inom 30 min efter det att stopplösningen tillsatts.