الكشف عن كلايدين الحنطة والعلاقة المناعية لبعض برولامينات الحبوب بطريقة الانتشار المناعي

سلوى ليلو عزيز عبدالمجيد حماد السامرائي ضحى داود سلمان

قسم الصناعات الغذائية والتقانات الإحيائية / كلية الزراعة / جامعة بغداد

المستخلص

استخدمت طريقة بسيطة هي طريقة الانتشار المناعي المزدوج للكشف عن برولامينات بعض الحبوب (الحنطة ، الشعير، الذرة والرز) فضلاً عن توضيح العلاقة المناعية بين برولامينات هذه الحبوب. وقد لوحظ وجود علاقة مناعية مشتركة بين برولامين الحنطة (Gliadin) وبرولامين الشعير (Hordin) مع المصل المضاد لكلايدين الحنطة وعدم وجود علاقة مع كل من برولامين الذرة (Zein) والرز (Oryzenin) وأمكن استخدام المصل ذاته للكشف عن نسبة 1% من الطحين الممزوج مع اللحم الخام.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 36(3) : 137 – 140, 2005 Aziz *et al.*

DETECTION OF WHEAT GLIADIN AND IMMUNOLOGICAL RELATION OF SOME CEREAL PROLAMINS BY DOUBLE IMMUNO DIFFUSION METHOD

S. L. Aziz A. M. H. Al-Samarraie D. D. Salman

Food Sci . and Biotechnology Dept., College of Agric. Univ. of Baghdad

ABSTRACT

A simple precise method (double immuno diffusion technique) was used to detect prolamins in some cereals (wheat , barley , corn and rice) as well as to find immunological relation between these cereals . Immuno cross reaction was seen between wheat gliadin and barley prolamin (hordin) against the gliadin antiserum , but there was no relation between corn prolamin (zein) and rice prolamin (oryzenin) . The same serum was used to detect as low as 1% of wheat flour mixed with raw meat.

المقدمة

تعد بروتينات الحنطة ومنها البرولامينات من المواد الواسعة الاستعمال في الاغذية المصنعة لدورها في تحسين نوعية المنتج بسبب خصائصها الفيزيوكيمياوية ، فضلاً عن دخولها في بعض المنتجات الصيدلانية من الحبوب والكبسول كمادة رابطة ، وفي استطلاع في كندا اظهر ان هناك (60) منتوجاً صيدلانياً يحتوي على الكلوتين (4) لذا فأن البحث عنها في هذه المنتجات جاء لسببين احدهما يتعلق بالنواحي القانونية والسيطرة النوعية على الاغذية للحد من عمليات الغش فيها والاخر يتعلق بالنواحي الطبية ويعد الكلايدين وهو بروتين الحنطة الذائب بالكحول من انواع البرولامينات المسؤولة بشكل رئيسي عن مرض حساسية الحنطة Coliac disease والذي يعد من الامراض المزمنة التي تصيب الامعاء الدقيقة في الصغار والكبار على حد سواء (1) والذي ينتج عنه حدوث اضرار جسيمة في الانسجة المخاطية المبطنة للامعاء الدقيقة مما يسبب سوء عملية الامتصاص (6 ، 14).

وقد اشارت البحوث الى سمية كل من برولامينات الحنطة والتريتيكيلي والشعير والشيلم وبدرجة اقل الشوفان. بينما الحبوب الاخرى مثل الرز والذرة فقد ثبت عدم سميتها (8 ، 9 و 14) ويعد حالياً الغذاء الخالي من الكلوتين (Gluten Free) (GFD) (Dite هو العلاج الوحيد لمرض حساسية الحنطة.

اختلفت الدول والمنظمات الدولية في تحديد نسبة الكلوتين المسموح بتناولها من قبل المرضى ، ففي استراليا سمح بنسبة (0.3%) من بروتين الحبوب المسببة لحساسية الحنطة في المنتوج كحد اقصى وهي مماثلة للنسبة المحددة من قبل منظمة الصحة العالمية والزراعة الدولية (WHO/FAO Codex Alimentarius guidelines) ولكن لا يمكن اعتباره غذاء خالي من الكلوتين ، بينما سمحت الولايات المتحدة الامريكية بنسبة (3%) (1 ، 14) في حين عدت منظمة (WHO) نسبة 1 ملغم / 100 غم من المنتج محسوبا على اساس الوزن الجاف منتوجا خاليا من الكلوتين (9). ولاهمية الموضوع اهتمت كثير من الدراسات بالطرائق التحليلية للكشف عن الكلايدين في منتجات الاغذية منها استخدام الترحيل الكهربائي والـ (HPLC) الا ان هذه التقنيات تحتاج الى اجهزة معقدة ومكلفة مقارنة بطرائق ادق وابسط واكثر تخصصاً وهي التقنيات المناعية والتي منها تقنية الانتشار المناعي (3) والايليزا (ELIZA) سواء باستخدام الاجسام المضادة المتعددة Polyclonal antibodies (2، 4، 10، 14) او وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies (11 ، 12، 13) .

*تاريخ استلام البحث 2004/5/13 ، تاريخ قبول البحث 2005/5/14

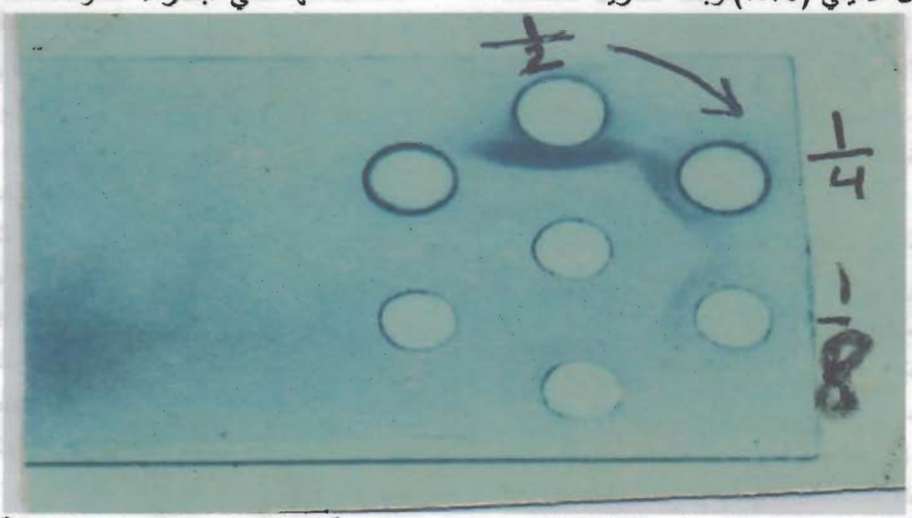
لذا تهدف هذه الدراسة الى استخدام تقنية الانتشار المناعي المزدوج للكشف عن كلايدين الحنطة وبرولامينات الحبوب المسببة لحساسية الحنطة.

المواد وطرائق العمل

استخلصت برولامينات الحنطة والشعير والذرة والرز باستخدام الايثانول (70%) بعد ازالة الالبومينات والكلوبيولينات باستخدام (0.15%) مولار محلول كلوريد الصوديوم والكلوتينين بـ (1%) حامض الخليك وفق ما ذكره Ayob وزملاؤه (2) وقدر البروتين بطريقة بايوريت (5) واجريت عملية حقن لاثنين من الارانب من النوع النيوزليندي بكلايدين الحنطة وبتركيز اولي (1.5 ملغم / مل) ونهائي (7.5 ملغم / مل) خلال مدة الحقن اليومية التي استمرت ثلاثة اسابيع تخللتها ثلاثة ايام استراحة في كل اسبوع وكانت الزيادة اليومية في التركيز بمقدار (0.5 ملغم) ماعدا الحقنة الاخيرة التي كانت الزيادة فيها بمقدار (1 ملغم) حيث وصل التركيز في نهاية الاسبوع الاول الى (3 ملغم / مل) وفي نهاية الاسبوع الثاني كان (5 ملغم / مل) ونهاية الاسبوع الثالث (7.5 ملغم / مل) وكان الانموذج يحقن بعد خلطه مع مستحلب الليسيثين والبرافين بنسبة (1 : 9) وبعد اسبوع من اخر حقنة سحب الدم من الوريد الاذني للارانب وفصل المصل كما ذكره Garvey وزملاؤه (5) واجري فحص الانتشار المناعي المزدوج كما ذكره Garvey (5) للكشف عن عيارية المصل المضاد وكذلك لتوضيح العلاقة المناعية بين كلايدين الحنطة والشعير والذرة والرز وللكشف عن نسب الكلايدين الداخلة في منتجات اللحوم الخام الممزوجة بطحين الحنطة. وقد تم استخلاص الكلايدين كما ذكره Ayob وزملاؤه (2) وخلط الطحين مع اللحم بنسب (1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5%). ثم اخذ (12 غم) من المزيج واضيف له (48 مل) ماء ثم اخذ (1.5 غم) من الخليط وذوب في (8.5 مل) من الكحول الاثيلي (70%) وبعد التحريك لمدة (30) دقيقة عزل الرائق وتم الكشف عنه باستخدام فحص الانتشار المناعي المزدوج والذي حضر فيه هلام الاكار باذابة 1% من الاكاروز في دارىء الفوسفات الملحي والذي يتركب اللتر منه من 8 غم كلوريد الصوديوم ، 0.20 غم كلوريد البوتاسيوم ، 0.20 غم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) و 1.44 غم فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين ($Na_2HPO_4.2H_2O$) ، وكان pH المحلول (7.2) وسخن الى حرارة (90 م) ثم برد الى حرارة (57 م) قبل صبه على شرائح زجاجية ثم ثقب الهلام بالمثقب المجهز من شركة LKB السويدية ووضع (10 مايكروليتر) من المصل او المحلول البروتيني في الحفر الخاصة بها ، بعدها تركت الشرائح الزجاجية في تجويف رطب (Humid Chamber) لمدة (24 ساعة) تكونت خلالها الخطوط الترسيبية البيضاء بعدها بللت ورقة ترشيح ووضعت على الشريحة ثم وضع فوقها خمس اوراق ترشيح جافة ووضع فوقها ثقل مقداره (1.5 كغم) ، استبدلت الاوراق باخرى جديدة عدا ورقة الترشيح الاولى واعيد الضغط حتى جفاف الهلام تماما عندها صبغت الشريحة بغمرها في محلول صبغة Comassei Brilliant Blue-R250 (0.05%) مذابة في محلول مكون من الايثانول – حامض الخليك – ماء (50 ، 5 ، 45) لمدة (15 دقيقة) بعدها غسلت الشريحة باستخدام محلول الغسل المكون من الايثانول وحامض الخليك والماء وبالنسب السابقة نفسها للتخلص من الصبغة غير المرتبطة بالبروتين .

النتائج والمناقشة

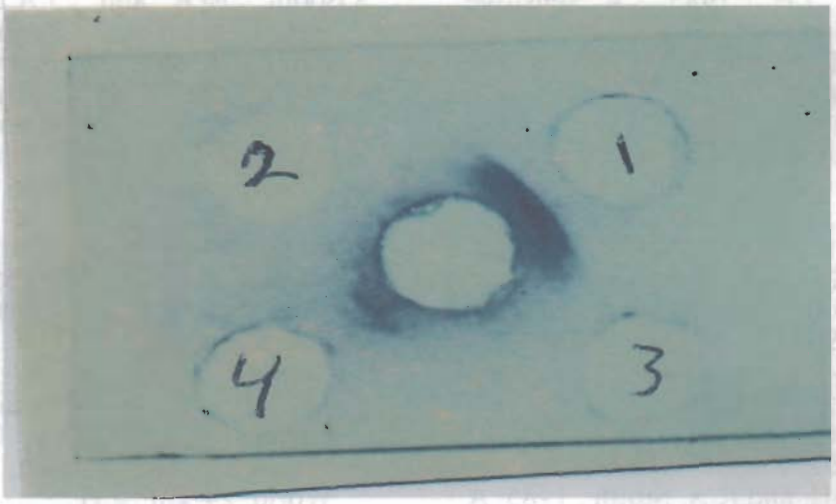
يوضح الشكل (1) نتائج اختبار الانتشار المناعي المزدوج لتقدير عيارية المصل المضاد لكلايدين الحنطة اذ يلاحظ ظهور فعالية للمصل حتى تخفيف (8/1) وهي فعالية متوسطة ولكن يمكن استخدامها في اجراء الفحوصات المناعية .



شكل 1. اختبار الانتشار المناعي المزدوج لتقدير عيارية المصل المضاد لكلايدين الحنطة

تمثل الحفرة المركزية المستخلص الكحولي للكلايدين وتمثل الحفر المحيطة المصل المضاد بعد تخفيفه تخفيفات متوالية

وتبين باستخدام الاختبار ذاته وجود علاقة مناعية بين كلايدين الحنطة وبرولامين الشعير (Hordein) مع المصل المضاد لكلايدين الحنطة والمتمثلة بظهور خطوط ترسيبية مع كلا النوعين وعدم ظهورها مع كل من برولامينات الذرة والرز (شكل 2) ، وهذا يؤكد اختلاف التركيب البنائي لبرولامينات الذرة والرز مقارنة بتركيب كلايدين الحنطة حيث تختلف البرولامينات في ضررها نتيجة الاختلافات في تتابع الاحماض الامينية وتركيبها وكذلك كمية هذه البرولامينات مقارنة بالحنطة. فمثلاً الشوفان اقل ضرراً من الحنطة لسببين هما ان كمية البرولامين فيه قليلة في الحبة وان البرولامين فيه يشبه قليلاً برولامين الحنطة ، بينما برولامين الذرة يعتبر غير ضار بالرغم من ان كميته تقارب كمية برولامين الحنطة ولكن تركيبهما يختلف كلياً (1 ، 14).



شكل 2. اختبار الانتشار المناعي المزدوج لتوضيح العلاقة المناعية لبرولامينات بعض انواع الحبوب باستخدام المصل المضاد لكلايدين الحنطة

1- برولامين الحنطة (Gliadin) 2- برولامين الذرة (Zein)
3- برولامين الرز (Oryzenin) 4- برولامين الشعير (Hordein)

وعند خلط نسب مختلفة من طحين الحنطة مع اللحم غير المطبوخ بنسب (1 ، 2 ، 3 ، 4 و 5%) وبعد استخلاص الكلايدين واستخدام فحص الانتشار المناعي المزدوج امكن الكشف حتى عن نسبة (1%) من الطحين (شكل 3) وهذا يؤكد حساسية طريقة الانتشار المناعي في الكشف عن مثل هذه التراكيز المنخفضة من المستضد.

شكل 3. اختبار الانتشار المناعي المزدوج للكشف عن وجود كلايدين الحنطة في نماذج اللحم التي خلطت معها بنسب (1 ، 2 ، 3 ، 4 و 5%) من طحين الحنطة والحفرة أ- مستخلص لحم خام

المصادر

1.Ayob , M.K. 1988. Development of enzyme – Linked Immunosorbent assays (ELISAs) for the detection of food additives , adulterants and contaminants . Ph. D. Thesis . University of Salford. Faculty of Research , North East Institute , Deeside , Clwyd.

2.Ayob , M.K. ; J. Rittenburg , J.C. Allen , and C.J. Smith , 1988. Development of a rapid – Linked Immunosorbent assay (ELISA) for gliadin determination in food . Food Hydrocolloids 2 (1) : 39-49.

3.Booth , M.R and , J.A.D. Ewart 1970. Relationship between wheat proteins. J. Sci. Food Agric. 21 , April, 187-192.

4.Chirdo , F.G. ; M.C. Anon , and C.A. Fossati , 1988. Development of high – sensetive enzyme immunoassays for gliadin quantification using the streptavidin – Biotin amplification system . Food and Agricultural Immunology 10 : 143-155.

5.Garvy , J.S. ; N.E. Gremer , and D.H. Sussdorf , 1977. Methods in Immunology , 3rd ed., W., A., Bojamin , INC , Donmills. No. Canada .

6.Hartsook , E.I. 1984. Celiac sprue : sensetivity to gliadin. Cereal Food World 29 (2) : 157.

7.Lasztity , R. 1984. The Chemistry of Cereal Proteins . CRC. Press , INC . Boca Raton Florida . P15 .

8.Nordlee , J.A. and S.A. Taylor , 1995. Immunological Analysis of Food allergens and other food proteins . Food Technology 129.

9 Rumbo , M. ; F.G. Chirdo , M.C. Anon , M.C. and C.A. Fossati , 1997. Immunoblotting of gliadin seperated by PAGE : analysis of electrotransferece condition. Food and Agricultural Immunology , 9 : 135-139.

10.Rumbo , M. ; F.G. Chirdo , A.C. Fossati , and M.C. Anon , 1990. Influence of thermal treatment of food on the iummunochemical quantification of gliadin. Food and Agricultural Immunology 8 : 195-203.

11.Skerritt , J.H. 1985. A sensitive monoclonal-antibody-based test for gluten detection : Quantitative Immunoassay . J. Sci. Food Agric. 36:987-994.

12.Skerritt , J.H , J.M. Devery , and A.S.Hill , 1990. Gluten intolerance : chemistry , celiac – toxicity , and detection of prolamins in food Cereal Food World 35 (7) : 638-644.

13.Skerritt , J.H. ; J.A. Diment , and C.W. Wrigley , 1985. A sensetive monoclonal antibody – based test for gluten detection : choice of primary and secondary antibody. J. Sci. Food Agric. 36 : 995-1003.

14 Skerritt , J.H. and R.A. Smith , 1985. A sensitive monoclonal-antibody – based test for gluten detection : studies with cooked or processed food. J. Sci. Food Agric. 36 : 980-986.