



UPPSALA
UNIVERSITET

Examensarbete 10p C-nivå, Vt 07
Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi
Biomedicinska analytikerprogrammet

Characterization of antibodies against mustard and development of immunological methods for the detection and quantification of mustard in foods

Johanna Almgren



Sinapis alba – gul senap

Ingrid Malmheden Yman, Birgitta Kruse
FoU-avdelningen, Kemiska enheten 2
Livsmedelsverket, Uppsala

ABSTRACT

Allergy to mustard has been reported for many years, in some cases as severe anaphylactic reactions. Recent studies imply that this allergy is increasing. Three major allergens have been isolated and characterised; Sin a 1 and Sin a 2 in yellow mustard (*Sinapis alba*), and Bra j 1 in oriental mustard (*Brassica juncea*). Yellow mustard and black mustard (*Brassica nigra*) are the most common species in Europe, whereas oriental mustard is more frequent outside Europe. Mustard plants belong to the *Brassicaceae/Cruciferae* family. Mustard is present as an ingredient in different foods, sauces and spices, often in small amounts. According to the European labelling directives, mustard and products thereof must always be declared. To monitor this regulation, methods need to be developed to detect mustard. Polyclonal antibodies, produced in rabbits, against yellow and black mustard were characterised with immunodiffusion, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions, and immunoblotting. Rocket-immunoelectrophoresis and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were developed for the detection and quantification of mustard protein. With indirect competitive ELISA a concentration of 156ng mustard protein per ml food extract was detected, which is more than enough to cover the lowest reported reactive doses.

Keywords: Mustard allergen; rocket-immunoelectrophoresis; ELISA; immunoblotting; immunodiffusion.

INTRODUKTION

Livsmedelsallergi blir allt vanligare. Ungefär 6 % av alla barn och 3-4 % av alla vuxna är i dagsläget drabbade av någon form av livsmedelsallergi. De livsmedel som oftast orsakar livsmedelsallergi är ägg, mjölk, fisk, skaldjur, nötter, fröer, spannmål och baljväxter (1). Med ändrad konsumtion av olika livsmedel kommer också allergimönstret att ändras (2).

Allergi mot livsmedel får inte blandas ihop med intolerans mot livsmedel. Involveringen av immunsystemet skiljer allergi från känslighet. Allergier är onormala immunologiska reaktioner mot ett livsmedel eller en komponent hos ett livsmedel. Allergiska reaktioner mot livsmedel är oftast en så kallad typ 1 reaktion, som orsakas av IgE, basofiler och mastceller. Vid typ 1 reaktionen bildas mycket IgE-antikroppar mot allergenet, dessa har hög affinitet till de Fc-receptorer som finns på ytan hos basofiler och mastceller. Då allergenet kommer in i kroppen korsbinder det IgE-molekyler som sitter på Fc-receptorerna, vilket ger en utsöndring av histamin, bradykinin, leukotriener och cytokiner från cellerna. Det är dessa ämnen som ger upphov till allergiska symtom.

De symtom som kan ses vid livsmedelsallergi är gastrointestinala symtom som kräkningar, diarré och magsmärta, respiratoriska manifestationer som rinit och astma, samt manifestationer i huden som nässelutslag, ödem, rodnad och eksem. I mer sällsynta, allvarliga fall, kan individen drabbas av en anafylaktisk chock, som är ett akut och livshotande tillstånd (2). Reaktionen kan vara mycket häftig redan inom någon minut och yttrar sig som svår klåda, illamående, andningssvårigheter, blodtrycksfall och cirkulationsrubbingar.

Allergiska reaktioner mot senap har rapporterats i många år. I flera av fallen har det rört sig om allvarliga anafylaktiska reaktioner. Det första fallet av allergisk reaktion mot senap beskrevs 1980. Det var en individ som hade ätit pizza innehållande senap, och då utvecklade en anafylaktisk chock (3). Efter den första rapporten har ett flertal rapporter inkommit från Frankrike och Spanien, och några fall har även rapporterats från Sverige, Finland och Italien. Totalt har mer än 20 artiklar publicerats om allergiska reaktioner mot senap (4).

Anafylaktiska reaktioner förekommer vid allergi mot senap men är inte det vanligaste symptomet. Hos vuxna är de vanligaste symptomen oftast klåda, svullnad eller brännande känsla i läppar, mun och/eller hals. Dessa symtom avtar oftast mycket snabbt och andra symtom tar vid, exempelvis gastrointestinala symtom (5). Hos barn är eksem och svullnad de allra vanligaste symptomen vid allergi mot senap, men även astma förekommer (6).

Användningen av senapsfrö som krydda har sitt ursprung redan under den antika medelhavskulturen, men till en början användes senapsfrö som medicinalväxt.

Senapsplantan kan bli 60-240cm hög och har gula kronblad vid blomning. Senapsfröerna sitter samlade i en tvårummig skida och innehåller ungefär 35g kolhydrater, 29g fett, 25g protein och 7g vatten per 100g. Fröerna är rika på kalcium, zink, järn, magnesium, niacin (vitamin B3) och fosfor.

De flesta senapsprodukter i Europa består av *Sinapis alba*; gul senap och *Brassica nigra*; svart senap, även kallad brun senap. I länder utanför Europa är orientalisk senap (*Brassica juncea*) mer vanligt förekommande (7).

Senap tillhör familjen *Brassicaceae/Cruciferae*, som även kallas korsblommiga växter. Familjen *Brassicaceae* har omkring 400 släkten och 3000 arter. Exempel på andra växter som tillhör familjen *Brassicaceae* är raps (*Brassica napus*), pepparrot (*Armoracia rusticana*), kålrot (*Brassica oleracea ssp.rapifera*), rädisa (*Raphanus sativus*) och kryddkrasse (*Lepidium sativum*).

Senap används ofta som smaksättare i kryddblandningar, såser, soppor, dressingar, ketchup, korv och majonnäs (4).

Frankrike är det land i Europa som både producerar och konsumerar mest senap. Allergi mot senap är därför vanligt förekommande, och blir enligt uppgift allt vanligare (8). Hos barn i Frankrike är senap det fjärde vanligaste allergenet efter ägg, jordnöt och komjölk (9).

Livsmedelsallergener från växtriket klassificeras in i familjer och superfamiljer efter struktur och funktion. De största grupperna av växtproteiner som innehåller allergener är cupin- och prolaminsuperfamiljerna, och proteinfamiljerna som står för växternas försvar mot patogener och negativa miljöfaktorer (10).

Hos gul senap (*Sinapis alba*) har man sedan länge isolerat och karakteriserat ett allergen, Sin a 1 (11). Nyligen beskrevs ytterligare ett allergen, ett 11S globulin, Sin a 2 (12). Från orientalisk senap (*Brassica juncea*) har ett allergen isolerats och karakteriserats, Bra j 1 (7). Svart senap (*Brassica nigra*) är en mycket nära släkting till orientalisk senap. Samma allergen antas därför finnas i *Brassica nigra* och också vara mycket snarlikt det hos orientalisk senap. Sin a 1 och Bra j 1 är proteiner som tillhör prolaminsuperfamiljen och familjen 2S albuminer. 2S albuminerna är lagringsproteiner och vanligt förekommande i många fröer och nötter. Lagringsproteinerna är motståndskraftiga mot både höga temperaturer och enzymatisk degradering. Därför är de också mycket allergena (4). Typiska 2S albuminer är små proteiner. Sin a 1 och Bra j 1 har totala molekylmassor på 14kD respektive 16kD (13,14). De består av två polypeptidkedjor med en molekylmassa på cirka 9-10kD respektive 4-5kD, som hålls samman av fyra disulfidbindningar (10).

Man har funnit att senapsallergenerna är mycket nära besläktade med varandra (7). De är även nära släkt med en rad andra allergener som Bra n 1 (allergen hos raps, *Brassica napus*), Bra o 3 (allergen hos kålrot, *Brassica oleracea*) samt Bra r 1 och Bra r 2 (allergener hos rybs, *Brassica rapa*). Alla dessa allergener tillhör ordningen Brassicales (15).

Korsreaktivitet mellan arter inom växtfamiljen *Brassicaceae* är ovanligt men har rapporterats i några studier (6). 1987 beskrevs en anafylaktisk chock hos en individ

som ätit kålrot. Tester som utfördes visade att patienten reagerade mot både senap och kålrot (16). I en studie från 2000 noterades en sensibilisering mot rädisa vid analys av serum från en senapsallergiker. Kliniskt förelåg dock ingen reaktion (6).

I ett flertal studier har man även sett indikationer på korsreaktivitet mellan senap och rapsfrö (17-20). Det isolerade och karakteriserade allergenet hos rapsfrö, Bra n 1, är väldigt likt Sin a 1 hos gul senap. Aminosyrasekvenserna stämmer överens till 94 % (4).

I en spansk studie från 2005 visade det sig att samtliga testade patienter med allergi mot senap var sensibiliserade mot andra arter inom växtfamiljen *Brassicaceae*. Det fanns även en stark association med nötter, 97,4 %, baljväxter 97,4 %, och majs, 78,9 % (5).

Ett samband mellan senapsallergi och pollenallergi har visats. I en studie från 1994 associerade man sensibilisering mot senap med sensibilisering mot *Compositae*-pollen hos barn (20).

Efter ett förslag från European food safety authority (EFSA) ändrades märkningsdirektivet, vilket innebär att senap måste deklarerars i innehållsförteckningen (21). På grund av detta behöver en metod utvecklas för att kunna detektera odeklarerad förekomst eller kontamination av senap i olika livsmedelsprodukter. Syftet med den här studien var att karakterisera polyklonala antikroppar framtagna i kanin, mot gul och svart senap. Antikropparna användes sedan för utveckling av en immunologisk metod för detektion och kvantifiering av senapsprotein.

MATERIAL OCH METODER

Framtagning av renat senapsprotein

Innan studien påbörjades renades senapsprotein fram enligt Klein et al med modifikation (22). Senapsfrö från *Sinapis alba* (Santa Maria AB) och *Brassica nigra* (Santa Maria AB) maldes och vägdes upp, 50mg, och fett extraherades med aceton. Därefter extraherades proteinet med Trisglycinbuffert (0,1M Tris, 0,50M glycin, pH 8,7) och 75g ammoniumsulfat tillsattes för utfällning av protein. Det utfällda proteinet dialyserades mot destillerat H₂O och frystorkades sedan för förvaring. De renade frystorkade proteinerna vägdes in och spädades med Trisglycinbuffert (1,0M Tris, 0,50M glycin, pH 8,7) till en koncentration av 1mg/ml, och användes sedan som standardlösningar vid analyserna.

Proteinhaltsbestämning

Innan studien påbörjades utfördes en proteinhaltsbestämning för de båda senapssorterna. Frystorkat senapsprotein, 25mg, löstes i 25ml Trisglycinbuffert (0,1M Tris, 0,50M glycin, pH 8,7) och behandlades med ultraljud i vattenbad (Sonorex super RK.510H, Bandelin electronics) i 2tim vid 45°C. Därefter tillsattes

100µl 10 % natriumazid och Trisglycinbuffert upp till 50ml. Proteinhaltsbestämning utfördes enligt BioRad Protein Assay kit (BioRad Laboratories). En standardkurva gjordes med bovint serumalbumin (BioRad Protein Assay standard II, BioRad Laboratories). 100µl av standarderna och 1mg/ml senapsprotein tillsattes till respektive provrör och 5ml färglösning (Dye reagent Concentrate, BioRad Laboratories) tillsattes. Efter 20min skedde avläsning i spektrofotometer (UNICAM UV/Vis Spectrometer UV2) vid 595nm.

Immuniserade kaniner

Två kaniner immuniserades på uppdrag av Livsmedelsverket av AgriSera, Vännäs, för att få polyklonala antikroppar riktade mot renat protein från *Sinapis alba* (SIN) respektive renat protein från *Brassica nigra* (BRA). Immuniseringen skedde i fyra steg och serum togs från kaninerna vid flera tillfällen (Tabell 1).

Tabell1. Immuniseringsprotokoll för framtagning av polyklonala antikroppar i kanin. En kanin immuniserades med renat protein från *Sinapis alba* (SIN) och en andra kanin immuniserades med renat protein från *Brassica nigra* (BRA).

Vecka	Immunisering	Mängd	Tappning (0-4)
0			Pre-serum (0)
1	I	200µg+FCA ¹⁾ /kanin	
5	II	100µg+FIA ²⁾ /kanin	
9	III	100µg+FIA/kanin	
11			
11			III + 2v (1)
13	IV	100µg+FIA/kanin	
15			IV + 2v (2)
17			IV + 4v (3)
19			IV + 6v (4)

1) FCA = 'Freund's complete adjuvant', 2) FIA = 'Freund's incomplete adjuvant'

Extraktion av protein från senapsfrö

2g frö från *Sinapis alba* respektive *Brassica nigra* vägdes upp i graderade glasprovrör, 10ml. Trisglycinbuffert (0,1M Tris, 0,50M glycin, pH 8,7) tillsattes till 8ml och därefter behandlades proverna med ultraljud i vattenbad (Sonorex super RK.510H, Bandelin electronics) under 2tim vid 45°C, proverna vortexades emellanåt. Trisglycinbuffert fylldes därefter på till 10ml. Rören centrifugerades (Sorvall[®] Instruments RC5C, Du Pont Instruments) vid 20 000g och 5°C för att frångilja eventuellt fett från proverna. Supernatanten överfördes till ellersmanrör efter att först ha filterats genom bomull, för att undvika att fett skulle medfölja vätskan. Proverna förvarades i kyl till användning.

SDS-PAGE

Med SDS-PAGE separeras proteiner efter storlek. Separationen sker i närvaro av detergenten SDS, som tillsammans med proteiner bildar komplex. Alla komplex får samma laddning, vilket gör att proteinerna separeras endast med avseende på storlek. Efter separationen färgas proteinbanden och de erhållna bandens positioner på gelen jämförs med markörer med kända molekylmassor. På så sätt kan man göra en bedömning av proteinernas storlek.

Provberedning

Av extraherat senapsfrö, 2g till 10ml, gjordes sex tvåstegsspädningar, 200mg/ml, 100mg/ml, 50mg/ml, 25mg/ml, 12,5mg/ml och 6,25mg/ml. Av dessa användes de fyra spädningarna med lägst koncentration dvs. från 50mg/ml och neråt. Av det renade proteinet, 1mg/ml, gjordes fyra tvåstegsspädningar, 1000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml och 125µg/ml. Spädningarna gjordes i Trisglycinbuffert (0,1M Tris, 0,50M glycin, pH 8,7). Till 65µl av respektive prov tillsattes 25µl lithium dodecyl sulfate (LDS) buffert (NP0007, Invitrogen) och 10µl reducerande medel (NP0004, Invitrogen). Proverna värmdes därefter i vattenbad i 10min vid 70°C. 20µl av respektive prov och 10µl markör (SeaBlue® Pre-Stained Standard, Invitrogen) sattes till brunnarna på en 4-12 % Bis-Tris Gel (NP0321, Novex, Invitrogen).

Buffertberedning

Yttre kammarens buffert bereddades genom att späda 50ml NuPAGE MES SDS runningbuffer (NP0002, Invitrogen) i 950ml destillerat H₂O och inre kammarens buffert bereddades genom att tillsätta 500µl NuPAGE Antioxidant (NP0005, Invitrogen) till 200ml av yttre kammarens buffert.

Brunnarna sköljdes tre gånger med yttre kammarens buffert innan de fylldes. Därefter monterades gelen i elektroforesapparaten (XCell II™ Mini-Cell, NOVEX) enligt tillverkarens instruktion. Inre kammarbuffert fylldes på, och brunnarna laddades med prover och markör. Yttre kammarbuffert hällades i tråget och elektrofores påbörjades.

Elektrofores

Elektroforesen fortgick till dess att färgfronten nådde gelens kant, ungefär 1tim vid 140V och 80mA. Efter avslutad elektrofores färgades proteinbanden med Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen).

Immunoblotting

Vid immunoblotting separeras proteiner i ett prov först genom användning av gelektrofores. Proteinerna överförs sedan elektroforetiskt till ett nitrocellulosa-membran (NC-membran), varpå immunospecifik färgning sker med hjälp av antikroppar, enzym och substrat. Med hjälp av mönstret av proteinband kan en bedömning göras med avseende på antikroppens specificitet. Markörer med kända molekylmassor används för att uppskatta storleken på proteinbanden.

Elektrofores

SDS-PAGE utfördes enligt tidigare beskrivning med undantag av att provvolymen som sattes till brunnarna var 10 μ l istället för 20 μ l. Proteinbanden överfördes från SDS-PAGE geler till NC-membran (Hybond™-C-extra, Pharmacia) genom blotting i elektroforesapparat (XCell II™ Mini-Cell, NOVEX) och blottingbox (XCell II™ Blot Module, NOVEX). Transferbuffert bereddades genom att blanda 15ml NuPAGE Transfer buffer (NP0006, Invitrogen), 255ml destillerat H₂O, 30ml metanol och 300 μ l NuPAGE Antioxidant (NP0005, Invitrogen). NC-membran, filterpapper och blottingvampar blötlagades i transferbuffert och en blottingsandwich packades (Fig 1). Blottingboxen fylldes med transferbuffert och den yttre kammaren fylldes med destillerat H₂O. Elektrofores skedde därefter vid 25V och 190mA i ungefär 1tim.

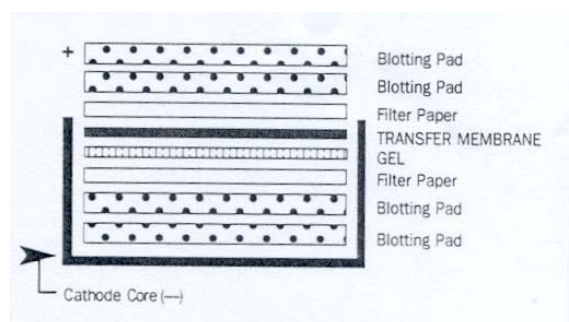


Fig 1. Packning av blottingsandwich. Gelen läggs i kontakt med membranet och dessa pressas tätt ihop med hjälp av blötlagda filterpapper och blottingvampar.

Proteinfärgning

Proteinfärgning med Ponceau S-lösning (P-7170, Sigma) utfördes under 5-10min. Syftet var att se om proteinöverföringen från gel till membran lyckats. Band framträdde efter två tvättar med destillerat H₂O (2x5min). NC-membranet avfärgades därefter i 0,9 % NaCl lösning (2x5min).

Immunospecifik färgning

Vid immunospecifik färgning blockerades NC-membranet först under natt med blockeringsbuffert, 50mg gelatin löst i 100ml PBST (Na₂HPO₄ x 2H₂O (7,2mM), NaH₂PO₄ x 2H₂O (2,8mM), NaCl (0,5M), Tween 20 (0,3 %), pH 7,0). Under 30min fick sedan 10 μ l antiserum mot BRA respektive antiserum mot SIN binda till proteinbanden tillsammans med 10ml PBST. Därefter tvättades antikroppsöverskottet bort med PBST (4x10min), varpå 10 μ l get anti-kaninantikroppar (R-1131, Sigma) tillsammans med 10ml PBST fick binda till primär antikropp. NC-membranet tvättades sedan med PBST (4x10min). PAP-komplex (peroxidase-kanin antiperoxidas, Dako) tillsattes tillsammans med 10ml PBST (30min). Därefter tvättades (4x10min) överskottet bort med substratbuffert (0,01M Trisbuffert, pH 7,6) och substrat fick sedan reagera under 5-10min.

Substratet, 25mg, (4-chloro-1-naphtol) hade omedelbart före reaktionen lösts i 5ml etanol, 45ml substratbuffert och 50 μ l H₂O₂. Till sist tvättades NC-membranet med substratbuffert (2x5min).

Immunodiffusion

Immunodiffusion är en kvalitativ metod där antigen och antikropp får diffundera passivt under 18-24tim i en 1 % agarosgel, gjuten på ett objektglas. Precipitat bildas då antikroppen möter sitt antigen, vilket ses som en vit linje.

Utförande

1g Agarose M (Amersham Biosciences) vägdes upp och löstes under värmning i 80ml Trisglycinbuffert (0,1M Tris, 0,50M glycin, pH 8,7). Efter att agarosen löst sig tillsattes ytterligare 100ml buffert.

3,5ml varm agaroslösning portionerades ut med pipett till objektglas. Gelen fick stelna och sedan ligga i en fukt-kammare i kylskåp. Hål stansades i gelen efter ca 30min (2,5-3mm i diameter) så att ett hål i mitten omgavs av sex perifera hål. 4,5 μ l prov tillsattes till de perifera hålen och 9 μ l antiserum mot SIN respektive antiserum mot BRA tillsattes till mitthålet. Passiv diffusion fick därefter fortgå under natt i en fukt-kammare i kylskåp.

Icke-precipiterade proteiner lakades ur gelen i 0,9 % NaCl i 60min, varpå gelerna pressades under ett fuktat filterpapper och pappershanddukar i 30min. Gelerna fick sedan ligga i destillerat H₂O i 60min, varefter de återigen pressades i 30min. Precipitationslinjerna färgades med 0,1 % amidosvart (Merck) i 10min efter att gelerna torkat. Överskottet av färg tvättades sedan bort med en lösning innehållande ättiksyra, metanol och destillerat H₂O i förhållandet 10:70:20.

Titer på antiserum för SIN och BRA

För att undersöka titeren på antiserumen för SIN och BRA användes immunodiffusion. Antiserumen fick reagera mot standardlösning av renat senapsprotein, 1mg/ml, i fem tvåstegsspädningar, från 1000 μ g/ml ner till 62,5 μ g/ml. Även pre-serum tappat före immuniseringen analyserades. Som positiv kontroll vid dessa analyser användes senapsfröextrakt, 2g/10ml, från de båda senapsorterna. Med immunodiffusion undersöktes även reaktionen mellan antiserumen och en spädningsserie av senapsfröextrakten. Fröextrakten späddes från 200mg/ml ner till 12,5mg/ml dvs. i fem tvåstegsspädningar.

Specificitet

Specificiteten hos de framtagna polyklonala antikropparna, testades med immunodiffusion mot hasselnöt, sesamfrö, solrosfrö, pekannöt, paranöt, kastanj, limabönor, rosépeppar, raps, kålrot, pepparrot och rädisa samt mjölk och ägg. Protein i proverna extraherades som tidigare beskrivet för senapsfröextrakt (2g prov till 10ml buffert). På grund av högt vätskeinhåll vägdes 5g provmaterial upp av rädisa, kålrot och kryddkrasse. För provmaterialen mjölk och ägg tillsattes lika delar mjölkpulver, äggula respektive äggvita, till lika delar Trisglycinbuffert (0,1M Tris,

0,50M glycin, pH 8,7). Mjölks- och äggproverna behandlades inte med ultraljud. Senapsfröextrakt från de båda senapssorterna, 2g/10ml och standardlösning av renat senapsprotein, 1mg/ml, användes som positiv kontroll.

Livsmedel

Livsmedelsproverna; senapssill, gravlaxsås, korv (bierwurst), gurkmix, majonnäs, salladsdressing, Italiensk salladskrydda, kycklingsoppa (mix), korvstroganoff (mix), och ett paket färdigmat innehållande oxjärpar, potatis och sås (oxjärparna och såsen analyserades för sig) extraherades på samma sätt som senapsfrö, men med den skillnaden att 5g extraherades med 5ml Trisglycinbuffert. Proverna behandlades inte heller med ultraljud. För vissa av proverna tillsattes större volym buffert på grund av att proverna sög upp mycket av vätskan. 10ml buffert tillsattes till korv (bierwurst), korvstroganoff (mix), oxjärpar och Italiensk salladskrydda. Livsmedelsproverna som innehöll kött och gurkmix homogeniserades med mixer före extraktionen.

Raketimmunoelektrofores

För att kvantifiera proteiner används ibland raketimmunoelektrofores. Vid raketimmunoelektrofores sker en elektrofores av antigenet i en antikroppshaltig gel, där antikropparna är nästintill orörliga i det elektriska fältet. Antikropparna i gelen är av samma typ som antigenet. När antigenet vandrar genom gelen och kommer i kontakt med antikropparna bildas komplex, dessa växer i storlek så länge antigenet är i överskott. Då ekvivalens uppnåtts kommer komplexet att falla ut i gelen, vilket resulterar i en raketliknande utfällning. Höjden av raketerna jämförs med kända standardkoncentrationer som sätts till gelen tillsammans med provet. Den okända koncentrationen antigenet i provet kan på så sätt bestämmas.

Gjutning av buffertstrips

Buffertstrips av 2,0 % w/v göts genom att smälta 0,6g Agarose IEF (Amersham Biosciences) i 30ml Trisglycinbuffert (0,25M Tris, 1,25M glycin, pH 8,7) (i kokande vattenbad). Lösningen fick svalna till 70°C ±1 och överfördes därefter till tomma buffertstripsformar (Phast Gel buffer strips, Amersham Biosciences).

Gjutning av geler

För gjutning av geler utan PEG (polyetylen glykol) vägdes 120mg Pronarose Agarose LE (Kemila-preparat) upp och 10ml Trisglycinbuffert (1,0M Tris, 0,50M glycin, pH 8,7) tillsattes. Blandningen löstes i kokande vattenbad och portionerades om 2,3ml i graderade glasprovrör. Vid 60°C ±1 tillsattes antiserum, och den varma lösningen överfördes till en plastfilm, 45x52mm, (GelBond™ film, 0,2mm, FMC Bioproducts) som värmts med värmelampa på glasskiva. Gelerna fick stelna vid rumstemperatur och fick sedan ligga i kyl i minst 30min innan stansning utfördes. Åtta brunnar (2mm i diameter) stansades ut och gelerna placerades i elektroforesapparaten (Phastsystem, Separation Control and Development Unit, Amersham Biosciences). För att det skulle vara tätt mellan gel och platta droppades Kerosen (Fluka) på kylplattan. 1,5µl av de båda senapsfröextrakten och

standardkoncentrationer (från 1mg/ml ned till 325µg/ml) av renat protein BRA respektive renat protein SIN tillsattes därefter till respektive brunn.

För gjutning av geler innehållande PEG vägdes 140mg Agarose M (Amersham Biosciences) och 250mg PEG 6000 upp, varpå 10ml Trisglycinbuffert (1,0M Tris, 0,50M glycin, pH 8,7) tillsattes. Gelerna göts som tidigare beskrivet.

Elektrofores och färgning

För att det skulle vara kontakt mellan gel och elektroder lades buffertstrips mellan dem. Elektrofores skedde vid 100V, 25mA, 7W och 15°C och avslutades då 100Avh uppnåts.

Icke-precipiterade antikroppar och andra proteiner lakades ur gelerna med 0,9 % NaCl i 30min. Efter urlakningen pressades gelerna under fuktat filterpapper, pappershanddukar och en tyngd i 10min. De lades sedan i destillerat H₂O i 30min och pressningen upprepades. Gelerna torkades sedan med hårtork och färgades därefter enligt följande program: Färgning 10min vid 50°C med brukslösning (En tablett PhastGel Blue R (Amersham Biosciences) löstes i 1000ml destillerat H₂O och 80ml metanol tillsattes). Efter färgning tvättades gelerna med en lösning av metanol, ättiksyra och destillerat H₂O (3:1:6) under 1min, följt av tvätt med 10 % ättiksyra vid samma temperatur, 2x5min. Efter avslutad färgning torkades gelerna med hårtork.

Optimering för senap

Geler göts med olika koncentrationer av de olika antiserumen från tappning 1 och tappning 2; 0,5µl, 1µl, 5µl, 10µl och 20µl till 2,3ml gel.

Eftersom Sin a 1 och Bra j 1 är små proteiner och därför eventuellt kunde ha svårigheter att binda till antikropparna gjordes ett försök med att tillsätta 5 % PEG till gelerna. PEG är ett medel som ökar affiniteten mellan antigen och antikropp.

Provlösningarna modifierades genom att 1 % ditiotreitoll (DTT) eller 7M Urea tillsattes. DTT är ett reducerande medel som reducerar –S-S-bindningar och därmed öppnar upp proteiner så att eventuellt gömda epitoper blir tillgängliga för antikropparna. Vid användning av urea ökas laddningen hos proteinet vilket ökar möjligheten för proteinet att vandra i gelen.

Antiserum från tappning 2 späddes 1600 gånger och 3200 gånger, och elektroforesen fick fortgå till 140Avh istället för ca 100Avh, för att proteinet skulle få mer tid på sig att vandra ut i gelen.

Enligt studerad litteratur ger Ca²⁺-joner skarpare precipitatlinjer. 2mM kalciumlaktat tillsattes därför till provernas spädningsbuffert. Geler göts därefter med 1000 gångers spädning av antiserum. För att testa effekten av tillsats av Ca²⁺-joner ökades koncentrationen kalciumlaktat till 4mM. Geler göts med 1000 gångers spädning av antiserum och 4mM kalciumlaktat tillsattes till provernas spädningsbuffert. Elektroforesen fick fortgå till 156Avh.

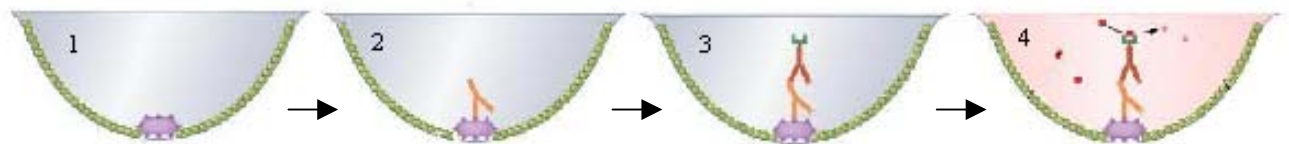
En större gel med måtten 125x130mm göts av 240mg agaros och 20ml buffert på samma sätt som tidigare beskrivet. Buffertstrips göts av 800mg agaros och 40ml buffert enligt tidigare beskrivning. Brunnar stansades ut och prov tillsattes som

tidigare beskrivet. Elektrofores skedde vid 200V, 75mA och 20W under 2tim. Gelen färgades därefter med Colloidal Blue staining kit (Invitrogen).

Indirekt kompetitiv ELISA

Vid användning av indirekt kompetitiv ELISA tillsätts antikroppar i underskott, vilket ger en konkurrens om dessa mellan antigen i provet och coatat antigen av samma sort. En okänd mängd antigen i ett prov kan bestämmas genom att reaktionen mellan antikroppar och coatat antigen inhiberas beroende av vilken koncentration antigen som finns i det okända provet. Om inget antigen finns i provet blir det ingen inhibering.

Den optimala koncentrationen av antiserum bestämdes med indirekt ELISA (Fig 2). 96-håls flatbottnade mikrotiterplattor (Maxisorb, Nunc) coatades med 10µg/ml renat protein SIN respektive 2µg/ml renat protein BRA i PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (7,2mM), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (2,8mM) NaCl (0,5M), pH 7,4). Blockering skedde med 200µl 1 % bovint serum albumin i PBS i fukt-kammare över natt i kylskåp. Därefter tvättades brunnarna tre gånger med PBS. 100µl antiserum spädd från 1:100 till 1:1000 000 sattes till brunnarna, och därefter inkuberades plattorna i 1tim vid rumstemperatur, varpå tvätt skedde tre gånger med PBST ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (7,2mM), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (2,8mM), NaCl (0,5M), Tween 20 (0,3 %), pH 7,4). 100µl get anti-kanin IgG - horse radish peroxidase (Dako, P0448) spädd 1:6000 tillsattes och inkubation skedde i 1tim vid rumstemperatur. Brunnarna tvättades därefter tre gånger med PBST varpå 100µl peroxidassubstrat tillsammans med tetramethylbenzidine (TMB+ substrat-Chromogen, S1599, Dako) fick reagera i 15-20min under aluminiumfolie. Substratet gav en blå färg vid närvaro av peroxidase. Reaktionen stoppades med 100µl 1M svavelsyra vilket gav ett gult färgomslag.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Fig 2. Indirekt ELISA. 1. Brunnar coatades med renat senapsprotein. 2. antiserum mot senapsprotein tillsattes. 3. Get anti-kaninantikropp märkt med horse radish peroxidase fick binda till bundna antikroppar. 4. Substrat tillsattes vilket gav en färgad produkt vid närvaro av peroxidase.

De coatade mikrotiterplattorna med 2µg/ml BRA användes även till en indirekt kompetitiv ELISA. Spädningar, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 och 1:3200 gjordes av standardlösning av renat protein BRA, 1mg/ml, och ett livsmedel (Italiensk salladskrydda), 5g/10ml. I separata rör blandades 125µl av spädningarna

med 125µl antiserum mot BRA med koncentrationen 1:500. Inkubation skedde under 1tim vid 37°C. 100µl av blandningarna (antiserum och spädningar) tillsattes därefter till respektive mikrotiterbrunnar och inkubation skedde i 1tim vid rumstemperatur. Utförandet fortsatte sedan enligt tidigare beskrivning för indirekt ELISA.

RESULTAT

Proteinhaltsbestämning

Resultat av proteinbestämning med BioRads protein assay visade att proteinhalten i det renade materialet från *Sinapis alba* var 52,7% av det frystorkade materialet. Proteinhalten i det renade materialet från *Brassica nigra* var detsamma, 52,8% av det frystorkade materialet.

SDS-PAGE

För att undersöka storleken på de proteiner som finns i senapsfrö, och renhet och storlek på de isolerade proteinerna, utfördes SDS-PAGE under reducerande betingelser. Proteinerna separerades på en 4-12 % Bis-Tris Gel (NuPAGE, Novex, NP0321, Invitrogen) och färgades med Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen). Tre dominerande band erhöles för det renade proteinet SIN med molekylmassorna 38kD, 28kD och 20kD. Samma dominerande band erhöles från fröextraktet från *Sinapis alba*. Dessutom erhöles ytterligare två band med molekylmassorna 62kD respektive 5kD (Fig 3A). För det renade proteinet BRA erhöles tre dominerande proteinband (38kD, 30kD och 20kD) med liknande molekylmassor som för det renade proteinet SIN. Ytterligare ett band erhöles med molekylmassan 43kD. Fyra dominerande band erhöles för fröextraktet från *Brassica nigra*; 62kD, 38kD, 30kD och 20kD (Fig 3B). Proteinbandet med molekylmassan 62kD uppträdde som ett dubbelband. För båda fröproteinerna sågs även svaga band med lägre och högre molekylmassor än de som tidigare räknats upp.

Skillnader kunde ses i proteinbandsmönster mellan senapsfröextrakt och renat protein. Hos *Sinapis alba* hade fröextraktet ett extra band med molekylmassan 62kD jämfört med det renade proteinet SIN. Hos *Brassica nigra* hade fröextraktet ett dubbelband vid 62kD medan det renade proteinet BRA hade ett tydligare band vid 43kD.

Vid jämförelse av proteinbandsmönster mellan de renade proteinerna kunde man se att BRA hade ett proteinband mer än SIN. Molekylmassan för detta proteinband var 43kD. Vid jämförelse av proteinbandsmönster mellan fröerna saknade *Brassica nigra* ett proteinband jämfört med *Sinapis alba*. Detta band hade molekylmassan 5kD.

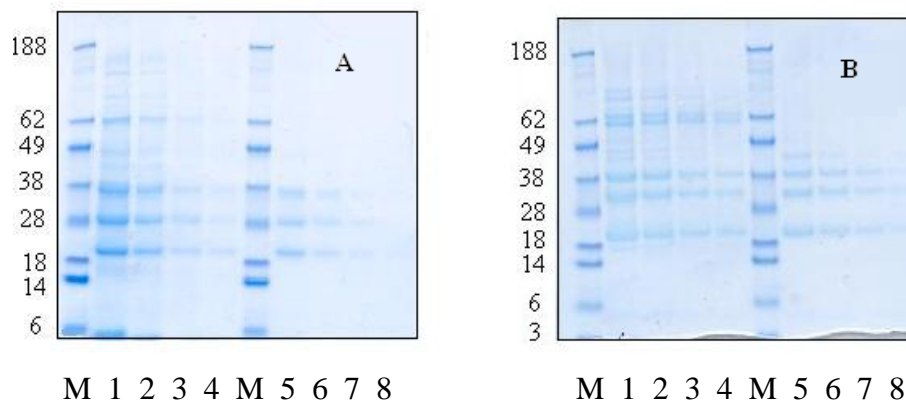


Fig 3. SDS-PAGE av extrakt från frö och renat protein från *Sinapis alba* (A) respektive *Brassica nigra* (B) under reducerande förhållanden på 4-12 % Bis-Tris Gel. Proteinerna färgades in med Coomassie färg. M är markör (SeeBlue, Invitrogen), lane 1, 50mg/ml, lane 2, 25mg/ml, lane 3, 12,5mg/ml, lane 4, 6,25mg/ml frö extraherat i Trisglycinbuffert. Lane 5, 1000µg/ml, lane 6, 500µg/ml, lane 7, 250µg/ml och lane 8, 125µg/ml renat protein i Trisglycinbuffert.

Immunoblotting

De polyklonala antikropparnas specificitet undersöktes med immunoblotting. För att se att överföringen av proteinband fungerat, färgades NC-membranen med Ponceau S-lösning (P-7170, Sigma). För både SIN och BRA kunde ett flertal proteinband ses på NC-membranet, vilket visade att överföringen fungerat. Förutom de band som tidigare dominerat vid SDS-PAGE sågs fler dominerande band hos de båda senapssorterna vid Ponceaufärgningen (Fig 4A och Fig 5A).

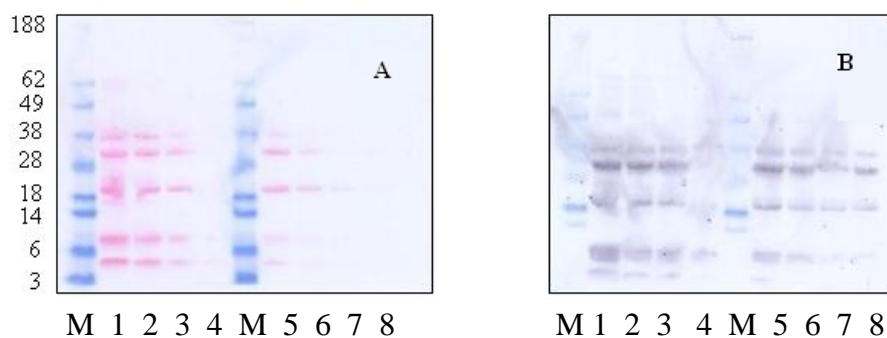


Fig 4. Figur A visar proteinfärgning för SIN med Ponceau S-lösning. Figur B visar immunospecifik färgning med antikroppar mot SIN. Lane 1, 50mg/ml, lane 2, 25mg/ml, lane 3, 12,5mg/ml, lane 4, 6,25mg/ml frö extraherat i Trisglycinbuffert. Lane 5, 1000µg/ml, lane 6, 500µg/ml, lane 7, 250µg/ml och lane 8, 125µg/ml renat protein SIN i Trisglycinbuffert.

Efter proteinfärgning med Ponceau S-lösning avfärgades NC-membranen och immunospecifik färgning utfördes med antiserum mot SIN, respektive antiserum mot BRA.

Med antiserum mot SIN detekterades fem band som dominerade med molekylmassorna 38kD, 30kD, 20kD, 9kD och 5kD. Dessa band kunde ses hos både fröextraktet och det renade proteinet. Den lägsta koncentration som detekterades hos fröextraktet var 6,25mg senapsfrö/ml. Det renade proteinet detekterades ned till en koncentration av 125µg/ml.

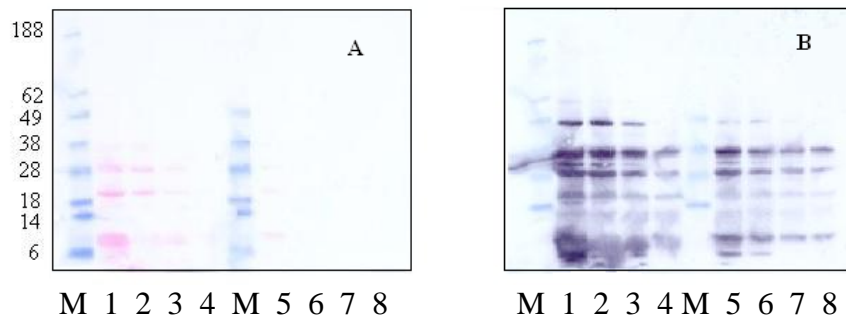


Fig 5. Figur A visar proteinfärgning för BRA med Ponceau S-lösning. Figur B visar immunospecifik färgning med antiserum mot BRA. Lane 1, 50mg/ml, lane 2, 25mg/ml, lane 3, 12,5mg/ml, lane 4, 6,25mg/ml frö extraherat i Trisglycinbuffert. Lane 5, 1000µg/ml, lane 6, 500µg/ml, lane 7, 250µg/ml och lane 8, 125µg/ml renat protein BRA i Trisglycinbuffert.

Fem band dominerade med molekylmassorna 38kD, 28kD, 20kD, 9kD och 5kD för antiserum mot BRA. Dessa band kunde ses både hos fröextraktet och hos det renade proteinet. I senapsfröextraktet fanns ytterligare ett proteinband med molekylmassan 49kD. Den lägsta koncentration av frö som kunde ses var 6,25mg/ml och den lägsta koncentrationen renat protein var 125µg/ml.

Immunodiffusion

Titer på antiserum för SIN och BRA

För att undersöka titeren på antiserumen mot SIN respektive BRA användes immunodiffusion. Fyra tappningar av antiserum undersöktes, samt pre-serum. Pre-serum analyserades för att se om kaninerna hade antikroppar riktade mot senap redan före immuniseringen. Som positiv kontroll användes 2g/10ml senapsfröextrakt. Spädningar av 1mg/ml renat senapsprotein ner till 62,5µg/ml fick reagera mot de olika tappningarna av antiserum och pre-serum. Det blev ingen positiv reaktion för pre-serumet. Det var ingen tydlig skillnad i styrka mellan de olika tappningarna, vid reaktion mot renat senapsprotein. Ju lägre proteinkoncentration desto svagare blev precipitaten. Precipitat kunde ses ned till den lägsta testade koncentrationen,

62,5µg/ml. Även en spädningsserie av fröextrakt, 2g/10ml, testades mot antiserum mot SIN respektive antiserum mot BRA. Precipitat kunde ses ned till den lägsta koncentrationen, 12,5mg/ml. Precipitaten för fröextrakt vid de lägre koncentrationerna var starkare än för renat senapsprotein.

Specificitet

Vid kontroll av specificitet hos antiserum mot SIN och antiserum mot BRA användes immunodiffusion. De fröer och nötter som testades för specificitet valdes ut på grund av att de antingen var släkt med senap eller hade visat korsreaktivitet i tidigare studier på andra laboratorier. Övriga provmaterial testades för att de är vanliga allergener.

Antiserum mot SIN reagerade mot proteinet BRA, och antiserum mot BRA reagerade mot proteinet SIN. Specificiteten var densamma för de båda antisera.

Bland 16 testade provmaterial, däribland några grönsaker ur familjen *Brassicaceae*, erhöles endast positiv reaktion för raps. Antikroppar mot *Brassica juncea* uppgavs i en studie reagera med mjölk och äggula. Detta sågs inte med antikroppar mot SIN eller antikroppar mot BRA, inte heller gav äggvita någon reaktion (Tabell 2).

Tabell 2. Specificitet hos antiserum mot SIN och antiserum mot BRA testat med immunodiffusion. Extrakt gjordes av 2g eller 5g provmaterial till 10ml buffert. För mjölk och ägg blandades lika delar provmaterial med lika delar buffert. Det var ingen skillnad i resultat mellan de båda antikropparna.

Material	Reaktivitet (+/-)	Material	Reaktivitet (+/-)
Sesamfrö	-	Kryddkrasse	-
Solrosfrö	-	Rädisa	-
Paranöt	-	Kålrot	-
Pekannöt	-	Rosépeppar	-
Kastanj	-	Äggula	-
Hasselnöt	-	Äggvita	-
Limabönor	-	Mjök	-
Raps	+	Senapsfrö	+
Pepparrot	-	Senapsprotein	+

Livsmedel

För att undersöka om detektion var möjlig i olika matraser användes immunodiffusion. Elva livsmedel innehållande senap enligt ingrediensförteckningen inhandlades. De livsmedel som undersöktes var senapssill, gravlaxsås, korv (bierwurst), gurkmix, majonnäs, salladsdressing, Italiensk salladskrydda, kycklingsoppa (mix), korvstroganoff (mix) och ett paket färdigmat bestående av oxjårpar, potatis och sås. Oxjårparna och såsen analyserades var för sig. Proverna analyserades i duplikat och fick reagera mot antiserum mot SIN respektive antiserum

mot BRA. Resultatet av analysen blev detsamma oberoende av vilken av de båda antikropparna som användes. Det var heller ingen skillnad i resultat mellan duplikaten. Positiv reaktion erhöles med senapssill, gravlaxsås, Italiensk salladskrydda, korv (bierwurst) och kycklingsoppa (mix). I sex av proverna kunde senap inte påvisas. Som positiv kontroll användes senapsfröextrakt, 2g/10ml, och 1mg/ml renat senapsprotein (Tabell 3).

Tabell 3. Analys av senap i olika livsmedel med immunodiffusion. Både antikroppar mot SIN och BRA användes. Senapsfröextrakt, 2g/10ml, och renat senapsprotein, 1mg/ml, användes som positiv kontroll. Det var ingen skillnad i resultat mellan de båda antikropparna och inte heller mellan duplikaten.

Material	Reaktivitet (+/-)	Material	Reaktivitet (+/-)
Senapssill	+	Korv (bierwurst)	+
Gravlaxsås	+	Gurkmix	-
Oxjärke (färdigmat)	-	Kycklingsoppa (mix)	+
Sås (färdigmat)	-	Korvstroganoff (mix)	-
Salladskrydda (It)	+	Senapsfrö	+
Majonnäs	-	Senapsprotein	+
Salladsdressing	-		

Raketimmunoelktrofores

Resultatet tenderade att bli något bättre för geler med lägre koncentration av antiserum, och vid användning av antiserum från tappning 2 jämfört med antiserum från tappning 1. Resultatet blev bättre vid användning av antiserum BRA jämfört med användning av antiserum SIN (Fig 6).

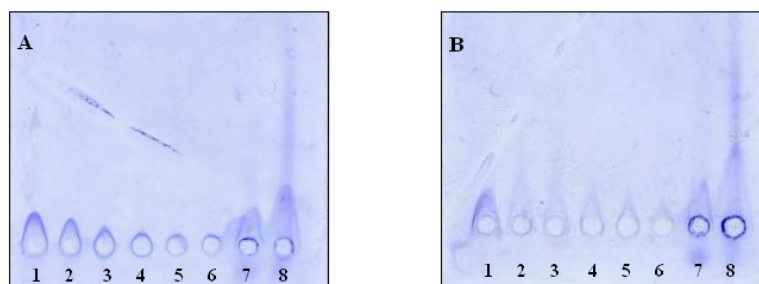


Fig 6. Raketimmunoelktrofores för antiserumen mot SIN och BRA från tappning 2. 5µl av respektive antiserum sattes till 2,3ml gel. Brunnarna 1-6 är standardlösning av renat protein, 1mg/ml, i tvåstegsspädningar. Brunn 7 är 1mg/ml senapsfröextrakt, *Sinapis alba*. Brunn 8 är 1mg/ml senapsfröextrakt, *Brassica nigra*. Topparna för BRA (A) blev mer utsträckta och kantlinjerna var tydligare än för SIN (B). Hos BRA kunde man även se skillnad i höjd mellan topparna hos standarden

Vid modifiering av proverna som sattes till gelerna, med 1 % DTT eller 7M Urea, sågs ingen effekt. Vid tillsatts av PEG till gelerna sågs inte heller någon förbättring av resultatet, det blev istället en utfällning i gelen som gav en stark bakgrundsfärgning.

Topparna sträckte sig längre än tidigare vid 1600 gångers spädning av antiserumen, men de blev mycket svaga och kunde knappt ses med blotta ögat. Vid 3200 gångers spädning av antiserumen kunde inga toppar ses. Elektroforesen fick i båda fallen fortgå till 140Avh.

Topparna syntes något bättre vid 1000 gångers spädning av antiserum och vid samtidig användning av 2mM kalciumlaktat. Resultatet blev bättre för antiserum BRA jämfört med antiserum SIN, då topparnas kantlinjer blev skarpare. Vid 1000 gångers spädning av antiserum, tillsats av 4mM kalciumlaktat, och samtidig förlängd elektrofores till 156Avh, fick topparna starkare kantlinjer men sträckte inte ut sig tillräckligt långt (Fig 7).

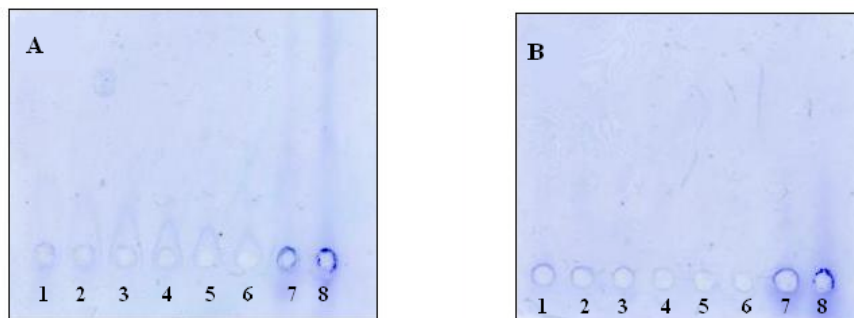


Fig 7. Raketimmunoelktrofores med 1000 gångers spädning av antiserum och tillsats av 4mM kalciumlaktat till provernas spädningsbuffert. Elektroforesen fick fortgå till 156Avh. Figur A visar resultat för antiserum mot BRA och figur B visar resultat för antiserum mot SIN.

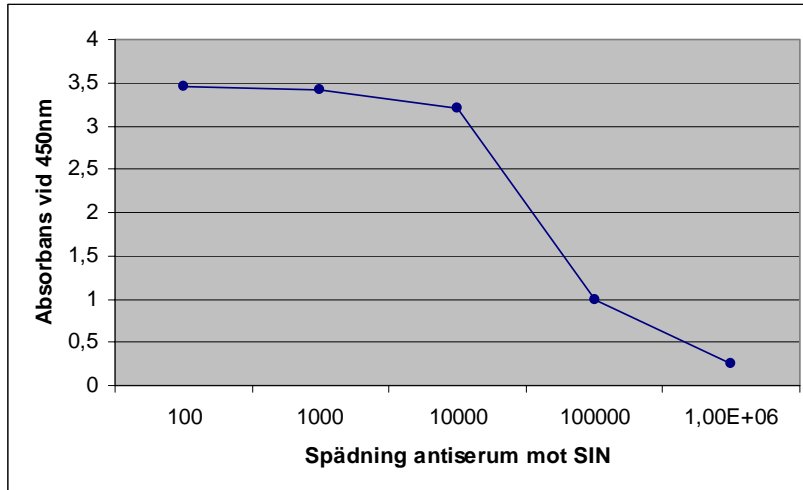
Resultatet förbättrades inte vid användning av en större gel jämfört med tidigare försök. Flera av topparna gick åt fel håll och inga tydliga toppar kunde urskiljas från den ganska kraftiga bakgrundsfärgningen.

Indirekt kompetitiv ELISA

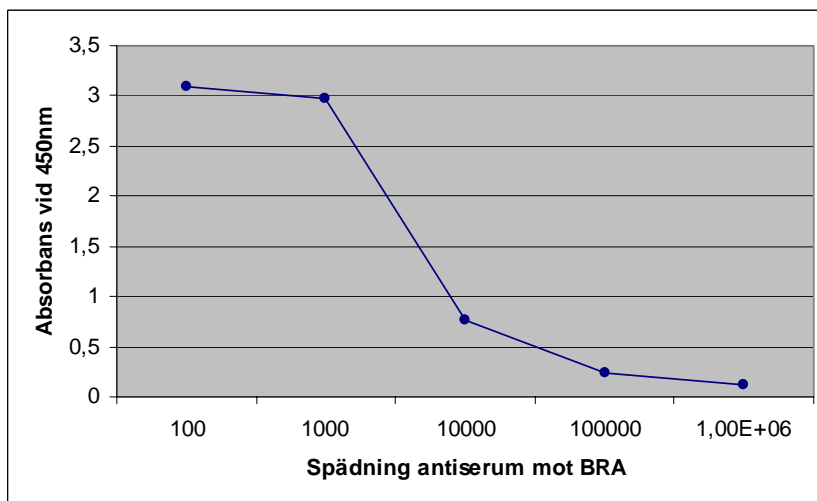
Kaninen som immuniserades med renat protein SIN svarade bra på immuniseringen. Olika spädningar av antisera i en mikrotiterplatta coatad med 10µg/ml renat protein SIN testades med indirekt ELISA. Spädningar på 1:100, 1:1000 och 1:10 000 visade optimal respons (Fig 8). Vid lägre koncentration av antiserum minskade responsen. Den optimala koncentrationen av antiserum mot SIN bestämdes till 1:10 000.

Immuniseringen av den andra kaninen med renat protein BRA gav en liknande responskurva (Fig 9). De spädningar som gav bäst respons var 1:100 och 1:1000.

Mikrotiterplattan var i detta fall coatad med BRA, 2 μ g/ml. Alltså 5 gånger mindre material jämfört med SIN. Den optimala koncentrationen antiserum mot BRA bestämdes till 1:1000.



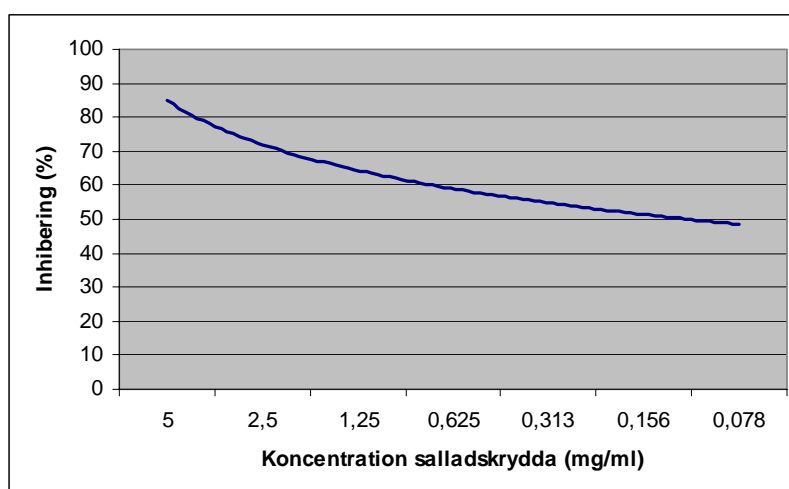
Figur 8. Indirekt ELISA för renat protein SIN. Mikrotiterplattor coatade med 10 μ g/ml SIN, och antiserum mot SIN i tiostegsspädningar från 1:100 till 1:1000 000 användes. Den optimala koncentrationen bestämdes till 1:10000.



Figur 9. Indirekt ELISA för renat protein BRA. Mikrotiterplattor coatade med 2 μ g/ml BRA, och antiserum mot BRA i tiostegsspädningar från 1:100 till 1:1000 000 användes. Den optimala koncentrationen bestämdes till 1:1000.

De coatade mikrotiterplattorna med 2µg/ml BRA användes till en indirekt kompetitiv ELISA med det reade proteinet. Inhibering erhöles med koncentrationer från 10µg/ml reat protein ner till den lägsta testade koncentrationen 156ng/ml. Koncentrationen 10µg/ml gav en inhibition på 85 %. Medan så små mängder som 156ng/ml inhiberade reaktionen mellan coatat antigen och specifik antikropp med 70 %.

För inhibitionsstudier med ett livsmedel valdes Italiensk salladskrydda. De testade koncentrationerna från 5mg/ml ner till 78µg/ml inhiberade reaktionen mellan antigen och specifik antikropp (Fig 10). Salladskrydda i en koncentration av 78µg/ml gav en inhibition på 50 %.



Figur 10. Indirekt kompetitiv ELISA. Inhibering skedde med Italiensk salladskrydda i koncentrationer från 5mg/ml ner till 78µg/ml. Mikrotiterplattor coatade med 2µg/ml BRA användes.

DISKUSSION

Syftet med studien var att karaktärisera polyklonala antikroppar, framtagna i kanin, mot gul och svart senap. Dessutom skulle en immunologisk metod utvecklas för att kunna detektera odeklarerad förekomst eller kontamination av senap i olika livsmedelsprodukter.

Med SDS-PAGE under reducerade betingelser kunde ett flertal proteiner ses hos de båda senapssorterna från 6kD till 62kD. De båda senapssorternas proteinbandsmönster var mycket likartade. BRA hade dock ett proteinband med molekylmassan 43kD som inte fanns hos SIN, och hos gult senapsfrö fanns ett proteinband på 6kD som inte fanns hos svart senapsfrö. Liknande proteinband återfanns i orientalisk senap (*Brassica juncea*) (23). I den studien användes 12 % och 15 % polyakrylamidgeler för separation av *Brassica juncea*. Till skillnad från min

studie erhölls många småband mellan 35kD och 95kD. I min studie användes en annan typ av gel, 4-12 % gradientgeler, vilket möjligen kan förklara skillnad i proteinmönstren. Vid separation av rapsfröextrakt med SDS polyakrylamid gel erhölls proteinband på 17kD och 60kD, och för renat rapsprotein erhölls ett band på 14kD (24).

Immunoblotting med de båda kaninantikropparna mot SIN respektive BRA gav fler band, framförallt inom det lågmolekylära området, än de som rapporteras med kaninantikroppar mot orientalisk senap (23). Antiserumen mot SIN och BRA reagerade i immunoblotting mot små proteiner med molekylmassor kring 5kD och 9kD. Dessa proteiner är sannolikt desamma som de små basiska proteiner bestående av två polypeptider 3-5kD och 8-10kD, som beskrivs som de dominerande allergenerna i senap (13). Det protein på 51kD som nyligen bestämdes vara ett senapsallergen bestående av två polypeptidkedjor på 23kD och 36kD (12) kan motsvara de band med molekylmassorna 20kD och 30kD, som syntes i immunoblotning med antiserum mot SIN.

Åtta fröer och nötter som testades i immunodiffusion gav ingen reaktivitet, vilket förväntades. Av de fem testade korsblommiga arterna reagerade raps positivt med båda antikropparna. Denna korsreaktivitet med raps har rapporterats hos patienter med senapsallergi (17, 18). I studien med kaninantikroppar mot orientalisk senap testades aldrig dessa för korsreaktivitet med raps. Däremot såg man reaktioner mellan antikropparna och mjölk respektive äggula. I vår studie testades skummjölkspulver, äggula och äggvita. Ingen av dessa visade på korsreaktivitet (23).

Elva livsmedel innehållande senap enligt ingrediensförteckningen testades med immunodiffusion. I fem av dessa kunde senap påvisas och i sex detekterades inte senap med immunodiffusion. Detta trots att renat senapsprotein kunde detekteras ned till 62,5µg/ml och senapsfrö ned till 12,5mg/ml. Det kan bero på att proteinerna ibland finns i mycket små mängder. Samtidigt kan de matriser de befinner sig i påverka möjligheten för detektion (25). Matriserna kan även påverka möjligheten att extrahera proteinerna. Lösligheten hos senapsprotein är beroende på pH och är bäst vid pH 8,0-9,0 (23).

Ett av de positiva livsmedlen, salladskrydda, inhiberade reaktionen mellan antigen och antikropp i indirekt kompetitiv ELISA. Så låg halt salladskrydda som 78µg/ml gav en inhibition på 50 %. ELISA är en känsligare metod än immunodiffusion och fortsatta studier av övriga livsmedel, både positiva och negativa i immunodiffusion, kan eventuellt leda till andra resultat.

De metoder som beskrivs i den här studien kan minst detektera senapsprotein i halter från 156ng/ml med ELISA. Något sämre känslighet visades med de andra metoderna, 62µg/ml med immunodiffusion och 125µg/ml med immunoblotting. Med ytterligare spädningar kan lägre halter ses med immunoblotting. Då samma metoder användes för frö detekterades 12,5mg/ml frö med immunodiffusion och 6,25mg/ml med immunoblotting. ELISA utfördes inte med frö.

I en studie av allergiska patienter testades en krydda innehållande senap. Dosen var från 10mg krydda upp till 1340mg. Ett barn reagerade på 40mg vilket motsvarar 13,5mg senapsfrö (26).

I en fransk studie år 2000 undersöktes 36 barn (10mån-15år). Ökande doser gavs av senapspulver, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 250 och 500mg. Den reaktiva dosen varierade från 1mg till 936mg. Ett barn reagerade på 1mg senapspulver. Medelvärde för reaktiv dos var 153 mg (6).

I en spansk studie av 38 vuxna patienter reagerade hälften vid provokation. Den lägsta nivå patienterna reagerade på var 44,8mg senap och en dos motsvarande 156,8mg orsakade en anafylaktisk reaktion (5).

Mycket små mängder senap har i andra studier visat sig kunna ge allvarliga anafylaktiska reaktioner. Det första fallet av allergisk reaktion mot senap beskrevs 1980. En individ utvecklade en anafylaktisk reaktion mot en pizza kontaminerad med senap (3). Även bestick med rester av senap har rapporterats orsaka anafylaktiska reaktioner (18).

Raketimmunoelktrofores gick inte att optimera för senap. Att metoden inte lämpade sig för senap kan ha berott på att proteinerna är mycket små och har laddning som liknar antikropparnas. Senap innehåller få aromatiska föreningar vilket är mindre vanligt hos proteiner. Detta kan vara ytterligare en orsak till att metoden inte gick att optimera för senap.

Indirekt kompetitiv ELISA visade sig vara en bättre lämpad metod för senap än raketimmunoelktrofores. En så låg koncentration som 156ng/ml renat senapsprotein kunde detekteras, vilket väl täcker rapporterade reaktiva doser.

ACKNOWLEDGEMENT

Först och främst vill jag framföra ett stort tack till Ingrid Malmheden Yman för ett mycket lärorikt och väl utformat examensarbete. Jag vill även tacka Birgitta Kruse för all hjälp med laborerandet, och Monica Ferm för all hjälp med ELISA-metoden. Till sist vill jag tacka all personal på Kemiska enheten 2 som gjort min vistelse på Livsmedelsverket mycket trivsamt.

REFERENSER

- (1) Sampson H A. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:805-819.
- (2) André F, André C, Colin L, Cacaraci F, Cavagna S. Role of new allergens and of allergens consumption in the increased incidence of food sensitizations in France. *Toxicology* 1994;93:77-83.
- (3) Panconesi E, Sertoli A, Fabbri P, Giorgini S, Spallanzani P. Anaphylactic chock from mustard after ingestion of pizza. *Contact Dermatitis* 1980;6:294-295.
- (4) Monsalve RI, Villalba M, Rodriguez R. Allergy to mustard seeds: the importance of 2S albumins as food allergens. *Internet Symposium on Food Allergens* 2001;3 Suppl 2:57-69.
- (5) Figueroa J, Blanco C, Dumpiérrez AG, Almeida L, Ortega N, Castillo R et al. Mustard allergy confirmed by double-blind placebo-controlled food challenges: clinical features and cross-reactivity with mugwort pollen and plant-derived foods. *Allergy* 2005;60:48-55.
- (6) Rancé F, Dutau G, Abbal M. Mustard allergy in children. *Allergy* 2000;55:496-500.
- (7) Gonzalez de la Pena MA, Menéndez –Arias L, Monsalve RI, Rodríguez R. Isolation and characterization of a major food allergen from oriental mustard seeds, *Bra j1*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;96:263-270.
- (8) Rancé F. Mustard allergy as a new food allergy. *Allergy* 2003;58:287-288.
- (9) Rancé F, Kanny G, Dutau G, Moneret-Vautrin D-A . Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr Allergy Immunol* 1999;10:33-38
- (10) Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:821-830.
- (11) Menéndez-Arias L, Moneo I, Domínguez J, Rodríguez R. Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a 1. *Eur J Biochem* 1988;177:159-166.
- (12) Palomares O, Cuesta-Herranz J, Vereda A, Sirvent S, Villalba M, Rodríguez R. Isolation and identification of an 11S globulin as a new major allergen in mustard seeds. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;94:586-592.

- (13) Menéndez-Arias L, Monsalve RI, Gavilanes JG, Rodríguez R. Molecular and spectroscopic characterization of a low molecular weight seed storage protein from yellow mustard (*Sinapis alba* L.). *Int J Biochem* 1987;19:899-907.
- (14) Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Menéndez-Arias L, Lopez-Otin C, Villalba M, Rodríguez R. Characterization of a new oriental-mustard (*Brassica juncea*) allergen, Bra j IE: detection of an allergenic epitope. *Biochem J* 1993;293:625-632.
- (15) List of allergens mars 2007. Allergen nomenclature, International union of immunological societies, allergen nomenclature sub-committee.
www.allergen.org/Allergen.aspx
- (16) Blaiss MS, McCants ML, Lehrer SB. Anaphylaxis to cabbage: detection of allergens. *Ann Allergy* 1987;58:248-250.
- (17) Meding B. Immediate hypersensitivity to mustard and rape. *Contact dermatitis* 1985;13:121-122.
- (18) Widström L, Johansson SGO. IgE-mediated anaphylaxis to mustard. *Acta Derm Venereol* 1986;66:70-71.
- (19) Ortolani C, Pastorello EA, Farioli L, Ispano M, Pravettoni V, Berti C et al. IgE-mediated allergy from vegetable allergens. *Ann Allergy* 1993;71:470-476.
- (20) Caballero T, Martin-Esteban M, Garcia-Ara C, Pascual C, Ojeda A. Relationship between pollinosis and fruit or vegetable sensitization. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5:218-222.
- (21) Europaparlamentets och rådets direktiv 2003/89/EG, Off J European Union L308/15-18, publicerad 25.11.2003.
- (22) Klein E, Baudner S, Herbert OG. Immunochemische Bestimmung des Haselnussproteins mit Hilfe der Elektroimmundiffusion nach Laurell. *Mitteilungen der optimierten Methode. Z Lebensm Unters Forsch* 1985;180:30-35.
- (23) Koppelman SJ, Vlooswijk R, Bottger G, Van Duijn G, Van der Schaft P, Dekker J et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay method to detect mustard protein in mustard seed oil. *J Food Protect* 2007;70:179-183.
- (24) Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Lopez-Otin C, Fiandor A, Fernández C, Villalba M et al. Detection, isolation and complete amino acid sequence of an aeroallergenic protein from rapeseed flour. *Clin Exp Allergy* 1997;27:833-841.

(25) Poms RE, Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit Contam* 2004;21:1-31.

(26) Morisset M, Moneret-Vautrin D-A, Maadi F, Frémont S, Guénard L, Croizier A et al. Prospective study of mustard allergy: first study with double-blind placebo-controlled food challenge trials (24 cases). *J Allergy* 2003;58:295-299.