

Sestavení kompetitivní enzymové imunoanalýzy pro stanovení α -laktalbuminu a β -laktoglobulinů kravského mléka*

LUDMILA KARASOVÁ, PAVEL RAUCH, LADISLAV FUKAL

Institute of Chemical Technology – Department of Biochemistry and Microbiology, Prague, Czech Republic

Abstract

KARASOVÁ L., RAUCH P., FUKAL L. (1999): **Construction of competitive enzyme immunoassay for determination of α -lactalbumin and β -lactoglobulins of cow's milk.** Czech J. Food Sci., 17: 5–14.

Polyclonal antibodies were raised against three immunogens – α -lactalbumin (LA), β -lactoglobulin A (LGA) and B (LGB). Using these antibodies the procedures of an indirect competitive enzyme immunoassay (ELISA) were constructed, optimized and characterized for determination of individual immunogens. It was found that ELISA of LA is very specific without any interferences of other whey proteins. However, in ELISAs of both lactoglobulins A and B were demonstrated very high interferences of the other genetic variant (cross-reactivities 20–280% depending on antibody and immunogen). An excellent sensitivity of ELISA for all proteins (detection limits for LA, LGA and LGB were 13, 0.4 and 54 ng/ml, respectively) makes it possible to analyze milk samples diluted more than 1000 times. Average values of variation coefficient were in the range 16–27%. A comparison of whey protein determinations in raw cow's milk by ELISA and by capillary electrophoresis resulted in the best similarity in results of LA concentration. The decrease of LA, LGA and LGB concentrations was detected by using capillary electrophoresis for an analysis of whey from heat-treated milk, while ELISA of the same milk sample showed the increase of LGB immunoreactivity to 700%.

Key words: α -lactalbumin; β -lactoglobulin; whey proteins; ELISA

Souhrn

KARASOVÁ L., RAUCH P., FUKAL L. (1999): **Sestavení kompetitivní enzymové imunoanalýzy pro stanovení α -laktalbuminu a β -laktoglobulinů kravského mléka.** Czech J. Food Sci., 17: 5–14.

Byly připraveny polyklonální protilátky proti třem imunogenům – α -laktalbuminu (LA), β -laktoglobulinu A (LGA) a B (LGB). Za použití těchto protilátek byly sestaveny, optimalizovány a charakterizovány postupy ke stanovení jednotlivých imunogenů pomocí nepřímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy (ELISA). ELISA pro LA se ukázala jako velice specifická bez interferencí dalších syrovátkových bílkovin. Naproti tomu při ELISA každého z laktoglobulinů dochází k vysokým interferencím druhé genetické varianty (křížové reakce 20–280 % v závislosti na protilátce a imunogenu). Vysoká citlivost všech ELISA (detekční limit pro LA 13 ng/ml, pro LGA 0,4 ng/ml, pro LGB 54 ng/ml) umožňuje analýzu vzorků mléka s větším než 1000násobným ředěním. Průměrné variační koeficienty stanovení koncentrace byly 16–27 %. Při porovnání stanovení jednotlivých syrovátkových bílkovin v syrovém mléce pomocí ELISA a kapilární elektroforézou bylo dosaženo největší podobnosti výsledků u koncentrace LA. V syrovátce z termicky ošetřeného mléka byl kapilární elektroforézou stanoven pokles koncentrací LA, LGA i LGB, zatímco ELISA vzorku celého mléka ukazuje na 700násobný nárůst imunoreaktivity LGB.

Klíčová slova: α -laktalbumin; β -laktoglobulin; syrovátkové bílkoviny; ELISA

α -laktalbumin (LA) a β -laktoglobulin (LG) představují hlavní bílkovinné složky syrovátky (okolo 23 % a 54 % celkových bílkovin syrovátky). Jejich průměrná koncentrace v kravském mléce je 1,2 g/kg (LA) a 3,2 g/kg (LG). Polypeptidový řetězec LA je složen ze 123 aminokyselin

a jeho relativní molekulová hmotnost je 14 200. Hovězí β -laktoglobulin se vyskytuje v mléce jako směs genetických variant A a B (LGA a LGB). Tyto varianty se od sebe liší v aminokyselinové sekvenci 162 aminokyselin pouze ve dvou pozicích. Relativní molekulová hmotnost je 18 400.

*Tato práce byla podporována v rámci projektu GAČR 525/96/0438.

S požadavkem na stanovení koncentrace syrovátkových bílkovin se setkáváme v řadě případů např. při sledování výkyvů koncentrace v mléce v závislosti na plemeni, roční době apod.; sledování změny koncentrace v syrovátce z termicky ošetřeného mléka; prokazování přídavku kravského mléka do ovčího a koziho mléka; sledování alergenních bílkovin v dětské a kojenecké mléčné výživě; kontrole obsahu syrovátky v masných a pekárenských výrobcích apod. Poměrně jednoduché je stanovení koncentrace sumy syrovátkových bílkovin v mléce. Spočívá ve vysrážení kaseinové frakce, separace syrovátky a následném nespecifickém stanovení celkových bílkovin v roztoku. Komplikovanější je situace, pokud je úkolem zjistit obsah jednotlivých bílkovin nebo obsah syrovátky kravského mléka ve vzorcích potravin. Pak je nezbytné jednotlivé bílkoviny nejprve separovat a identifikovat. K separaci se používají metody chromatografické (ANDREWS *et al.* 1985; GIRARDET *et al.* 1989; LAW *et al.* 1993) nebo elektroforetické (KIM, JIMENEZ-FLORES 1994; ZHU, DAMODARAN 1994).

Pokud ke stanovení aplikujeme specifickou protilátku proti konkrétní bílkovině, je možné se vyhnout uvedeným separačním technikám (LEVIEUX, VENIEN 1994; DEMEULEMESTER *et al.* 1991; MÄKINEN-KILJUNEN, PALOSUO 1992). Imunochemické metody tak představují výhodnou možnost řešení tohoto problému.

Analyticky složitější je sledování změn struktury syrovátkových bílkovin během procedur, které modifikují funkční a alergenní vlastnosti syrovátky (působení tepla, tlaku, pH, proteolytických enzymů). K tomuto účelu byly používány především fyzikální techniky jako kalorimetrie (RUEGG *et al.* 1977), měření povrchové hydrofobicity (IBRAHIM *et al.* 1993), fluorescenční spektroskopie (JEYRAJAH, ALLEN 1994), cirkulární dichroismus (MATSUURA, MANNING 1994) nebo infračervená spektroskopie (BOYE *et al.* 1997). Většinu z těchto metod lze aplikovat pouze pro modelové roztoky jedné bílkoviny.

Imunochemické metody se ukazují také v tomto případě jako výhodná alternativa (ENA *et al.* 1995; LALIGANT *et al.* 1995). Specifické protilátky reagují pouze s příslušnou bílkovinou a umožňují tak analyzovat změny její struktury i v tak pestré směsi bílkovin jako je mléko nebo syrovátka.

Abychom v plánovaném výzkumu sledování syrovátkových bílkovin během tepelného a proteolytického ošetření mléka disponovali příslušnou imunochemickou technikou, bylo cílem této práce sestavit, optimalizovat a charakterizovat metodu nepřímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy (ELISA) pro stanovení LA a LG.

MATERIÁL A METODY

Standardy syrovátkových bílkovin byly získány od firmy Sigma Chemical Company, St. Louis, USA (α -laktalbumin kat. č. L-6010, β -laktoglobulin A kat. č. L-7880, β -laktoglobulin B kat. č. L-8005). Od stejné firmy pocházely i *o*-fenyldiamin, Tween-20 a protein A. Hovězí sérový

albumin byl od firmy Imuna Šarišské Michalany, Slovenská republika. Želatína byla získána od fy od Fluka AG, SRN. Konjugát peroxidasy s „druhými“ protilátkami (prasečími imunoglobuliny proti králičím imunoglobulinům) byl od firmy Sevapharma, Praha (v katalogu označován jako SwAR/Px; koncentrace imunoglobulinů 8,1 mg/ml, molární poměr peroxidasa/imunoglobulin byl 1,15). Ostatní chemikálie byly z firmy Lachema Brno. Polystyrenové mikrotitrační destičky (8 × 12 jamek s vypouklým dnem) byly získány od šesti různých výrobců (A–F): Nerbe Plus (Winsen/Luhe, SRN), Corning Costar (New York, USA), Kartell (Binasco, Itálie), Nunc A/S (Dánsko), Labsystems OY (Helsinky, Finsko), GAMA, a.s., (České Budějovice, Česká republika) a Koh-i-noor Hardtmuth (České Budějovice, Česká republika).

Roztoky

0,1M PBS (Phosphate Buffered Saline) – 80 g NaCl, 29 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2 g KH₂PO₄, 2 g KCl, 1 000 ml deionizované vody, pH upraveno na 7,4.

Promývací roztok PBS-Tw – 1 000 ml 0,01M PBS, 0,5 ml Tween-20.

Ředící roztok pro antigeny, vzorky, protilátky a konjugát (PBS-Tw s 1% želatínou) – 1 000 ml 0,01M PBS, 0,5 ml Tween-20, 10 g želatína.

0,05M Karbonát-bikarbonátový pufr (vazebný) pH 9,6 – 1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃, 1 000 ml deionizované vody.

0,1M Citrát-fosfátový pufr pH 5,0 – 29,4 g citranu sodného bezvodého, 1 000 ml deionizované vody, pH roztoku upraveno koncentrovanou kyselinou fosforečnou na hodnotu 5,0.

Substrátový roztok pro peroxidasu – 50 mg *o*-fenyldiaminu, 100 ml 0,1M citrát-fosfátového pufru, 100 μ l 30% peroxidu vodíku.

Produkce polyklonálních antisér

Antiséra proti syrovátkovým bílkovinám byla získána imunizací králíků podle schéma uvedeného v tab. 1. Jelikož 48 dnů po první imunizaci subkutánní injekcí imunogenů vykazovala séra velmi nízký titer (přibližně 1 : 1 000), bylo nutné při další imunizaci použít intramuskulární injekci s adjuvans obsahujícím hydroxid hlinitý. Poslední dávka imunogenů byla aplikována intravenózně. Titr antisér byl 1 : 1 000 000.

Polyklonální antiséra byla připravena proti třem imunogenům: α -laktalbuminu (LA), β -laktoglobulinu A (LGA) a β -laktoglobulinu B (LGB). Každý z uvedených imunogenů byl aplikován dvěma králíčkům.

Postup stanovení titru antisér metodou koncového bodu byl shodný s postupem nepřímé kompetitivní ELISA pouze s tím rozdílem, že nebyl aplikován roztok imunogenu do kompetice a do jednotlivých jamek byl pipetován roztok antiséra různého ředění.

Titr antiséra je vyjádřen tou hodnotou ředění antiséra, u kterého je získaná absorbance 2,1krát vyšší než absorbance jamek s nulovým obsahem antiséra.

Tab. 1. Postup imunizace – Immunization procedure

Den ¹	Postup ²
1.	subkutánní injekce 100 µg antigenu v 0,5 ml PBS spolu s 0,5 ml kompletního Freundova adjuvans (CFA) ³
35.	subkutánní injekce 100 µg antigenu v 0,5 ml PBS spolu s 0,5 ml nekompletního Freundova adjuvans (IFA) ⁴
48.	určení titru protilátek ⁵
58.	intramuskulární injekce 200 µg antigenu v 200 µl PBS spolu s 800 µl AL-SPAIN-OIL adjuvans ⁶
72.	intravenózní injekce 100 µg antigenu v PBS ⁷
82.	určení titru protilátek, vykrvení králíků ⁸

¹day; ²procedure; ³subcutaneous injection of 100 µg antigen in 0.5 ml PBS and of 0.5 ml complete Freund adjuvant (CFA); ⁴subcutaneous injection of 100 µg antigen in 0.5 ml PBS and of 0.5 ml incomplete Freund adjuvant (IFA); ⁵determination of antibody titre; ⁶intramuscular injection of 200 µg antigen in 200 µl PBS and of 800 µl of AL-SPAIN-OIL adjuvans; ⁷intravenous injection of 100 µg antigen in PBS; ⁸determination of antibody titre, rabbit bleeding

Izolace imunoglobulinové frakce z antisér

Imunoglobulinová frakce každého antiséra byla izolována a purifikována na koloně Prosep A obsahující protein A. Frakce obsahující protilátky proti LA byly označeny PLLA11 a PLLA12 a obdobně protilátky proti LGA a LGB byly označeny PLLGA21 a PLLGA22, PLLGB31 a PLLGB32. Všechny uvedené protilátky byly uchovávány jako mrazový sublimát. Základní roztok protilátky o ředění 1 : 100 byl pro experimenty připravován rozpuštěním 0,1 mg sublimátu v 1 ml PBS.

Nepřímá kompetitivní ELISA

Imobilizace imunogenu na povrch jamek mikrotitrační destičky

Zásobní roztok imunogenu byl vhodně naředěn v 0,05M karbonát-bikarbonátovém pufru (pH 9,6) a pipetován do jamek mikrotitrační destičky v množství 200 µl/jamka. Imobilizace probíhala 18 h při 4 °C.

Aplikace kompetujících složek

Roztok imunogenu byl odstraněn a jamky byly čtyřikrát promyty 200 µl PBS-Tw. Poté bylo do jamek aplikováno po 50 µl roztoku imunogenu v PBS-Tw (s 1% želatinou) a 50 µl vhodně naředěné protilátky (ředěno PBS-Tw + 1% želatina). Inkubace trvala 1 h a probíhala za mírného třepání při 37 °C.

Aplikace konjugátu prasečích protilátek proti králičím Ig s křenovou peroxidásou

Nenavázané složky byly z jamek odstraněny čtyřikrát opakovaným promytím 200 µl PBS-Tw. Do jamek bylo pipetováno 100 µl konjugátu SwAR/Px ředěného v PBS-Tw + 1% želatina v poměru 1 : 4 000. Inkubace trvala opět 1 h při 37 °C a probíhala za mírného třepání.

Aplikace substrátu pro peroxidásu

Nenavázaný konjugát byl odstraněn promytím jamek mikrotitrační desky 4 × 200 µl PBS-Tw. Substrát byl pipetován v množství 100 µl/jamka a inkubován 15 min za mírného třepání při 37 °C.

Zastavení enzymové reakce

Enzymová reakce byla zastavena přidávkem 50 µl 2M H₂SO₄.

Měření absorbance

Absorbance reakční směsi byla měřena přímo v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 492 nm proti slepému vzorku (proti jamce A1 naplněné 150 µl destilované vody) na přístroji Labsystems Multiscan MCC/340.

Testování sorpčních vlastností destiček

Postup se do značné míry shodoval s postupem nepřímé kompetitivní ELISA. Rozdíl byl v tom, že v jednotlivých sloupcích jamek na mikrotitrační destičce byly pro imobilizaci imunogenu použity roztoky lišící se mezi sebou v hodnotě koncentrace imunogenu. Proti postupu ELISA nebyl v dalším kroku pipetován do imunochemické interakce roztok imunogenu, ale pouze roztok „první“ protilátky.

Vyhodnocení výsledků

Kalibrační křivky byly programem Enzfitter prokládány pomocí čtyřparametrové regresní funkce:

$$A = C + \frac{D - C}{1 + \exp(-2 * (\alpha + \beta * x))} \quad [1]$$

kde: C – dolní asymptota křivky

D – horní asymptota

α – charakterizuje posun lineární části sigmoidní křivky v systému souřadnic

β – charakterizuje sklon lineární části sigmoidní křivky

x – dekadický logaritmus koncentrace antigenu

A – absorbance při 492 nm

Při výpočtu koncentrace antigenu (c) ze známé hodnoty absorbance byla užívána rovnice:

$$\log c = \frac{\ln \frac{(D - A)}{(A - C)} - \alpha}{\beta} \quad [2]$$

Pro stanovení hodnoty I_{50} (tj. koncentrace antigenu, která způsobuje 50% inhibiční interakce mezi látkou imobilizovanou na povrchu jamek a mezi použitou protilátkou) byla určena hodnota A_{50} :

$$A_{50} = \frac{(C + D)}{2} \quad [3]$$

a $\log I_{50}$ vypočten z rovnice [2], přičemž A bylo nahrazeno A_{50} .

Pro výpočet směrnice lineární oblasti kalibrační křivky k bylo použito rovnice:

$$k = \frac{A_1 - A_2}{\log c_1 - \log c_2} \quad [4]$$

kde: $A_1 = A_{50} \times 1,25$
 $A_2 = A_{50} \times 0,85$
 c_1 a c_2 – dopočteny z rovnice [2]

Detekční limit byl stanoven jako koncentrace odpovídající hodnotě absorbance $0,85 \times D$.

Vyhodnocení křížových interakcí

Ředící řady imunogenu a antigenů, u kterých byly zjišťovány jejich křížové interakce s protilátkami proti imunogenu, byly pipetovány do jamek mikrotitrační destičky s předem imobilizovaným imunogenem. Pro každou použitou koncentraci byla vypočtena relativní absorbance (tj. poměr průměrné absorbance odpovídající určité koncentraci imunogenu nebo antigenu a průměrné absorbance slepého vzorku bez těchto reaktantů). Poté byly vypočteny hodnoty I_{50i} pro imunogen a všechny testované antigeny (I_{50a}) a křížové interakce byly vypočteny ze vztahu:

$$\% \text{ křížových interakcí} = \frac{I_{50i}}{I_{50a}} * 100 \quad [5]$$

Analýza vzorků mléka

Vzorky syrového mléka byly ředěny v PBS-Tw + 1% želatina a aplikovány do procedury ELISA místo standardu imunogenu. Výpočet koncentrace příslušné bílkoviny byl proveden z toho ředění, pro které platilo, že naměřená hodnota absorbance je nejbližší hodnotě A_{50} pro příslušnou kalibrační křivku.

Kapilární elektroforézou byly stanoveny koncentrace jednotlivých syrovátkových bílkovin v mléce podle práce ČURDA *et al.* (1997), pouze místo pracovního fosfátového pufru s pH 2,5 byl použit borátový pufr o pH 8,9. Tím bylo dosaženo rozdělení LGA a LGB.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Metoda nepřímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy (ELISA) používá obecně platné uspořádání analytické procedury (obr. 1). Nejprve jsou potaženy stěny jamek na mikrotitračních destičkách standardem stanovované látky (antigenem, který byl současně imunogenem), potom je do jamek napipetována protilátka proti stanovovanému analytu (tzv. „první“ protilátka) a analyzovaný vzorek s analytem. Po ustavení rovnováhy a vymytí všech reakčních složek nefixovaných na stěnu jamky je přidán přebytek konjugátu enzymu s tzv. „druhou“ protilátkou (protilátka proti „první“ protilátce). Finálně kvantifikovaná aktivita enzymu, který je zprostředkovatelsky fixován na jamku destičky, je pak přímo úměrná množství „druhé“ a tím i „první“ protilátky fixované na jamku, a tudíž nepřímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

Citlivost a specifitu popsané procedury ovlivňuje kombinace celé řady faktorů jako jsou např. sorpční vlastnosti destiček, koncentrace standardu analytu v potahovacím roztoku, afinita a specifita „první“ protilátky a její koncentrace v systému.

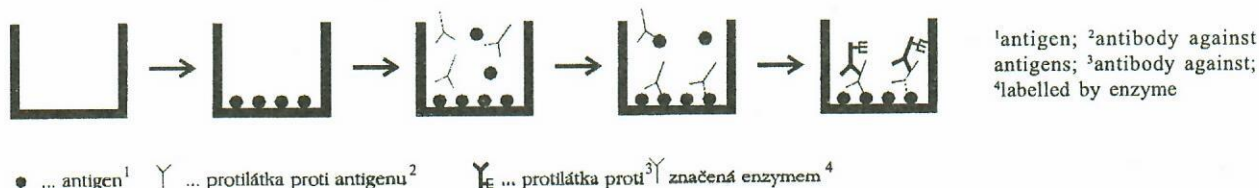
Výběr typu mikrotitrační destičky

Byly testovány sorpční vlastnosti celkem šesti typů mikrotitračních polystyrenových destiček od různých výrobců (A až F). Všechny destičky umožňovaly pouze nekovalentní interakci s bílkovinou. Testovanými bílkovinami byly LA a LGB. Z obr. 2 a 3 jsou patrné značné rozdíly nejen mezi destičkami, ale také mezi sorpcí LA a LGB na jeden typ destičky. Z hlediska sorpčních vlastností destiček, jejich ceny a ceny standardů bílkovin k potahování (LA, LG) byla pro všechny následující experimenty vybrána destička od výrobce označeného symbolem „B“.

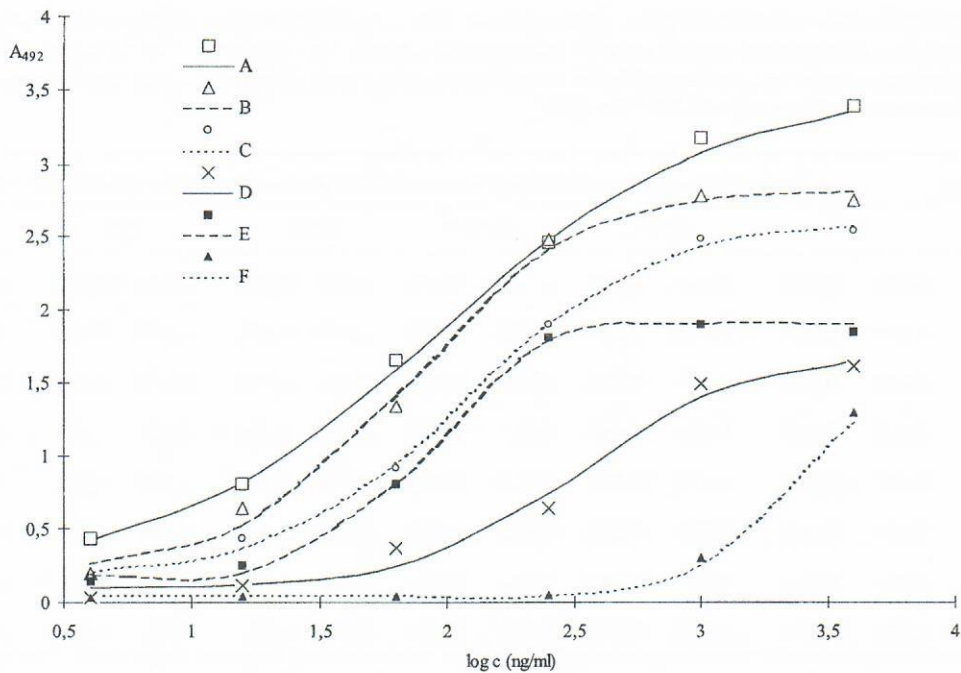
Výběr koncentrací imunoreagencií pro ELISA

Pro každý ze sledovaných antigenů (LA, LGA, LGB) byly zjištěny hodnoty vhodných koncentrací v potahovacím roztoku ve spojitosti s konkrétní koncentrací příslušné protilátky. Aplikovaný experiment představoval proceduru prezentované metody ELISA bez přidávání roztoku antigenu do kompetice. Jednotlivé řádky a sloupce jamek na destičkách se lišily koncentrací „první“ protilátky a koncentrací antigenu (tab. 2). Naměřené hodnoty absorbancí odpovídají parametru D v rovnici [1] (horní asymptota kalibrační křivky).

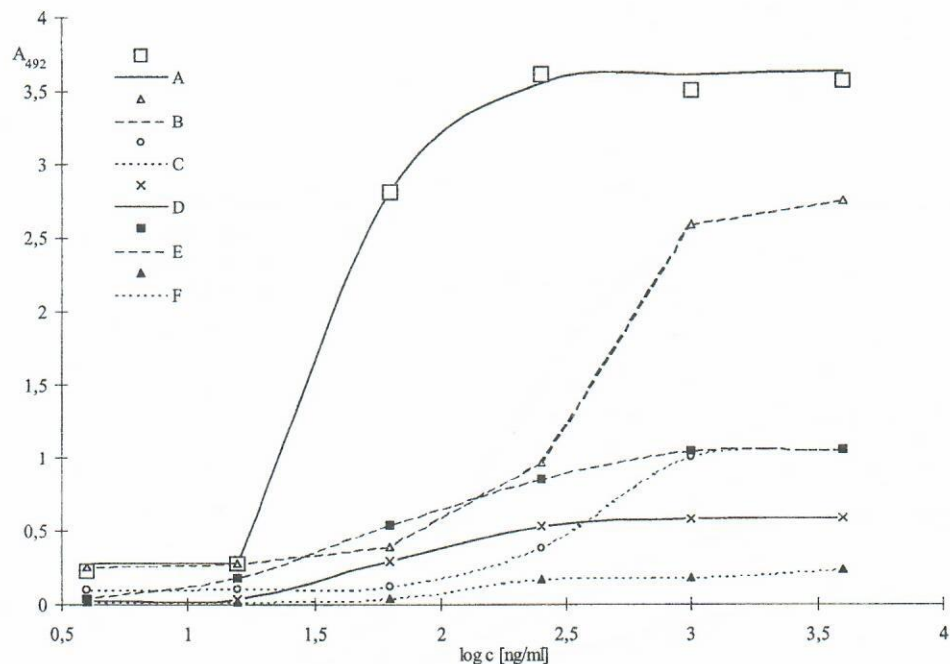
Použitelné pro experimenty ELISA jsou takové dvojice hodnot koncentrací uvedených imunoreagencií, které



Obr. 1. Schéma nepřímé kompetitivní ELISA – Diagram of indirect competitive ELISA



Obr. 2. Vliv druhu mikrotitrační destičky (A–F) a koncentrace α -laktalbuminu v potahovacím roztoku (c) na intenzitu sorpce α -laktalbuminu na stěnu mikrotitrační destičky. Protilátka PLLA12 byla ředěna 1 : 9 600 – The effect of the microtitration plate type (A–F) and α -lactalbumin concentration in coating solution (c) on the intensity of α -lactalbumin sorption to the microtitration plate wall. The antibody PLLA12 was diluted at 1 : 9 600



Obr. 3. Vliv druhu mikrotitrační destičky (A–F) a koncentrace β -laktoglobulinu v potahovacím roztoku (c) na intenzitu sorpce β -laktoglobulinu na stěnu mikrotitrační destičky. Protilátka PLLGB32 byla ředěna 1 : 9 600 – The effect of the microtitration plate type (A–F) and β -lactoglobulin concentration in coating solution (c) on the intensity of β -lactoglobulin sorption to the microtitration plate wall. The antibody PLLGB32 was diluted at 1 : 9 600

poskytnou absorbanci vyšší než 0,5. Avšak jako vhodné lze považovat jen ty, při kterých je dosaženo absorbance v rozpětí hodnot 1,0 až 2,0. Jednotlivé kalibrační křivky pro LGB při různých použitelných kombinacích dvojice

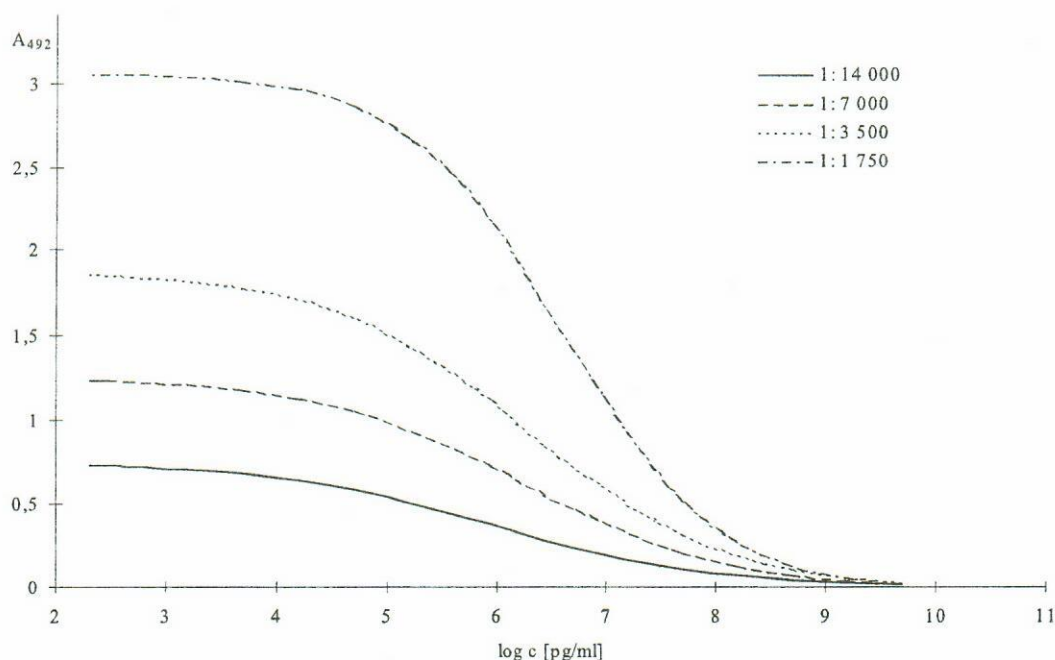
testovaných hodnot se liší (tab. 3, 4 a obr. 4, 5). Je zřejmé, že čím je koncentrovanější protilátka, tím se dosáhne vyšší hodnoty horní asymptoty kalibrační křivky, větší strmosti lineární části, ale horší hodnoty I_{50} (strmá část křivky

Tab. 2. Úvodní optimalizace koncentrace antigenu v potahovacím roztoku a ředění protilátky v proceduře ELISA bez přítomnosti kompetujícího antigenu (dokumentace experimentu na mikrotitrační destičce 12 × 8 jamek) – Initial optimization of antigen concentration in coating solution and antibody dilution in ELISA technique with absence of competitive antigen (experiment documentation in a microtitration plate with 12 × 8 wells)

Ředění protilátky ¹	Hodnoty absorbance při různých koncentracích LA v potahovacím roztoku ² (µg/ml)																		
	0	0,0032	0,0016	0,08	0,4	2	0,000	0,023	0,033	0,031	0,036	0,025	0,031	0,037	0,036	0,039	0,029	0,037	
PLLA 12																			
*PBS-Tw-ž	0,000	0,023	0,033	0,031	0,036	0,025	0,031	0,037	0,036	0,039	0,029	0,037							
1: 256 000	0,019	0,024	0,022	0,018	0,022	0,019	0,049	0,052	0,063	0,073	0,131	0,133							
1: 64 000	0,048	0,028	0,039	0,032	0,041	0,051	0,127	0,129	0,232	0,229	0,246	0,251							
1: 16 000	0,042	0,023	0,039	0,044	0,110	0,113	0,463	0,451	0,696	0,691	0,770	0,846							
1: 4 000	0,056	0,017	0,089	0,095	0,319	0,327	0,971	0,955	1,972	1,912	2,111	2,063							
1: 1 000	0,054	0,041	0,206	0,218	0,692	0,663	2,354	2,391	3,548	3,473	3,660	3,657							
1: 250	0,085	0,066	0,650	0,610	2,068	1,848	3,569	3,567	3,635	3,511	3,810	3,568							
*PBS-Tw-ž	0,036	0,030	0,034	0,029	0,038	0,036	0,034	0,041	0,025	0,036	0,034	0,032							

*V těchto řádcích byl do jamek pipetován místo roztoku protilátek pufr obsahující Tween a želatinu – Buffer containing Tween and gelatin was pipetted into wells instead of antibody solution in these rows

¹antibody dilution; ²absorbance values at various LA concentrations in coating solution (µg/ml)



Obr. 4. Kalibrační křivky kompetitivní ELISA pro β-laktoglobulin při různých ředěních protilátky PLLGB31 (viz legenda v obrázku). Koncentrace β-laktoglobulinu v potahovacím roztoku je vždy 0,1 µg/ml – Calibration curves of competitive ELISA for β-lactoglobulin at various dilutions of the antibody PLLGB31 (see the legend to the figure). β-lactoglobulin concentration in coating solution is 0.1 µg/ml in all cases

Tab. 3. Parametry kalibračních křivek ELISA pro LGB za použití protilátky PLLGB31 – Parameters of ELISA calibration curves for LGB for the use of antibody PLLGB31

Koncentrace LGB v potahovacím roztoku ¹ [μg/ml]	Ředění protilátky ² PLLGB31	Parametry kalibrační křivky ³		
		D	I ₅₀ [μg/ml]	k
0,4	1: 14 000	1,07	10,26	-0,41
	1: 7 000	2,01	16,46	-0,91
	1: 3 500	3,41	20,66	-1,44
	1: 1 750	3,68	58,39	-2,23
0,1	1: 14 000	0,75	0,89	-0,19
	1: 7 000	1,25	1,74	-0,34
	1: 3 500	1,88	1,95	-0,52
	1: 1 750	3,07	3,90	-1,08
0,025	1: 14 000	0,4	0,1	-0,07
	1: 7 000	0,52	0,88	-0,14
	1: 3 500	1,30	0,24	-0,25
	1: 1 750	1,65	1,51	-0,49

¹LGB concentration in coating solution; ²antibody dilution; ³calibration curve parameters

Tab. 4. Parametry kalibračních křivek ELISA pro LGB za použití protilátky PLLGB32 – Parameters of ELISA calibration curves for LGB for the use of antibody PLLGB32

Koncentrace LGB v potahovacím roztoku ¹ [μg/ml]	Ředění protilátky ² PLLGB32	Parametry kalibrační křivky ³		
		D	I ₅₀ [μg/ml]	k
0,4	1: 4 000	1,15	7,41	-0,46
	1: 2 000	2,06	8,88	-0,91
	1: 1 000	3,40	14,37	-1,80
	1: 500	3,51	38,07	-2,83
0,1	1: 4 000	0,64	1,35	-0,19
	1: 2 000	1,10	2,52	-0,37
	1: 1 000	2,03	2,55	-0,75
	1: 500	3,42	3,39	-1,26
0,025	1: 4 000	0,40	0,56	-0,11
	1: 2 000	0,60	2,19	-0,23
	1: 1 000	1,03	2,92	-0,42
	1: 500	1,74	3,90	-0,74

¹LGB concentration in coating solution; ²antibody dilution; ³calibration curve parameters

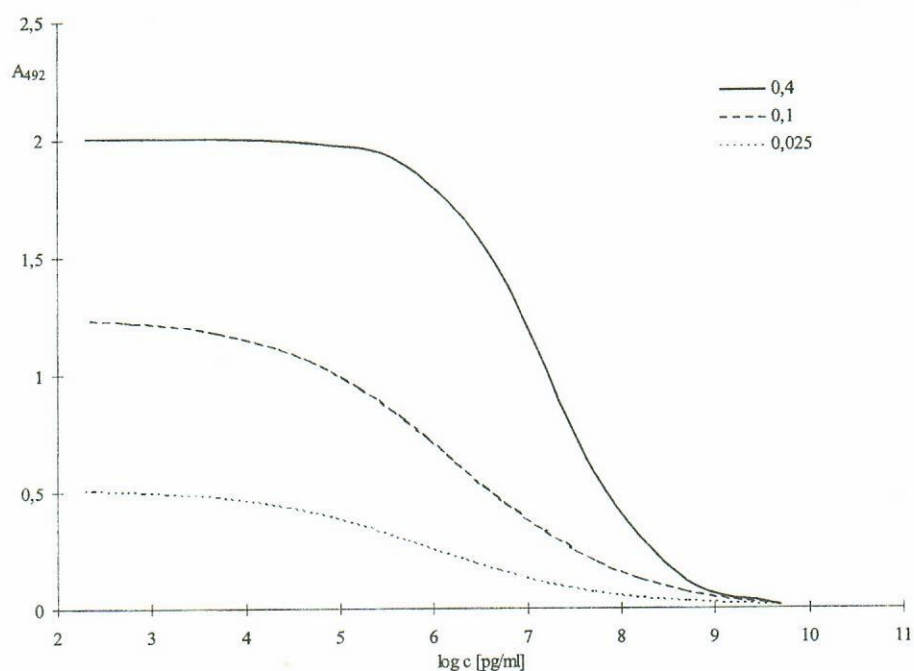
je posunuta více doprava). Totéž platí o vlivu koncentrace imunogenu v potahovacím roztoku na hodnoty horní asymptoty, směrnice strmé části křivky a I₅₀.

Parametry optimalizovaných kalibračních křivek

Výše popsaným postupem byla zjištěna pro každou testovanou syrovátkovou bílkovinu a odpovídající protilát-

ku dvojice hodnot koncentrací, která poskytne nejvhodnější parametry kalibrační křivky ELISA (tab. 5).

Za těchto optimalizovaných koncentrací imunoreagencí byla testována specifita jednotlivých protilátek. Jak je zřejmé z výsledků uvedených v tab. 6, protilátky proti LA nereagují s laktoglobuliny, ani s hovězím sérovým albuminem (BSA). Taktéž protilátky proti laktoglobulinům nere-



Obr. 5. Kalibrační křivky kompetitivní ELISA pro β -laktoglobulin při různých koncentracích β -laktoglobulinu v potahovacím roztoku ($\mu\text{g/ml}$; viz legenda v obrázku). Protilátka PLLGB31 je ředěna 1 : 7 000 – Calibration curves of competitive ELISA for β -lactoglobulin at various concentrations of β -lactoglobulin in coating solution ($\mu\text{g/ml}$; see the legend to the figure). The antibody PLLGB31 is diluted at 1 : 7 000

Tab. 5. Charakteristika vybraných kalibračních křivek ELISA – Characteristics of some ELISA calibration curves

Potahovací i kompetující antigen ¹	Koncentrace antigenu v potahovacím roztoku ²		Ředění protilátky ⁴	Parametry kalibračních křivek ⁵			
	$[\mu\text{g/ml}]$	Protilátka ³		D	I_{50} $[\mu\text{g/ml}]$	k	detekční limit ⁶ $[\text{ng/ml}]$
LA	0,4	PLLA 11	1: 14 000	1,44	0,12	-0,65	13,78
	0,4	PLLA 12	1: 4 000	1,80	0,10	-0,81	12,33
LGA	0,08	PLLGA 21	1: 1 500	1,04	0,67	-0,22	5,58
	0,08	PLLGA 22	1: 8 000	1,29	0,05	-0,25	0,32
LGB	0,025	PLLGB 31	1: 1 750	1,65	1,51	-0,49	53,79
	0,1	PLLGB 32	1: 1 000	2,03	2,55	-0,75	184,90

¹coating and competitive antigen; ²antigen concentration in coating solution; ³antibody; ⁴antibody dilution; ⁵calibration curve parameters; ⁶detection limit

Tab. 6. Křížové reakce – relativní imunoreaktivita testovaných proteinů s konkrétní protilátkou – Cross reactions – relative immunoreactivity of tested proteins with specific antibody

Antigen v potahovacím roztoku ¹	Protilátka ²	Křížová reakce [%] pro protein ³			
		LA	LGA	LGB	BSA
LA	PLLA 11	100	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	PLLA 12	100	< 0,01	< 0,01	< 0,01
LGA	PLLGA 21	< 0,1	100	20	< 0,1
	PLLGA 22	< 0,1	100	66	< 0,1
LGB	PLLGB 31	< 0,1	282	100	< 0,1
	PLLGB 32	< 0,1	245	100	< 0,1

¹antigen in coating solution; ²antibody; ³cross reaction for protein

gují s LA ani s BSA, ale do značné míry interagují i s druhou genetickou variantou LG, než se kterou bylo imunizováno. Je to vysvětlitelné skutečností, že genetická varianta LGA a LGB se ve svých polypeptidových řetězcích liší pouze ve dvou aminokyselinách. Pro imunochemické stanovení to znamená, že pomocí těchto protilátek nelze odlišit LGA a LGB.

Dále byl pro všechny kalibrační křivky ELISA syrovátkových bílkovin zjištěn variační koeficient pro deset stanovení stejné koncentrace. Jeho průměrná hodnota se pohybovala od 16 do 27 %.

Analýzy vzorků mléka

Vypracované a charakterizované ELISA metody byly použity ke stanovení jednotlivých bílkovin v průmyslových vzorcích mléka. Pro porovnání byly vzorky analyzovány také pomocí kapilární elektroforézy. Největší podobnosti mezi oběma metodami bylo dosaženo u stanovení LA v syrovém nezahříváném mléce (tab. 7). Vyšší hodnoty koncentrace LGA a LGB stanovené pomocí ELISA ve srovnání s výsledky elektroforézy pro syrové mléko lze vysvětlit tím, že jak protilátka proti LGA, tak proti LGB reaguje do vysoké míry i s druhou genetickou variantou LG.

Výsledky stanovení bílkovin v tepelně ošetřeném mléce byly ovlivněny několika skutečnostmi. Při ELISA je do reakce pipetováno ředěné mléko, zatímco při elektroforéze se analyzuje syrovátka, která již ovšem neobsahuje tepelně denaturované syrovátkové bílkoviny, které se sorbovaly na kasein a společně se s ním vysrážely při přípravě syrovátky. Elektroforeticky jsou stanovovány koncentrace jednotlivých rozpustných bílkovin v syrovátce, zatímco imunochemicky je zjišťována celková imunoreaktivita (vyjádřená pomocí kalibrační křivky jako koncentrace) všech

Tab. 7. Stanovení syrovátkových bílkovin v mléce pomocí ELISA a kapilární elektroforézy^a – Determination of whey proteins in milk by ELISA and capillary electrophoresis^a

Stanovovaná bílkovina ¹	Koncentrace bílkovin v syrovém ^b /zahříváném ^c mléce stanovené metodou ²	
	ELISA	kapilární elektroforéza ³
LA (g/l)	1,6/1,1	1,3/0,8
LGA (g/l)	2,8/N ^d	1,9/0,2
LGB (g/l)	4,4/3 100	1,5/0,3

^aKapilární elektroforézou byly stanoveny koncentrace bílkovin v syrovátce připravené ze vzorků mléka a hodnoty přepočítány na objem mléka – Protein concentrations in whey made of milk samples were determined by capillary electrophoresis and the values were calculated as milk volume

^bTepelně neošetřené mléko před zpracováním v mlékárně – Milk not treated thermally before processing in a dairy

^cKomerčně produkováno odstředěné mléko zahřáté 20 s na 85 °C – Commercially produced skim milk warmed for 25 s to 85 °C

^dNestavováno – Not determined

¹protein determination; ²protein concentration in raw^b/warmed^c milk determined by the method; ³capillary electrophoresis

molekul konkrétní bílkoviny (nativních i různě tepelně modifikovaných) v mléce. Přesto byl oběma metodami zaznamenán podobný pokles koncentrace LA při zahřátí mléka.

Rozdílnost charakteru monitorované veličiny použitými metodami se plně projevila při stanovení LGB. Záhřevem jistě nedošlo k více než 700násobnému zvýšení koncentrace této bílkoviny v mléce, ale její tepelná denaturace způsobila takové změny v prostorové struktuře molekuly, které měly shodou okolností za následek obrovské zvýšení imunoreaktivity.

Jelikož by výrazné změny v imunoreaktivitě syrovátkových bílkovin během záhřevu mléka mohly být využity při rozlišení různých stupňů termického ošetření mléka, bude jim věnována širší pozornost v dalších experimentech.

Poděkování

Naše poděkování patří Ing. LADISLAVU ČURDOVI, CSc., a RNDr. MARIÍ UHROVÉ, CSc., z VŠCHT Praha za pomoc při stanovení koncentrace bílkovin syrovátky kapilární elektroforézou, a dále studentkám VŠCHT BARBOŘE MÍČKOVÉ a JANĚ HORNÍČKOVÉ za technickou pomoc při některých experimentech.

Literatura

- ANDREWS A. T., TAYLOR M. D., OWEN A. J. (1985): Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **348**: 177–185.
- BOYE J. I., ALLI I., ISMAIL A. A. (1997): Use of differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy in the study of thermal and structural stability of α -lactalbumin. *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 1116–1125.
- ČURDA L., BELHÁČOVÁ L., UHROVÁ M., ŠTĚTINA J., FUKAL L. (1997): Assessment of heat-induced denaturation of whey proteins. *J. Chromatogr. A*, **772**: 231–234.
- DEMEULEMESTER C., LAJON A., ABRAMOWSKI V., MARTIN J. L., DURAND P. (1991): Improved ELISA and dot-blot methods for the detection of whey proteins in meat products. *J. Sci. Food Agric.*, **56**: 325–333.
- ENA J. M., VAN BERESTEIJN E. C. H., ROBBEN A. J. P. M., SCHMIDT D. G. (1995): Whey protein antigenicity reduction by fungal proteinases and a pepsin/pancreatin combination. *J. Food Sci.*, **60**: 104–110.
- GIRARDET J. M., PAQUET D., LINDEN G. (1989): Effects of chromatographic parameters on the fractionation of whey proteins by anion exchange FPLC. *Milchwissenschaft*, **44**: 692–696.
- IBRAHIM R. H., KOBAYASHI K., KATO A. (1993): Improvement of surface functional properties of β -lactoglobulin and α -lactalbumin by heating in a dry state. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**: 1549–1555.
- JEYARAJAH S., ALLEN J. C. (1994): Calcium binding and salt-induced structural changes of native and preheated β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, **42**: 80–85.
- KIM H. H. Y., JIMENEZ-FLORES R. (1994): Comparison of milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, **77**: 2177–2190.

- LALIGANT A., MARTI J., CHEFTEL J. C., DUMAY E., CUQ J. L. (1995): Detection of conformational modifications of heated β -lactoglobulin by immunochemical methods. *J. Agric. Food Chem.*, **43**: 2896–2903.
- LAW A. J. R., LEAVER J., BANKS, J. M., HORNE D. S. (1993): Quantitative fractionation of whey proteins by gel permeation FPLC. *Milchwissenschaft*, **48**: 663–666.
- LEVIEUX D., VENIEN A. (1994): Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cows' milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies. *J. Dairy Res.*, **61**: 91–99.
- MÄKINEN-KILJUNEN S., PALOSUO T. (1992): A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine β -lactoglobulin in infant feeding formulas and in human milk. *Allergy*, **47**: 347–352.
- MATSUURA J. E., MANNING M. C. (1994): Heat-induced gel formation of β -lactoglobulin: a study on the secondary and tertiary structure as followed by circular dichroism spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **42**: 1650–1656.
- RUEGG M., MOOR U., BLANC B. (1977): A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. *J. Dairy Res.*, **44**: 509–520.
- ZHU H., DAMODARAN S. (1994): Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties. *J. Agric. Food Chem.*, **42**: 846–855.

Došlo 18. 11. 1998

Přijato k publikaci 12. 1. 1999

Kontaktní adresa:

Ing. LADISLAV FUKAL, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, tel: + 420 2 24 35 51 37, fax: + 420 2 31 19 990, e-mail: Ladislav.Fukal@vscht.cz
