

УДК 57.083.3

Поступила в редакцию 04.05.2023
Received 04.05.2023**Е. П. Киселева, К. И. Михайлопуло, О. В. Свиридов***Государственное научное учреждение
«Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь***НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГЛИАДИНА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ: ТЕХНИКО-АНАЛИТИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ И ВОПРОСЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ**

Аннотация. Белки эндосперма зерен пшеницы, ржи и ячменя (глютен, включая глиадины) провоцируют развитие целиакии, единственным способом лечения которой является безглютеновая диета. Контроль концентрации глютена в пище основан на количественном определении глиадина, который составляет 50% глютена. В Институте биоорганической химии НАН Беларуси разработана технология производства набора реагентов для количественного определения глиадина в продуктах питания методом иммуноферментного анализа (ИФА) под названием «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин» (ТУ ВУ 100185129.195-2022). По параметрам технического уровня набор «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин» соответствует применяемому в РБ импортному аналогу Ridascreen® Gliadin (арт. R 7001), имеющему статус Официального метода АОАС за номером 2012.01. Показано, что процедура пробоподготовки, традиционно используемая в наборах аналогичного назначения и включающая механическую гомогенизацию и экстракцию глиадина 70% этанолом, не обеспечивает полную экстракцию глиадина из продуктов питания, имеющих пластилинообразную консистенцию. Это приводит к получению ложноотрицательных результатов. Для устранения указанного выше матрикс-эффекта процедура механической гомогенизации была дополнена химической гомогенизацией, проводимой с использованием специального коктейля, состав которого представляет собой «ноу-хау».

Ключевые слова: целиакия, безглютеновая диета, глиадин, глютен, иммуноферментный анализ.

E. P. Kiseleva, K. I. Mikhailopulo, O. V. Sviridov*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus***A TEST SYSTEM FOR GLIADIN ENZYME IMMUNOASSAY IN FOOD:
TECHNICAL AND ANALYTICAL CHARACTERISTICS AND SAMPLE
PREPARATION ASPECTS**

Abstract. Wheat, rye and barley endosperm proteins (glutens, including gliadins) provoke the development of celiac disease, for which the only treatment is a gluten-free diet. The control of gluten concentration in foods is based on the quantitative determination of gliadin that makes up 50% of total gluten. A test system for the quantitative determination of gliadin in food by an enzyme immunoassay, “PRODOSCREEN® ELISA-Gliadin” (TU BY 100185129.195-2022), has been designed. In terms of technical and analytical level parameters, the test system corresponds to Ridascreen® Gliadin (art. R 7001) ELISA kit, which is used in Belarus and has the status of an AOAC Official Method No 2012.01. We found that the conventional sample preparation procedure, including mechanical homogenization and extraction of gliadin with 70% ethanol, did not provide complete extraction of gliadin from foods with a plasticine-like consistency and led to false negative results. To solve the matrix-effect problem, a special cocktail was developed enabling additional chemical homogenization of samples.

Key words: celiac disease, gluten-free diet, gliadin, gluten, ELISA.

Введение. Зерновые (злаки) являются основными продуктами питания человека. Пшеница — самый широко культивируемый злак в мире. Его посевная площадь превышает 220 млн. га. Почти 70% пшеницы используется в пищу, а на корм для скота и промышленную переработку приходится 20% и 2-3%, соответственно [1]. По данным Международного совета по зерну, производство пшеницы в 2019/2020 году составило 763,7 млн тонн, из которых более 523,3 млн тонн было использовано в пищевой промышленности [2]. На гексаплоидную (мягкую) пшеницу *Triticum aestivum* и тетраплоидную (твердую) пшеницу *Triticum durum* приходится 95% и 5% мирового производства пшеницы, соответственно [3].

При среднем содержании всего 10% белки не являются основными ингредиентами пшеничной муки, однако в развивающихся странах она обеспечивает до 30% потребности человека в белке, причем из основных аминокислот дефицитным является только лизин [4]. Пшеница является источником микроэлементов (кальция, железа, магния, марганца, фосфора, калия, натрия, цинка и селена), а также витаминов группы В (В1, В2, В3, В5, В6 и В9) и витамина Е [5].

Каковы причины такой большой популярности пшеницы в сравнении с другими злаками? Известно более 25 000 видов *Triticum aestivum*, что обеспечивает адаптацию пшеницы к широкому диапазону условий умеренного климатического пояса. При наличии достаточного количества воды, минеральных и питательных веществ, а также обеспечении эффективной борьбы с вредителями и патогенами урожайность пшеницы может превысить 10 т/га. Этот злак можно эффективно хранить в течение неопределенного времени при содержании воды менее 15% от сухого веса и при условии борьбы с вредителями. Высокая приспособляемость и урожайность пшеницы способствовали ее успеху, но одного этого недостаточно, чтобы объяснить ее высокую востребованность.

Ключевой особенностью, которая дала пшенице преимущество перед другими культурами умеренного пояса, являются уникальные реологические свойства (упругость, пластичность, эластичность, вязкость) теста, приготовленного из пшеничной муки. Указанные свойства позволяют использовать пшеничную муку для приготовления хлеба и другой выпечки, макаронных изделий и лапши, а также других обработанных пищевых продуктов. Особые реологические свойства пшеничной муки зависят от тех белков эндосперма, которые объединены сборным термином глютен (клейковина) [3].

Эндосперм представляет собой питательные вещества для развития зародыша, которые составляют 81-84% веса зерна [6]. Белки эндосперма пшеницы принято делить на четыре группы на основе их растворимости [7]: альбумины (растворимые в воде), глобулины (растворимые в разбавленном солевом растворе), глиадины (растворимые в 70% этиловом спирте) и глютеины (растворимые в разбавленных кислотах и основаниях). Альбумины и глобулины не представляют интереса в контексте данной работы, т.к. не оказывают влияния на качество пшеничной муки [8] и не вызывают пищевой непереносимости у определенной категории лиц, в отличие от белков двух других групп; именно их называют глютеном. Выделение глютена впервые было описано в 1745 году [9]. Объем исследований пшеничного глютена огромен: простой поиск в базе данных Web of Science показывает почти 20 000 статей с 1945 года.

Глиадины и глютеины также известны как проламины из-за аномально высокого по сравнению с другими белками содержания остатков пролина и глутамина в их структурах. Эта гетерогенная группа включает более 50 различных белков [10], которые составляют 75-80% белков эндосперма [11]. Анализ 15 различных сортов пшеницы показал, что глиадины составляют 43-54% общего глютена [12].

Глиадины представляют собой гетерогенную смесь одноцепочечных полипептидов, растворимых в 70% водном этаноле. На основании их электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле (ПААГ) при низком рН они были разделены на четыре группы (перечислены в порядке убывания подвижности): α -, β -, γ - и ω -глиадины [13, 14]. Обнаружение высокой структурной гомологии привело к объединению α - и β -глиадинов в единую группу α -глиадинов, а среди ω -глиадинов выделили $\omega 5$ - и $\omega 1,2$ -глиадины [13, 15]. Установлены молекулярная масса глиадинов и их процентное содержание в общих глиадинах: α/β -глиадины (28-35 кДа, 28-33%), γ -глиадины (31-35 кДа, 23-31%), $\omega 5$ - глиадины (49-55 кДа, 3-6%), $\omega 1,2$ -глиадины (39-44 кДа, 4-7%) [13]. Дисульфидные связи в молекулах глиадинов либо отсутствуют ($\omega 5$ - и $\omega 1,2$ -глиадины), либо присутствуют в виде внутрицепочечных поперечных связей (α/β - и γ - глиадины) [13].

Глютеины представляют собой полимеры (молекулярные массы в диапазоне 500–10 000 кДа), субъединицы которых соединены межцепочечными дисульфидными связями. После восстановления дисульфидных связей полученные субъединицы глютеина (glutenin

subunits, GS) проявляют растворимость в водных спиртах, аналогичную глиадинам. По результатам ПААГ электрофореза в восстанавливающих условиях, GS принято делить на субъединицы с высокой молекулярной массой (high molecular weight, HMW) (молекулярные массы 67–88 кДа [13] или 75–120 кДа [16]) и субъединицы с низкой молекулярной массой (low molecular weight, LMW) (молекулярные массы 32–39 кДа [13] или 20–55 кДа [16]). Установлено, что нативные глюteniны состоят из основной цепи, образованной полимерами HMW-GS, и полимеров LMW-GS, ответвленных от HMW-GS [13]. Только LMW-GS одновременно имеют внутримолекулярные дисульфидные связи и образуют межмолекулярные дисульфидные связи [17]. Анализ 15 различных сортов пшеницы показал, что соотношение HMW-GS/LMW-GS находится в диапазоне 0,31–0,93 [12], т.е. HMW-GS составляют 24–48% глютеинов.

Хорошие хлебопекарные качества теста определяются балансом между его вязкостью и эластичностью/прочностью. Полимеры глютеина образуют непрерывную сеть, которая придает тесту эластичность и прочность, необходимые для удержания газов, образующихся в процессе брожения, и оказывают сильное влияние на объем буханки хлеба [18], причем вклад HMW-GS и LMW-GSs в технологические качества пшеничной муки составляет 50–70 % и 30%, соответственно [16]. Мономерные глиадины выполняют роль пластификаторов полимерной сети глютеина и придают тесту вязкость [19].

Несмотря на очень долгую историю употребления пшеницы в пищу, есть категория лиц, для которых характерен аномальный иммунный ответ на белки пшеницы и родственных злаков. В частности, известны несколько видов аллергических реакций, развивающихся при употреблении муки в пищу или ее попадании в дыхательные пути [20]. В контексте данной работы представляет интерес глютеиновая энтеропатия или целиакия (celiac disease, CD) — аутоиммунное заболевание, возникающее у лиц с генетической предрасположенностью в результате развития аномального иммунного ответа на проламины пшеницы, ржи и ячменя, а также некоторых сортов овса. Заболеваемость CD составляет в среднем 0,5–2% населения [21], достигая в некоторых популяциях 5% [22].

Молекулярный механизм развития CD хорошо изучен и кратко изложен ниже. Высокое содержание глутамина (35%) и пролина (20%) в составе глютеина предотвращает его протеолиз до аминокислот ферментами желудочно-кишечного тракта человека [23]. Пептиды глютеина токсичны и иммуногенны только для людей, являющихся носителями аллелей HLA-DQ2 и HLA-DQ8 генов белков главного комплекса гистосовместимости, экспрессированных на антиген-презентирующих клетках иммунной системы [24]. Ключевым участником аутоиммунного процесса при CD является кишечный фермент трансклутаминаза 2 (ТГ2, КФ 2.3.2.13), функция которой в норме состоит в «латании дыр» в эпителии кишечника за счет образования изопептидной связи между двумя белками. Реакция протекает в две стадии — дезамидирование и трансамидирование. По иронии судьбы, глиадины являются «любимыми субстратами» ТГ2, т.к. имеют высокое сродство к активному центру фермента. На первой стадии ТГ2 катализирует дезамидирование глутаминов глиадиновых пептидов, что приводит к повышению их иммунореактивности [24]. На второй стадии ТГ2 может образовать изопептидную связь между глутаминовой кислотой глиадина и собственным лизином [25] или лизином в составе белков соединительной ткани кишечника, в частности коллагеном [26]. В результате происходит образование антител не только к глиадину, но и к разным эпитопам ковалентного комплекса «белок человека — пептид глиадина», а затем — собственно аутоантител к белкам человека. Этот процесс также принимает характер аутоиммунного (т.е. направленного на компоненты собственных тканей) с участием компонентов клеток эпителия кишечника (в частности, кальцетинулина), имеющих эпитопы, гомологичные иммуногенным пептидам глиадина [27].

Единственным известным методом лечения CD является полная и неограниченная во времени безглютеиновая диета [21]. Согласно стандарту CXS 118-1979 (Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten) Комиссии «Кодекс алиментарийс», безглютеиновыми являются продукты, содержание глютеина в которых не превышает 20 мг/кг. Продукты, обозначенные как продукты с очень низким содержанием глютеина, могут содержать этот белок в диапазоне концентраций (20–100) мг/кг. Такая низкая концентрация глютеина в продуктах питания может достигаться только при полном исключении муки из указанных выше злаков в списке ингредиентов. В качестве замены муки из пшеницы, ржи и ячменя обычно используют рисовую муку, муку из пшена или тапиоки, картофельный крахмал и т.п. (<http://goodatcooking.net/index.php/ru/archives/4564>). Помимо указанных выше риса, проса и тапиоки, не содержат глютеин гречка, кукуруза, просо, амарант, киноа и сорго (<https://dietera.ru>).

Существует ряд коммерческих наборов реагентов для количественного определения глютена в продуктах питания методом иммуноферментного анализа (ИФА). Тест-системы для определения концентрации глютена в продуктах питания в РФ до настоящего времени не производились. В современных условиях вопросы разработки, изготовления и обеспечения практического применения отечественных аналитических изделий для пищевой промышленности приобретают особую актуальность.

Цель работы — разработка технологии производства и лабораторная апробация набора реагентов для количественного определения глиаина в продуктах питания методом ИФА.

Материалы и методы исследований. 1. Пробоподготовка включает (1) механическую гомогенизацию, (2) химическую гомогенизацию и (3) экстракцию.

1.1 Механическая гомогенизация.

1.1.1 Жидкие образцы перемешивают встряхиванием в упаковке. Полужидкие образцы переносят в соответствующую тару и перемешивают доступным способом (шпателем, блендером и т.п.). Твердые образцы измельчают с помощью ступки, гомогенизатора или мельницы до получения однородной массы.

1.1.2 Взвешивают твердые образцы (0,25 г) или отмеряют жидкие образцы (0,25 мл) и помещают их в предварительно маркированные пробирки для центрифуги объемом не менее 15 мл, снабженные герметично закрывающимися пробками.

1.1.3 Разделяют образцы на группы 1 и 2 в зависимости от консистенции препарата, полученного в результате механической гомогенизации. Группа 1 — образцы, в результате механической гомогенизации которых получен плотный пластилинообразный препарат (колбасные изделия, паштеты, глазированные сырки, конфеты, шоколад и т.п.). Группа 2 — жидкие и полужидкие образцы (напитки, сметана, кетчуп, горчица и т.п.), а также твердые образцы, в результате механической гомогенизации которых получен рыхлый сыпучий препарат (специи, крупы, макаронные изделия, нежирные чипсы и т.п.).

1.2 Химическая гомогенизация.

1.2.1 Химическая гомогенизация необходима только для образцов группы 1. Для этого в вытяжном шкафу добавляют к навеске каждого образца 2,5 мл коктейля для химической гомогенизации образцов. Закрывают пробирки герметично, перемешивают с использованием вихревого смесителя типа «Vortex», инкубируют 40 мин при температуре (50 ± 5) °С, используя ротатор для перемешивания пробирок Thermo Fisher Scientific или другой прибор аналогичного назначения с тем же принципом работы, охлаждают до комнатной температуры $(18-25)$ °С.

1.2.2 Образцы группы 2 не требуют химической гомогенизации. К навеске/отмеренному объему каждого образца группы 2 добавляют 2,5 мл дистиллированной воды, закрывают пробирки герметично, перемешивают с использованием вихревого смесителя типа «Vortex».

1.3 Экстракция.

1.3.1 Для экстракции глиаина из всех образцов, подвергнутых подготовке как указано выше, вносят в каждую пробирку с образцом 7,5 мл 80% этилового спирта, закрывают пробирки герметично, перемешивают с использованием вихревого смесителя типа «Vortex». Инкубируют 1 ч при температуре $(20-25)$ °С, используя ротатор для перемешивания пробирок Thermo Fisher Scientific или другой прибор аналогичного назначения с тем же принципом работы.

1.3.2 Центрифугируют экстракты при 2000 g в течение 5 мин. В вытяжном шкафу отбирают надосадочную жидкость в маркированные пробирки или флаконы с герметично закрывающимися пробками для использования в анализе и хранения. 1 мл экстракта достаточно для 50 анализов данной пробы в дубликатах. Полученные экстракты могут храниться при температуре $(18-25)$ °С в течение 1 месяца.

2 Процедура анализа.

2.1 Разводят экстракты исследуемых образцов в 12,5 раз, используя раствор для разведения экстрактов и калибровочных проб (ИФА-буфер). При необходимости разводят пробу дополнительно ИФА-буфером в 10 и 100 раз. Калибровочные пробы (25-кратные концентраты, $C_1 - C_5$) разводят в 25 раз ИФА-буфером.

2.2 Рисуют схему планшета. Вносят по 100 мкл калибровочных и исследуемых проб в соответствующие лунки в дублях. Инкубируют 1 ч при температуре $(18-25)$ °С без встряхивания, избегая попадания света на планшет. Удаляют содержимое лунок переворачиванием планшета и промывают 3 раза промывочным буфером из расчета 250 мкл на лунку при каждой промывке.

2.3 Вносят в лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата и инкубируют 15 мин при комнатной температуре (18-25) °С. Удаляют содержимое лунок переворачиванием планшета и промывают 5 раз промывочным буфером как указано выше.

2.4 Вносят в лунки планшета по 100 мкл хромоген-субстратного раствора, инкубируют при температуре (18-25) °С в темноте в течение 10-15 мин. Вносят в лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента. Измеряют на фотометре оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

2.5 Строят калибровочный график. По калибровочному графику определяют содержание глиаина, в нг/мл (ppb), в исследуемых пробах. Рассчитывают содержание глютена в мг/кг (ppm) в исследуемых образцах продуктов как указано ниже.

Содержание глютена, ppm = Концентрация глиаина (полученная по калибровочному графику), ppb Ч 2* Ч 500** / 1000***

* Глиадин составляет в среднем 50% глютена;

** Общий фактор разведения 500 (факторы разведения 40 (40 = 10 Ч 4) и 12,5 при приготовлении экстрактов и исследуемых проб, соответственно);

*** коэффициент пересчета ppb в ppm.

3 Определение предела обнаружения, предела количественного определения, коэффициента вариации (КВ).

3.1 Рисуют схему планшета из расчета 10 лунок для калибровочной пробы С₁ (концентрация глиаина 0 нг/мл), 10 лунок для калибровочной пробы С₃ (концентрация глиаина 10 нг/мл), по две лунки для калибровочных проб С₂ и (С₄ – С₆). Вносят по 100 мкл калибровочных проб в соответствующие лунки. Проводят анализ как указано выше в соответствии с п.п. 2.2 – 2.4.

3.2 Определение предела обнаружения. Предел обнаружения — минимальная массовая концентрации глиаина (глютена), в мг/кг (ppm), которая может быть обнаружена (или приближенно оценена) в продуктах питания с использованием данного набора.

Находят среднеарифметическое значение ОП₄₅₀, в оптических единицах (о. е.), для всех лунок с пробой С₁. Рассчитывают величину среднего квадратичного отклонения (SD) по формуле (1):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (B_i - \bar{B})^2}{n - 1}} \quad (1),$$

где B_i — значение ОП₄₅₀ каждого измерения в лунках с пробой С₁, о. е.; \bar{B} — среднее арифметическое значение ОП₄₅₀ в лунках с пробой С₁, о. е.; n — число измерений (n=10).

В линейных координатах строят калибровочный график зависимости колориметрического сигнала, в о. е. (ось ординат) от массовой концентрации глиаина в калибровочных пробах С₁ – С₆, в нг/мл (ppb). На оси ординат графика от точки с координатами (0;0) откладывают значение B плюс 3SD, в о. е. Из полученной точки проводят прямую, параллельную оси абсцисс, до пересечения с графиком. Из точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Получают значение концентрации глиаина, в нг/мл (ppb), которое используют для дальнейших расчетов по указанной ниже формуле.

Предел обнаружения глиаина, мг/кг (ppm) = Концентрация глиаина (полученная по калибровочному графику), нг/мл (ppb) Ч 0,5. Множитель 0,5 выведен из соотношения 500 / 1000, используемого в анализе образца продукта, где 500 — общий фактор разведения образца, 1000 — коэффициент пересчета нг/мл (ppb) в мг/кг (ppm).

Для определения предела обнаружения глютена, в мг/кг (ppm) в продуктах питания следует умножить полученное значение на фактор 2.

3.3 Установление предела количественного определения. Предел количественного определения — минимальная достоверно определяемая массовая концентрация глиаина (глютена), в мг/кг (ppm), которая может быть измерена в продуктах питания с использованием данного набора.

Используют калибровочный график, построенный как указано выше. На оси ординат графика от точки с координатами (0;0) откладывают значение B₁ плюс 10SD, в о. е. Из полученной точки проводят прямую, параллельную оси абсцисс, до пересечения с графиком. Из точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Получают значение концентрации глиаина, в нг/мл (ppb), которое используют для дальнейших расчетов по указанной ниже формуле.

Предел количественного определения глиадина, мг/кг (ppm) = Концентрация глиадина (полученная по калибровочному графику), нг/мл (ppb) Ч 0,5. Множитель 0,5 выведен, как указано в расчетах предела обнаружения.

Для установления предела количественного определения глютена, в мг/кг (ppm) в продуктах питания следует умножить полученное значение на фактор 2.

3.4 Определение К.В.

По калибровочному графику определяют концентрацию глиадина в каждой лунке с пробой C_3 , нг/мл (ppb).

Рассчитывают К.В., в процентах, по формуле (2):

$$К.В. = \frac{100}{C} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}{n-1}} \quad (2),$$

где C_i – значение массовой концентрации глиадина для каждого измерения в лунках с пробой C_3 , нг/мл (ppb); C – среднее значение массовой концентрации глиадина в лунках с пробой C_3 , нг/мл (ppb); n – число измерений ($n=10$).

Результаты исследований и их обсуждение. В Институте биоорганической химии НАН Беларуси разработана технология производства набора реагентов для количественного определения глиадина в продуктах питания методом ИФА под названием «ПРОДОС-КРИН® ИФА-Глиадин» (ТУ ВУ 100185129.195-2022). По традиции концентрация глютена рассчитывается на основании данных о том, что глиадин составляет 50% общего глютена [12].

Набор представляет собой ИФА-систему сэндвич-типа (рис. 1), основанную на использовании двух антител к глютену. Иммунохимические реакции проходят в две стадии. На первой стадии анализа в лунки пластмассового микропланшета, покрытые специфическими антителами к первому эпитопу глиадина («нижние антитела»), вносят исследуемые и калибровочные пробы. В ходе инкубации глиадины, находящиеся в составе проб, образуют иммунный комплекс с «нижними антителами». Все не вступившие в иммунохимическую реакцию вещества удаляются промывкой лунок специальным буферным раствором. На второй стадии анализа в лунки вносят антитела ко второму эпитопу глиадина («верхние антитела») в виде конъюгата с ферментом пероксидазой. В результате инкубации на твердой фазе образуется трехкомпонентный комплекс, содержащий «сэндвич» из антигена и двух антител.

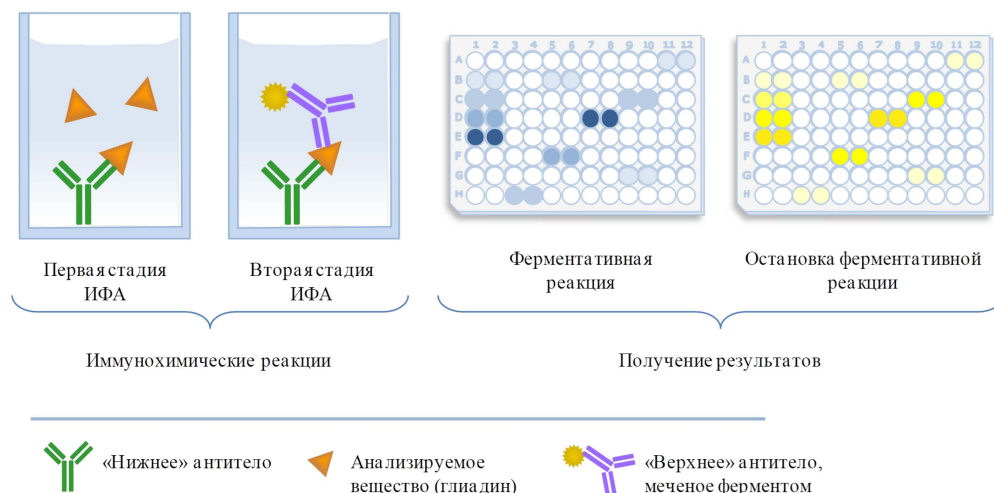


Рис 1. Схема анализа для количественного определения глиадина в продуктах питания методом ИФА
Fig. 1. Assay scheme for the quantitative determination of gliadin in food by ELISA

Фермент, иммобилизовавшийся на поверхности лунок, катализирует реакцию перекисно-го окисления между добавленным хромогеном (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) и субстратом (перекись водорода), которая сопровождается развитием синей окраски. Стоп-реагент инактивирует пероксидазу и меняет цвет раствора в лунке с синего на желтый. ОП₄₅₀, прямо пропорциональная количеству антигена в образце, измеряется фотометрией.

С научно-практической точки зрения принципиально важным является понимание того, каким образом каждое из используемых антител может распознавать каждый из множества белков, образующих в совокупности гетерогенный глиадин пшеницы, а также мономерные компоненты глютена других злаков, а именно ржи (секалины), ячменя (гордеины) и некоторых сортов овса (авенины). Объяснение этого явления состоит в следующем. Во-первых, показана высокая гомология структуры и свойств белков глютена пшеницы и родственных злаков (табл. 1) [29].

Т а б л и ц а 1. Классификация компонентов глютена пшеницы, ржи, ячменя и овса
T a b l e 1. Classification of gluten components from wheat, rye, barley, and oats

Группа	Пшеница	Ячмень	Рожь	Овес
HMW	HMW-глутенины (п) 11%	D-гордеины (п) 5%	HMW-секалины (п) 9%	----
MMW	ω 1,2-глиадины (м) 4%	C-гордеины (м) 36%	ω -секалины (м) 18%	----
	ω 5-глиадины (м) 3%	----	----	----
LMW	LMW-глутенины (п) 22%	B-гордеины (п) 27%	γ -75k-секалины (п) 48%	----
	γ -глиадины (м) 27%	γ -гордеины (м) 32%	γ -40k-секалины (м) 25%	Авенины (м) 100%
	α -глиадины (м) 33%	----	----	----

Примечание: составлено авторами на основании данных [29]. HMW, MMW, LMW — белки с высоким, средним и низким (high, medium, low) молекулярным весом (molecular weight), соответственно. В скобках указана массовая доля каждого белка в общем глютене (%). Полимеры и мономеры обозначены (п) и (м), соответственно.

Во-вторых, установлено, что пять классов молекул глютена пшеницы (α -, γ - и ω -глиадины, LMW-и HMW-GS) имеют сходную структуру [28]. Зрелые полипептидные последовательности α - и γ -глиадинов, а также LMW-GS включают домен II, состоящий из повторяющихся коротких (5-12 аминокислот [13]) мотивов, обогащенных пролином и глутамином; он составляет примерно 45-47% от общей длины полипептидной цепи (без сигнального пептида). Зрелые полипептидные последовательности ω -глиадинов, а также HMW-GS состоят главным образом из повторяющихся коротких мотивов, в результате чего домен II составляет 87% (HMW-GS) и 97% (ω -глиадины) полипептидной цепи [28]. В контексте ИФА, каждый из мотивов является эпитопом антигена, способным к взаимодействию с антителами.

В-третьих, показано, что одни и те же эпитопы находятся в составе различных классов глиадинов пшеницы и гомологичных белков родственных злаков [30]. Так, например, эпитоп PFPQQLPY содержит α -глиадины, LMW-GS и HMW-GS, эпитоп IQPQQAQL — α -глиадины, γ -глиадины и LMW-GS, эпитоп QQPQPFPQ — ω 1,2-глиадины, HMW-GS, LMW-GS, ω -секалины, HMW-секалины, γ -75k-секалины, γ -40k-секалины и C-гордеины, эпитоп PFPQQPFF — ω 1,2-глиадины, HMW-GS, ω -секалины, HMW-секалины, γ -75k-секалины, C-гордеины и γ -гордеины [30]. Указанные выше эпитопы реагируют с молекулами DQ2.5, экспрессированными на поверхности антиген-презентирующих клеток больных целиакией. Установлено, что молекулы DQ8, также экспрессированные на поверхности антиген-презентирующих клеток больных целиакией, взаимодействует с эпитопом QGYPTSPQ, общим для γ -глиадинов, ω 1,2-глиадинов, HMW-GS, LMW-GS и HMW-секалинов [30]. Именно с этими эпитопами (упоминавшимися выше как мотивы домена II полипептидной цепи глютена), общими для разных компонентов глютена пшеницы и родственных злаков, могут взаимодействовать используемые в ИФА антитела.

В состав набора входят следующие компоненты: микроплашетный иммуносорбент, шесть калибровочных проб (25-кратные концентраты), конъюгат (61-кратный концентрат), раствор для разведения экстрактов исследуемых образцов и калибровочных проб, раствор для разведения концентрата конъюгата, коктейль для химической гомогенизации образцов, промышленный раствор (20-кратный концентрат), стоп-реагент, хромоген и субстратный раствор (или хромоген-субстратная смесь).

Набор «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин» рассчитан на проведение анализа 42 исследуемых проб и 6 калибровочных проб в дубликатах, всего 96 определений. Срок хранения набора — 1 год. Область применения — санитарно-гигиеническая экспертиза.

Подготовка образцов к ИФА, помимо традиционно используемых в наборах аналогичного назначения механической гомогенизации и экстракции 70% этанолом, включает химическую гомогенизацию, необходимость которой обоснована ниже. Затраты времени на подготовку 10 проб составляют приблизительно 2,5 ч. Можно накапливать подготовленные к анализу образцы и хранить 1 месяц при комнатной температуре.

Общая продолжительность анализа составляет 2 ч, в том числе время инкубации — первая стадия 1 ч, вторая стадия 15 мин. Анализ проводят при комнатной температуре (18–25) °С без встряхивания.

По параметрам технического уровня набор «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин» соответствует применяемому в РБ иммуноферментному набору Ridascreen® Gliadin (арт. R 7001), имеющему статус Официального метода АОАС за номером 2012.01. Как и импортный аналог, разработанный набор имеет предел обнаружения 0,5 мг/кг глиадина (1 мг/кг глютена) и предел количественного определения 2,5 мг/кг глиадина (5 мг/кг глютена). Коэффициент вариации (К.В.) не превышает 15%. Следует отметить, что в соответствии с инструкцией к набору Ridascreen® Gliadin, пробоподготовка также включает химическую гомогенизацию проб, однако коктейль для химической гомогенизации (арт. R7006/R7016) является дополнением к набору, а не его компонентом, в отличие от представляемого в данной публикации набора «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин».

Следует отметить, что современные технологии производства мясных, кисломолочных и других продуктов часто используют пшеничную клейковину в качестве стабилизатора и загустителя. В этой связи необходим контроль продуктов, присутствие глютена в которых является неочевидным и носит технологический характер. Эта группа продуктов включает колбасные изделия, консервы из мяса и рыбы, молоко, молочные коктейли, жидкие молочные каши, мороженое, кисломолочные продукты и соки, конфеты и т.п. Не исключено также присутствие контаминаций в основных заменителях пшеничной и ржаной муки — рисовой, кукурузной, гречневой, которые могут возникать в процессе сбора, транспортировки и хранения. Ряд продуктов (например, специи, кофе, чай) могут содержать глютен из-за недобросовестности производителя.

При использовании набора «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин» ограничения по выбору продукта питания, пригодного для анализа, практически отсутствуют. Так называемый «матрикс-эффект» заведомо минимизирован благодаря уникальному для белков физико-химическому свойству глиадина — его растворимости в 70% этаноле. Экстрагент в указанной концентрации позволяет извлекать из продукта ограниченный спектр биомолекул, главным образом липиды, но не белки, за исключением глиадина. Как указано выше, аминокислотный состав глиадина также уникален — каждая третья аминокислота представлена глутамином (35%), каждая пятая — пролин (20%) [13]. В этой связи антитела к глиадину являются высокоспецифичными и не взаимодействуют с другими белками матрикса.

Вместе с тем, в случае набора «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин» есть другая причина матрикс-эффекта. Она состоит в недостаточности механической гомогенизации и экстракции для полного извлечения глиадина из тех продуктов (например, колбасных изделий, паштетов, глазированных сырков, конфет, шоколада и т.п.), механическая обработка которых приводит к получению пластилинообразного препарата. Напротив, извлечение глиадина из жидких и полужидких продуктов (напитки, сметана, кетчуп, горчица и т.п.), а также твердых продуктов, в результате механической гомогенизации которых получают рыхлый сыпучий препарат (специи, крупы, макаронные изделия, нежирные чипсы и т.п.), не представляет проблемы.

Это было доказано в результате сравнительного анализа глютена в продуктах питания ($n = 22$) с использованием разработанного нами набора «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин» (далее — Продоскрин) и упоминавшегося выше импортного аналога Ridascreen® Gliadin (далее — Ridascreen).

Калибровочные графики наборов Продоскрин и Ridascreen схожи и совпадают в области точки «cut-off» (20 нг/мл глиадина) (рис. 2), поэтому результаты открытия глиадина в продуктах питания (рис. 3) обсуждаются в терминах значений ОП₄₅₀, а не концентраций глиадина.

Корреляция результатов анализа с использованием набора Ridascreen (с коктейлем арт. R7006/R7016) и набора Продоскрин (в его первоначальной версии, без коктейля) составила 87% за счет принципиального несоответствия концентраций глиадина в двух пробах — №4 (колбаса ливерная «Паштетная волковысская», арт. 1072766, РБ) и №11 (паштет шпротный «За Родину», арт. 237707, РФ). В соответствии с калибровочными графиками, подготовленные к анализу пробы №4 и №11 содержат более 100 нг/мл и 30 нг/мл глютена,

соответственно (набор Ridascreen) или менее 5 нг/мл глютена (набор Продоскрин в его первоначальной версии, без коктейля).

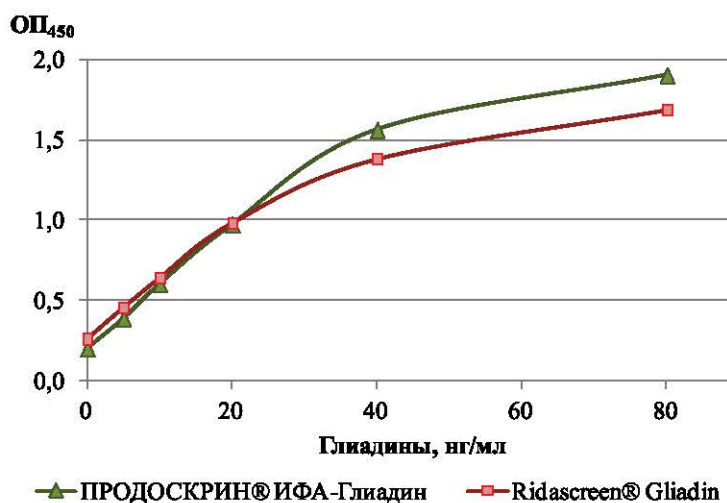


Рис. 2. Калибровочные графики наборов Продоскрин и Ridascreen
 Fig. 2. Calibration curves for Prodoscreen and Ridascreen kits

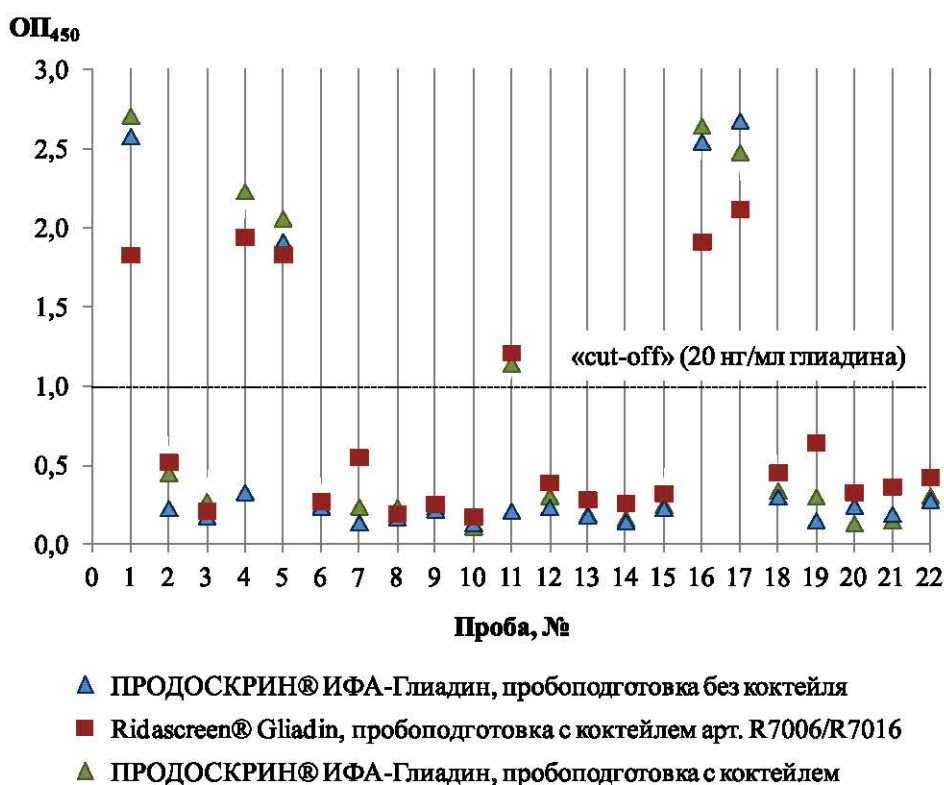


Рис. 3. Результаты анализа глиадина в продуктах питания (n = 22)
 Fig. 3. The results of the gliadin assay in food samples (n = 22)

В связи с обнаруженным фактом недооткрытия (ложноотрицательных результатов) с использованием набора Продоскрин (без коктейля), объяснимым неполной экстракцией глиадина, мы разработали коктейль для химической гомогенизации образцов.

Повторный анализ указанных выше образцов с использованием наборов Продоскрин и Ridascreen, которому предшествовала трехстадийная пробоподготовка (механическая гомогенизация, химическая гомогенизация с соответствующим коктейлем, экстракция 70% этанолом), показал полное соответствие результатов (коэффициент корреляции 98%). Таким

образом, разработанный нами коктейль является функциональным аналогом коктейля, который используется при подготовке проб к проведению ИФА набором Ridascreen®Gliadin, и позволяет решить проблему недооткрытия глиадина в широком спектре продуктов питания, механическая гомогенизация которых дает плотный пластилинообразный препарат.

Заключение. Созданы конструкция, технология производства и методика применения набора реагентов для количественного определения глиадина в продуктах питания, «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин» (ТУ ВУ 100185129.195-2022). По технико-аналитическому уровню и потребительским свойствам отечественный набор соответствует лучшему мировому аналогу. Предложено научно-практическое решение и разработан коктейль для устранения ложноотрицательных результатов ИФА глиадина в продуктах питания.

Список использованных источников

1. Shiferaw B., Smale M., Braun H.-J., Duveiller E., Reynolds M., Geoffrey M. Crops that feed the world. *Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security*. Food Security, 2013, vol.5, pp. 291–317.
2. International Grains Council. Supply and Demand. Wheat. 2021. Retrieved from <https://www.igc.int/en/markets/marketinfo-sd.aspx>. Accessed on 23.01.2021
3. Shewry P. R. Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 2009, vol. 60, no. 6, pp. 1537–1553, doi:10.1093/jxb/erp058.
4. Scherf K. A., Kihler P. Wheat and gluten: technological and health aspects. *Ernahrungs Umschau*, 2016, vol. 63, no 08, pp. 166–175, doi: 10.4455/eu.2016.035.
5. Iqbal M. J., Shams N., Fatima K. Chapter 15. Nutritional quality of wheat. In: *Wheat*. Ed. by Mahmood-ur-Rahman Ansari. IntechOpen. 2022, doi: 10.5772/intechopen.104659
6. Barak S., Mudgil D., Khatkar B. S. Biochemical and functional properties of wheat gliadins: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, vol. 55, pp. 357–368, doi: 10.1080/10408398.2012.654863
7. Osborne T. B. The protein of the wheat kernel, 1907, publication no 84, Carnegie Institute: Washington, DC.
8. Uthayakumaran S., Wrigley C. Chapter 5. Wheat: grain-quality characteristics and management of quality requirements. In: *Cereal grains (second edition)*, 2017, pp. 91-134.
9. Pistón F., Gil-Humanes J., Rodríguez-Quijano M., Barro F. Down-regulating γ -gliadins in bread wheat leads to non-specific increases in other gluten proteins and has no major effect on dough gluten strength, *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no 9, e24754, doi:10.1371/journal.pone.0024754.
10. Shewry P. R., Halford N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization, *J Exp Bot*, 2002, vol. 53, pp. 947–958.
11. Beccari. *De Frumento. De Bononiensi Scientiarum et Artium Instituto atque Academia Commentarii*, 1745, II, part I, pp. 122–127.
12. Dhaka V., Khatkar B.S. Effects of gliadin/glutenin and HMW-GS/LMW-GS ratio on dough rheological properties and bread-making potential of wheat varieties. *Journal of Food Quality*, 2015, vol. 38, no 2, pp. 71-82, doi: 10.1111/jfq.12122.
13. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.*, 2007, vol. 24, pp. 115–119.
14. Banc A., Desbat B., Renard D., Popineau Y., Mangavel C., Navailles L. Exploring the interactions of gliadins with model membranes: Effect of confined geometry and interfaces. *Biopolymers*, 2009, vol. 91, pp. 610–622.
15. Zilic S., Barac M., Pesic M., Dodig D., Ignjatovic-Micic D. Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12, pp. 5878–5894.
16. D'Ovidio R., Masci S. The low — molecular — weight glutenin subunits of wheat gluten. *J Cereal Sci*, 2004, vol. 39, no 3, pp. 321 — 339, doi: 10.1016/j.jcs.2003.12.002.
17. Markgren J., Hedenqvist M., Rasheed F., Skepić M., Johansson E. Glutenin and gliadin, a piece in the puzzle of their structural properties in the cell described through monte carlo simulations. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, no 8, p. 1095, doi:10.3390/biom10081095.
18. Lefebvre J., Mahmoudi N. The pattern of the linear viscoelastic behaviour of wheat flour dough as delineated from the effects of water content and high molecular weight glutenin subunits composition. *J Cereal Sci*, 2007, vol. 45, pp. 49–58.
19. Barak S., Mudgil D., Khatkar B. S. Biochemical and functional properties of wheat gliadins: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, vol. 55, pp. 357–368, doi: 10.1080/10408398.2012.654863.
20. Scherf K. A., Kihler P. Wheat and gluten: technological and health aspects. *Ernahrungs Umschau*, 2016, vol. 63, no 8, pp. 166–175, doi: 10.4455/eu.2016.035.

21. See J., Murray J. A. Gluten-free diet: the medical and nutrition management of celiac disease. *Nutr Clin Pract*, 2006, vol. 1, no 21, pp. 1-15.
22. Alaedini A., Green P. H. R. Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med*, 2005, vol. 142, pp. 289-298.
23. Hausch F., Shan L., Santiago N. A., Gray G. M., Khosla C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, vol. 4, no 283, pp. G996-G1003.
24. Kumar V., Rajadhyaksha M., Wortman J. Celiac disease-associated autoimmune endocrinopathies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, vol. 4, no. 8, pp. 678-685.
25. Fleckenstein B., Qiao S. W., Larsen M. R., Jung G., Roepstorff P., Sollid L. M. Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides. *J Biol Chem*, 2004, vol. 17, no 279, pp. 17607-17616.
26. Dieterich W., Esslinger B., Trapp D., Hahn E., Huff T., Seilmeier W., Wieser H., Schuppan D. Cross linking to tissue transglutaminase and collagen favours gliadin toxicity in coeliac disease. *Gut*, 2006, vol. 55, no 4, pp. 478-484.
27. Krupickov6 S., Tuckov6 L., Flegelov6 Z., Michalak M., Walters J. R., Whelan A., Harries J., Vencovsk6 J., Plaskalov6-Hogenov6 H. Identification of common epitopes on gliadin, enterocytes, and calreticulin recognised by antigliadin antibodies of patients with coeliac disease. *Gut*, 1999, vol. 44, no 2, pp. 168-173.
28. Anderson O. D., Dong L., Huo N., Gu Y. Q. A new class of wheat gliadin genes and proteins. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no 12, e52139. doi:10.1371/journal.pone.0052139.
29. Koehler P., Wieser H., Konitzer K. Celiac disease and gluten — multidisciplinary challenges and opportunities. Academic Press, 1st edition, 2014.
30. Lexhaller B., Colgrave M. L., Scherf K. A. Characterization and relative quantitation of wheat, rye, and barley gluten protein types by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Front. Plant Sci.*, 2019, vol. 10, art. 1530, doi: 10.3389/fpls.2019.01530.

Информация об авторах

Киселева Елена Павловна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь).

E-mail: epkiseleva@yandex.ru

Михайлопуло Константин Игоревич, старший научный сотрудник ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь).

E-mail: k.mikhailopulo@gmail.com

Свиридов Олег Васильевич, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией «Химия белковых гормонов», ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь).

E-mail: sviridov@iboch.by

Information about authors

Kiseleva Elena Pavlovna, PhD (Chemical), Leading Researcher The Institute of Bioorganic Chemistry, the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academic Kuprevich str., 220084, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: epkiseleva@yandex.ru

Mikhailopylo Konstantin Igorevich, Senior Researcher The Institute of Bioorganic Chemistry, the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academic Kuprevich str., 220084, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: k.mikhailopulo@gmail.com

Sviridov Oleg Vasilevich, Doctor of Chemistry, Professor, Head of the Laboratory “Chemistry of Protein Hormones” The Institute of Bioorganic Chemistry, the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academic Kuprevich str., 220084, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: sviridov@iboch.by