شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

فصلنامه

دانش آزمایشگاهی ایران

ISSN 2538-3450

سال یازدهم ■ شماره ٤ ■ زمستان ١٤٠٢ ■ شماره پیاپی ٤٤

تشخیص آلرژن‌های غذایی نظیر گلوتن با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی

- تقویت شبکه آزمایشگاهی با تقویت روابط و همکاری آزمایشگاه‌ها در استان‌ها
- بهره‌مندی مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی از اعتبار مالیاتی

مدیریت کارایی دارایی‌های آزمایشگاه

تخمین عمر باقیمانده لوله‌های فولادی به کار گرفته شده در صنایع پالایشگاهی

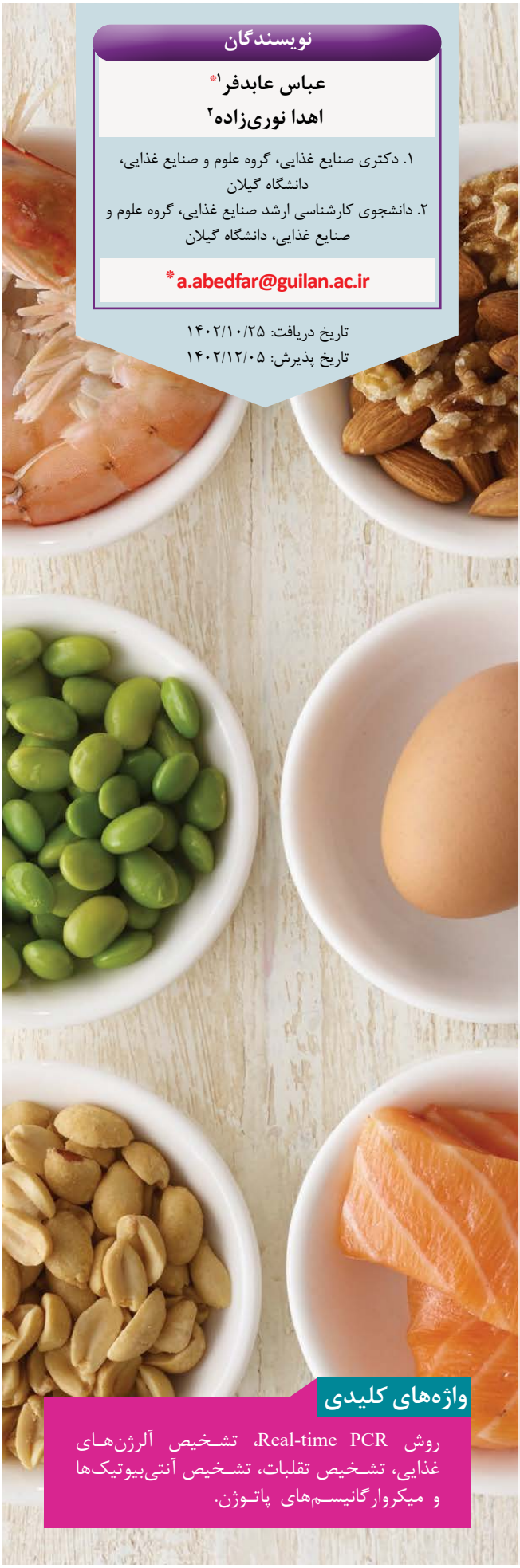
بررسی و شبیه‌سازی آنالیز تخریب زانویی ۹۰ درجه

معرفی دستگاه طیف‌سنج جرمی نسبت ایزوتوپی و کاربرد ایزوتوپ‌های پایدار در ردیابی و کنترل اصالت مواد غذایی

تعیین مقدار کمّی ترکیبات هیدروکربن مایع: مقایسه بین کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی فرابنفش خلاء و کروماتوگرافی گازی دو بعدی

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir

تشخیص آلرژن‌های غذایی نظیر گلوتن با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی



نویسندگان

عباس عابدفر[1*]
اهدا نوری‌زاده[2]

۱. دکتری صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه گیلان
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه گیلان

*a.abedfar@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۵

چکیده

کاربری فناوری‌های مولکولی در نمونه غذایی به‌منظور تشخیص حساسیت‌های غذایی (آلرژی‌ها نظیر گلوتن غلات و لاکتوز شیر) و تشخیص تقلبات در صنایع غذایی امری ضروری به نظر می‌رسد. بی‌شک، به کارگیری روش‌های مرسوم (وابسته به کشت) برای شناسایی آلرژن‌های غذایی، آنتی‌بیوتیک‌ها و میکروارگانیسم‌های پاتوژن‌ها در صنعت فرآوری مواد غذایی امری پرهزینه و بسیار وقت‌گیر خواهد بود، از این رو، بکارگیری روش‌های نوین مولکولی مستقل از کشت نظیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] با کمترین زمان و دقت بسیار بالا به‌منظور ارزیابی کیفیت و ایمنی مواد غذایی معرفی شد. در کشورهای اروپایی، آمریکای شمالی و ژاپنی، ترکیبات نوظهور بر پایه پروتئین به‌عنوان الویت‌های اساسی به‌طور فهرست‌وار طبقه‌بندی شدند. روش‌های گسترده مطالعات روی محتوای توالی نوکلوئتیدی DNA در شرایطی که اطلاعات کافی در خصوص توالی اسیدهای آمینه سازنده پروتئین‌ها نباشد، استفاده می‌شود. به‌منظور ارزیابی شاخص‌های آلرژی‌زا در توالی شازنده پروتئین‌ها از روش‌هایی نظیر PCR، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی[2] استفاده می‌شود. روش‌های مذکور به دلیل دقت بالاتر، دسترسی آسانتر و مقرون به صرفه بودن مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر این اساس، از این روش برای تشخیص حساسیت ساختاری تخم مرغ، شیر و نمونه‌های حاوی مهارکننده‌ها (مانند پلی‌فنول‌ها در شکلات) و همچنین در برخی از کنسانتره‌ها و ایزوله‌های پروتئینی در صنعت استفاده می‌شود. در این مقاله، به بررسی و تشخیص غذاهای حاوی پروتئین‌های آلرژی‌زا، مشکلات و قابلیت‌های چندگانه در سیستم پرداخته خواهد شد.

واژه‌های کلیدی

روش Real-time PCR، تشخیص آلرژن‌های غذایی، تشخیص تقلبات، تشخیص آنتی‌بیوتیک‌ها و میکروارگانیسم‌های پاتوژن.

فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران سال یازدهم ■ شماره ٤ ■ زمستان ١٤٠٢ ■ شماره پیاپی ٤٤

مقدمه

براساس مطالعات انجام شده در طی چند دهه گذشته، آلرژی غذایی شیوع پیدا کرده و در حال حاضر حدود ۶ تا ۸ درصد از کودکان و ۳ تا ۴ درصد از سلامت عموم مردم را تحت تاثیر قرار داده است [۱]. آلرژی‌های غذایی علائم بسیار متغیری داشته و ممکن است پوست، گردش خون، سیستم تنفس و سیستم گوارش افراد را تحت تأثیر قرار دهد. به‌طور کلی، شدت این بیماری خفیف بوده و در گاهی موارد، منجر به مرگ برخی از افراد می‌شود. آلرژی غذایی پاسخ سیستم ایمنی بدن افراد نسبت به پروتئین‌های تغذیه‌ای بوده و تولید آلرژن‌ها توسط بدن افراد، نشان‌دهنده اختلالات ایجاد شده است. ایمونوگلوبولین‌ها، گروهی از آلرژن‌ها هستند که به‌عنوان نشانگر در تشخیص آلرژی‌های غذایی استفاده می‌شوند. آلرژی غذایی علیرغم داشتن محرک مشابه با بیماری سلیاک (گلوتن حاصل از گندم، چاودار و جو) موجب بروز علائم متفاوتی در بدن می‌شود. بیماری سلیاک یک اختلال ایمنی التهابی است که مخاط روده کوچک را تحت تأثیر قرار می‌دهد. حدود ۱ درصد از جمعیت کشورهای توسعه یافته به بیماری سلیاک مبتلا هستند [۲]. آلرژی‌های غذایی و بیماری سلیاک درمان نداشته و تنها گزینه برای درمان مبتلایان، پرهیز از عوامل تحریک کننده است. بر همین اساس، افراد مبتلا به بیماری باید رژیم غذایی مناسبی داشته باشند.

ساختار برچسب‌گذاری محصولات

امکان تشخیص عوامل حساسیت‌زا برای مصرف‌کنندگان با برچسب‌گذاری محصولات فراهم شده‌است. پایگاه‌های نظارتی به‌منظور بررسی مقررات توسط کشورهای گوناگون وضع شده‌است تا هنگام استفاده از آلرژی‌زا یا مشتقات آنها در محصولات غذایی، برچسب‌گذاری انجام شده توسط این مراکز مورد بررسی قرار گیرد. ساختار برچسب‌ها روی محصولات، براساس قوانین هر کشور متفاوت است. به‌طور معمول، از مواد تشکیل دهنده این لیست می‌توان تخم مرغ، شیر، سویا، ماهی، بادام زمینی و آجیل‌ها را نام برد. تعیین میزان مواد نام برده شده در محصولات نیز الزامی است. مقدار مجاز مواد غذایی آلرژی‌زا براساس قوانین هر کشوری متفاوت است. قوانین جهانی به‌منظور حدود مجاز استفاده از این دسته مواد غذایی مقرر نشده‌است اما در کشور ژاپن، مقادیر کمتر از ppm ۱۰ به‌عنوان آلرژی‌زا در نظر گرفته نشده و در برچسب‌گذاری آلرژن‌ها معرفی نمی‌شوند.

همچنین عنوان «فاقد گلوتن» به‌منظور آگاهی‌بخشی مبتلایان بیماری سلیاک در برچسب‌گذاری محصولات غذایی درج می‌شود. برچسب‌گذاری این دسته از محصولات شامل مقررات متفاوتی است. براساس استاندارد کدکس در اروپا، مواد غذایی حاوی گلوتن دارای دو تعریف متفاوت هستند:

(الف): هنگامی که محتویات گلوتن برابر یا کمتر از ppm ۲۰ باشد، محصولات به‌صورت «فاقد گلوتن» برچسب‌گذاری می‌شوند.

(ب): در محصولاتی که میزان گلوتن بیشتر از ppm ۱۰۰ نباشد، به‌صورت «گلوتن اندک» برچسب‌گذاری می‌شوند.

بررسی مواد آلرژی‌زا در صنایع غذایی

امکان دستیابی به تولید محصولات با کیفیت و اطمینان‌بخشی از صحت برچسب‌گذاری‌های انجام شده با کنترل روش‌های تولید مناسب فراهم شده‌است. صنعتگران فعال در حوزه غذا، برای دستیابی به این هدف، به‌طور دقیق مواد آلرژن و گلوتن را مورد بازرسی قرار داده و با اجرای سیستم تحلیل زیان و کنترل نقاط بحرانی[3] در صنعت، احتمال حضور آلرژن‌ها و گلوتن را در محصولات غذایی کاهش داده‌اند. برای جلوگیری از وجود مواد حساسیت‌زا یا باقیمانده گلوتن در محصول نهایی، برخی اقدامات و خطاهای احتمالی در فرآیند تولید پیش‌بینی شده‌است. با کنترل ورود مواد غذایی آلوده به خط تولید، فرمولاسیون مناسب، طراحی صحیح خط تولید، برنامه‌های تولید مناسب و بهداشت دستگاه‌ها نیز می‌توان مقادیر آلرژن‌ها و گلوتن را به‌طور چشم‌گیری کاهش داد.

در صنعت، برای جداسازی مواد حساسیت‌زا و گلوتن از روش تحلیلی[4] استفاده می‌شود. روش مذکور، پس از تجزیه و تحلیل مواد اولیه، بررسی محصولات نهایی، بررسی سطوح و محلول‌های شستشو و مراحل تمیز کردن مورد استفاده قرار می‌گرفت. در میان روش‌های مختلف تشخیص آلرژن‌ها، روش مبتنی بر آنتی‌بادی‌ها یا آزمون ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم[5] و دستگاه‌های جریان جانبی[6] برای تشخیص آلرژن‌های غذایی و گلوتن با استفاده از پروتئین‌ها، روش‌های متداولی هستند. طیف‌سنجی جرمی نیز یکی دیگر از رویکردهای تحلیلی مبتنی بر پروتئین‌ها برای تشخیص و غربالگری است. تشخیص آلرژن‌های غذایی و گلوتن براساس فناوری DNA یکی دیگر از روش‌های مورد استفاده است. در این روش، DNA به جای پروتئین‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد. امروزه

از روش‌های دیگر به بررسی پروتئین‌ها و محتوای ژنی موجود در غذاها می‌پردازند. با اجرای مقررات جدید برچسب‌گذاری، مشکلات تحلیلی روش‌هایی مانند الایزا و روش‌های تاییدی براساس تکثیر DNA برطرف شده‌است. با کمک چنین روش پیشرفته‌ای تعدادی از کشورهای توسعه یافته نظیر کشورهای ژاپن، استرالیا و نیوزلند، کانادا، آمریکا و برخی از کشورهای اروپایی در بررسی برخی از محصولات کشاورزی پیشرو هستند. مهمترین دسته از محصولات کشاورزی در جدول (۱) نشان داده شده‌است.

جدول (۱): گروهی از آلرژن‌های غذایی [۳].

ژاپن	استرالیا/ نیوزلند	کانادا	امریکا	اروپا
بادام زمینی	بادام زمینی	بادام زمینی	بادام زمینی	بادام زمینی
تخم مرغ	آجیل	آجیل	آجیل	آجیل
شیر	سویا	سویا	سویا	سویا
گندم	تخم مرغ	تخم مرغ	شیر	تخم مرغ
میگو	شیر	شیر	گندم	شیر
	ماهی	ماهی	تخم مرغ	ماهی
	دانه کنجد	خردل	ماهی	کرفس
	غلات حاوی گلوتن	دانه کنجد		خردل
		گندم		دانه کنجد
				غلات حاوی گلوتن

روش‌های مبتنی بر DNA

به‌منظور تشخیص آلرژن‌ها در مواد غذایی از روش‌های مبتنی بر DNA استفاده می‌شود. فناوری مبتنی بر DNA به‌طور گسترده برای تشخیص ماهیت مواد غذایی به ویژه برای تشخیص نوع میکروارگانیسم اصلاح شده ژنتیکی[۷] استفاده می‌شود. امروزه برای بررسی موارد ذکر شده روی برچسب‌های مواد غذایی و مقررات تعیین شده به‌منظور تشخیص آلرژن‌ها، از روش مبتنی بر DNA استفاده می‌شود. بسیاری از آزمایشگاه‌ها کنترل‌گر اصلاح شده ژنتیکی (GMO) هستند که از پی سی آر برای تشخیص آلرژن‌های غذایی استفاده می‌کنند. انجام این گروه از آزمایش‌ها، حساسیت بالایی دارند. هدف از به کارگیری این روش، تشخیص آلرژن در مواد خام و محصولات غذایی فرآوری‌شده، است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

سنجش‌های PCR برای تشخیص آلرژن در محصولات کشاورزی، مواد خام و محصولات فرآوری شده استفاده می‌شوند. می‌توان با انتخاب پرایمر مناسب، شرایط و دقت تشخیص آزمون‌های تاییدی را افزایش داد. هنگامی که محصول تقویت شده با آنزیم در نقاط نوکلئوتیدی خاص هضم می‌شود یا به اصطلاح چندریختی طول قطعه بریده‌شده[۸] صورت گیرد، یک الگوی خاص به‌عنوان نقطه هدف آنزیم مشخص می‌شود. اشکال این روش، زمان‌بر بودن آن است. با این حال، در تعیین گونه‌های با تشخیص وجود پلی مورفیسم‌ها به‌خصوص تغییرات تک نوکلئوتیدی در ژنوم به وسیله آنزیم‌های محدودگر یا به اصطلاح (PCR-RFLP)[۹] موجود در گروه‌های غذایی مانند: آجیل، ماهی و سخت‌پوستان نقش مهمی را ایفا می‌کند [۴]. بررسی این مواد غذایی با روش الایزا به اندازه کافی اختصاصی نیست. آنزیم محدود کننده بی فال[۱۰] برای شناسایی سخت پوستان (میگو – خرچنگ)، rRNA را مورد هدف قرار می‌دهد [۵]. همچنین از این روش برای تشخیص سویا در غذاهای فرآوری شده با PCR پرایمر جدید استفاده می‌شود. با این حال، این روش برای مقادیر (۰/۵ درصد سویا) برای تشخیص منبع آلرژی‌زا در محصولات غذایی حساس کاربرد ندارد.

استفاده از پروب‌های برچسب‌دار روش دیگری برای تایید PCR و ویژگی محصولاتی است که با یک غشاء احاطه شده‌اند. با استفاده از این روش، توالی نوکلئوتیدی برای سیستم PCR تعیین می‌شود [۶]. در طی مراحل تجزیه و تحلیل غربالگری، توالی‌های تعیین شده برای PCR با اسید نوکلئیک پپتید همراه شده و به دنبال آن از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۱۱] برای تبادل آنیون با تشخیص فلورسانس استفاده می‌شود. این روش ابتدا برای تجزیه و تحلیل GMOs توسعه داده شد. با این حال، تجزیه و تحلیل HPLC با یک پروب خاص برای تشخیص فندق نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین، این روش برای آزمون‌های تاییدی مفید بوده اما به نسبت سایر روش‌ها، پیچیده و وقت‌گیر است [۷].

Real-time PCR

این روش کمّی مزایای متعددی نسبت به روش PCR معمولی دارد. این روش، امکان کمّی کردن نتایج PCR را فراهم می‌سازد. همچنین احتمال خطای تداخل آغازگرها با محصولات غیر اختصاصی را کاهش می‌دهد. نمونه‌های بررسی شده در این روش، کمتر در معرض آلودگی قرار می‌گیرند. در جدول (۲) مبنای کاربرد روش کمّی و معمولی PCR در برخی از محصولات غذایی که برای تشخیص آلرژن‌های غذایی در مواد خام و غذاهای فرآوری شده استفاده می‌شود، نشان داده شده‌است [۸].

فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران سال یازدهم ■ شماره ٤ ■ زمستان ۱٤۰۲ ■ شماره پیاپی ٤٤

جدول (۲): کاربرد روش‌های PCR معمولی یا کمّی برای تشخیص آلرژن‌های غذایی [۳].

آلرژن	روش مورد استفاده
بادام زمینی	PCR
بادام زمینی	Real-time PCR
سویا	PCR
فندق	PCR/Real-time
گردو	PCR
بادام هندی	PCR
پسته	Real-time PCR
ماهی	PCR
گندم	PCR
غلات حاوی گلوتن	PCR
کرفس	PCR
خردل	Real-time PCR
کنجد	Real-time PCR
سایر آلرژن‌ها	Multiplex PCR

روش تشخیص همزمان چندین توالی هدف با چند جفت پرایمر متفاوت[۱۲]

روش‌های نوین، امکان تجزیه و تحلیل مواد غذایی به‌صورت تشخیص همزمان چند آنالیت را فراهم کرده‌اند. برای تشخیص همزمان چندین آلرژن می‌توان از این روش‌ها استفاده کرد؛ به‌عنوان مثال، با استفاده از روش‌های PCR، امکان تشخیص همزمان فندق و کنجد در مواد غذایی فراهم شده‌است. براساس مطالعات انجام شده، می‌توان محصولاتی که دارای جزء آلرژن هستند و DNA آنها در سیستم PCR تکثیر شده‌است را با پپتید نوکلئیک اسید[۱۳] شناسایی نمود [۹]. از این روش برای شناسایی همزمان آلرژن‌های فندق و بادام زمینی استفاده می‌شود. با دریافت ژن‌های متفاوت مربوط به دو ساختار از آلرژن‌های فندق و بادام زمینی، توالی DNA نمونه به‌عنوان هدف برای پرایمرهای سیستم در نظر گرفته می‌شود [۱۰]. در طی چند دهه اخیر این روش برای شناسایی همزمان بادام زمینی، گردو، پسته، فندق، دانه کنجد و آجیل در مواد غذایی به کار گرفته شده‌است [۱۱]. نمونه‌های آلرژن شناسایی شده مرتبط با هر نوع محصول غذایی و برای گروه‌های سنین متفاوت توزیع می‌شود. در طی چند دهه اخیر این روش برای شناسایی همزمان بادام زمینی، گردو، پسته، فندق، دانه کنجد و آجیل در مواد غذایی به کار گرفته شده‌است [۱۲].

فناوری PCR برای آلرژن‌های غذایی و گلوتن

عوامل حساسیت‌زا بر پایه پروتئین‌های غذایی هستند. هدف اصلی از روش‌های یاد شده، تشخیص این گروه از مواد غذایی است که با DNA ساختاری خود شناسایی می‌شوند. به دلیل ساختار پیچیده پروتئین‌ها و ژن‌های یک محصول، امکان خطا در سنجش‌های مبتنی بر DNA وجود دارد؛ زیرا بیان ژن می‌تواند تحت تأثیر شرایط محیطی نیز باشد. استفاده از این روش‌ها برای برخی از مواد غذایی نیز دارای محدودیت‌هایی است. مواد غذایی آلرژی‌زا مانند: شیر و تخم مرغ به‌منظور آنالیز، حاوی مقادیر قابل توجهی DNA نیستند [۱۳]. همچنین پردازش‌های انجام شده می‌تواند بر ساختار پروتئین و DNA در ساختارهای مختلف تاثیرگذار باشد. پروتئین‌های مورد استفاده برای فرمولاسیون‌های مواد غذایی نیز ممکن است فاقد DNA قابل دسترس باشند. به‌منظور کارآمدی سیستم‌های طراحی شده، از سیستم الایزا و PCR به‌طور مشترک برای تشخیص یک آلرژن استفاده می‌شود [۱۴].

براساس مطالعات انجام شده، سیستم PCR حساسیت کمتری نسبت به آلرژن‌های (پروتئین) شیر و تخم مرغ داشته و همچنین این فناوری، دارای قابلیت تشخیص تمایز ساختاری بین اجزای حساسیت‌زا در گوشت مرغ، گوشت گاو و غیره نیست. با این حال، سنجش‌های مبتنی بر DNA مزایای عمده‌ای نسبت به روش‌های دیگر دارند [۱۵]. برخی از سنجش‌های انجام شده با روش الایزا، براساس تشخیص چندین پروتئین با استفاده از آنتی‌بادی انجام می‌شوند مانند کیت‌های تجاری که برای تشخیص بادام زمینی استفاده می‌شوند. سنجش‌های مبتنی بر DNA قابل توسعه هستند و در مقایسه با روش‌های تولید آنتی‌بادی سریع‌تر انجام می‌شوند [۱۶]؛ زیرا می‌توان توالی نوکلئوتیدی هدف را در آنها نشانه‌گذاری نمود. علاوه‌بر این، روش‌های مبتنی بر DNA، قابلیت تشخیص گروه‌های غذایی خاص مانند ماهی را دارند. در برخی از آزمایشگاه‌ها، از سنجش‌های مبتنی بر DNA برای تشخیص آلرژن‌های غذایی استفاده می‌شود. از نشانگرهای DNA علاوه‌بر تشخیص آلرژن‌های غذایی، برای بررسی تجهیزات صنعتی نیز استفاده می‌شود [۱۷].

اهداف تشخیص آلرژن‌های غذایی

همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، از نشانگرهای DNA برای تشخیص آلرژن‌ها استفاده می‌شود اما ممکن است غلظت آلرژن‌ها در نمونه غذایی قابل تشخیص نباشد. با صرف نظر از مجموعه توالی DNA هدف، سنجش باید از ویژگی و حساسیت کافی برای تشخیص هدف در نمونه‌های غذایی برخوردار باشد [۱۸]. از جمله روش‌های مختلفی که برای تشخیص عوامل آلرژی‌زا براساس نوع ژن هدف استفاده می‌شود می‌توان شرایط ژن‌های علامت‌گذاری شده/نشده آلرژن را نام برد.

با انتخاب آغازگر مناسب، توالی مدنظر تعیین شده و همچنین پتانسیل واکنش به حداقل می‌رسد. به‌عنوان مثال، با وجود تشابه ساختاری بین پروتئین‌های هویج و کرفس، آغازگرهای استفاده شده در PCR برای شناسایی آلرژن کرفس

فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران
سال یازدهم ■ شماره ٤ ■ زمستان ١٤٠٢ ■ شماره پیاپی ٤٤

به‌طور اختصاصی عمل کرده و در واکنش با هویج نشانه‌ای در پی نداشته است [۱۹]. ژن‌های آلرژن خردل نیز درجه تشابه بالایی با ژن‌های کلم بروکلی، کلم و تربچه دارند که با استفاده از آغازگرهای متفاوت قابل تشخیص هستند. با توجه به اینکه توالی DNA مختص هر ارگانیسمی است، در نتیجه، تشخیص ژن‌های تخم مرغ از سایر قسمت‌های مرغ و همچنین تشخیص ژن‌های شیر در مقایسه با سایر فرآورده‌های گاو از جمله گوشت و احشاء، به‌عنوان مواد تشکیل دهنده غیرممکن است. بر همین اساس، سنجش‌های دیگری برای تجزیه و تحلیل تخم مرغ و شیر مبتنی بر DNA نیز در نظر گرفته می‌شود [۲۰].

کارایی سنجش PCR

عوامل متعددی وجود دارند که بر عملکرد سنجش‌های مبتنی بر DNA تاثیرگذار هستند. ارزیابی این سیستم‌ها باید با دقت بالایی انجام شود. یکپارچگی، کیفیت و کمیت شاخص‌های بازیابی شده از DNA در حضور بازدارنده‌ها تأثیر بسزایی در کارایی سنجش دارند [۲۱]. علاوه‌بر موارد فوق، چگونگی فرآوری مواد غذایی نیز بر DNA مواد غذایی تأثیرگذار است. اگرچه DNA یک مولکول بسیار پایدار است، اما فرآیندهای فرآوری ممکن است روی توالی ژن‌های آن نیز تأثیرگذار باشد. بسته به نوع و شرایط فرآوری ماده غذایی، درجات تخریب مولکول متفاوت است. درجه تخریب DNA با دستگاه الکتروفورز قابل تشخیص است. از این فناوری در طی فرآوری نان نیز برای تشخیص بازه دمایی پخت خمیر نان استفاده می‌شود [۲۲].

اهمیت شناخت و درک ساختار DNA در مواد غذایی برای اجرای سنجش‌های مبتنی بر DNA بسیار مهم است. فرآیندهای فرآوری مواد غذایی مانند حرارت‌دهی، اکستروژن در دمای بالا، اسیدی شدن و تخمیر از جمله فعالیت‌های صنعتی هستند که تخریب DNA در آنها قابل بازیافت است. براساس بررسی میزان DNA در فرآیند چربی‌زدایی در آرد سویا، ایزوله‌های پروتئین و کنسانتره، در اثر تخریب DNA تجزیه شده‌اند و در نتیجه سویا در محصولات غذایی قابل شناسایی نبود [۲۳]. با بکارگیری روش PCR با تکثیر نواحی از DNA، به تشخیص آلرژن‌ها و حساسیت‌زا بودن آنها پرداخته می‌شود. از دیگر کاربردهای این روش می‌توان به تشخیص منابع بادام زمینی و بادام بوداده در غلات صبحانه نیز اشاره کرد. طبق تحقیقات انجام شده عملیات حرارتی با PCR و الایزا تأثیرات مضری بر ساختار ژن بادام زمینی در محصولات غذایی دارد [۲۴].

مهارکننده‌های سیستم PCR

ترکیبات خاص استخراج شده همراه با نمونه‌های غذا می‌توانند تا حدی بر DNA تأثیر گذاشته و در تحلیل‌های PCR و Real-time PCR اختلال ایجاد کنند. از هر دو منبع گیاهی و حیوانی، تعداد کمی از ترکیبات می‌توانند اثر بازدارنگی در سنجش داشته باشند [۲۵]. برخی از پلی ساکاریدها و پلی فنول‌های موجود در منابع گیاهی مانند کاکائو، تأثیر بازدارندگی بر فرآیند سیستم دارند. چربی‌ها و اجزای چرب موجود در ساختار بسیاری از مواد غذایی نیز به‌عنوان مهارکننده‌های DNA پلیمراز شناخته شده‌اند [۲۶]. برای تشخیص ترکیبات بازدارنده، نمونه‌های عاری و خالص، تجزیه و تحلیل می‌شوند تا در شناسایی این دسته از مواد اختلال ایجاد نشود. بازیابی DNA در حضور عوامل بازدارنده امکان‌پذیر نبوده و حذف مهارکننده‌ها نیازمند سنجش بالقوه است [۲۷].

بازیابی DNA در مواد غذایی

علاوه‌بر انتخاب روش تحلیل، روش DNA از نمونه، حذف بازدارنده‌ها،کیفیت و خلوص نمونه نیز تأثیرگذار هستند. عدم دستیابی به DNA خالص مورد نظر از نمونه استخراج شده در روش‌های تحلیلی، مشکل ایجاد می‌کند. بازیابی DNA به محتوی چربی و ماده خشک نیز بستگی دارد [۲۸]. محتوی چربی بالا موجب کاهش کارایی استخراج آلرژن‌ها از نمونه‌های غذایی می‌شود. برای تصفیه نمونه‌ها از سدیم دودسل سولفات، فنل-کلروفوم و اتانول استفاده می‌شود ولی در برخی موارد از پروتکل‌های خطرناک برای حذف بازدارنده‌ها استفاده می‌شود [۲۹].

کیت‌های تجاری برای استخراج این موارد وجود دارد اما کاربرد آنها در غذاهای فرآوری شده نیازمند ارزیابی خواص مرتبط با DNA است. بیشتر کیت‌های تجاری خالص‌سازی شده DNA، برای استخراج و جداسازی از مواد خام مانند گیاهان یا بافت طراحی شده‌اند. روش‌های تجاری مختلف برای خالص‌سازی DNA وجود دارند که مبتنی بر استفاده از سیلیس با میل ترکیبی بالا در فاز جامد و متحرک مغناطیسی بوده و از نظر بازده استخراج، خلوص DNA و درجه حساسیت در انواع مواد غذایی متفاوت هستند [۳۰]. این روش مبتنی بر خالص‌سازی براساس مغناطیس است و به علت توانایی حذف مهارکننده‌هایی همچون پلی ساکاریدها و پلی فنل‌ها کاربرد بیشتری در جداسازی DNA از منابع گیاهی دارند. روش دیگری که برای استخراج از کیت‌ها استفاده می‌شود، در قالب ستونی اصلاح شده بود که منجر به استخراج کارآمدتر DNA از نمونه‌های غذایی پیچیده مانند اسنک‌های شکلاتی، سبزیجات و مربای گیلاس می‌شود [۳۱]. علاوه‌بر موارد نام برده شده، مواد دیگری مانند مغزها، بافت DNA گوشت، ماهی و دانه‌های خشک با استفاده از کیت‌های تجاری استخراج DNA مورد سنجش قرار می‌گیرند. کیت‌های استخراج تجاری مختلفی برای استخراج DNA فندق با کیفیت بالا در رابطه با استخراج سنتی فنل/کلروفرم مورد بررسی قرار گرفته و براساس اطلاعات دریافتی، کیت تصفیه DNA مبتنی بر جذب پارامغناطیس روش کارآمدتری است. در طی این روش می‌توان DNA فندق را از شکلات و کرم فندق به‌دست آورد. این روش برای خالص‌سازی غذاهای چرب نیز طراحی شده‌است. با این حال این روش

فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران سال یازدهم ■ شماره ٤ ■ زمستان ١٤٠٢ ■ شماره پیاپی ٤٤

استخراج DNA به مقدار زیادی از نمونه و حلال آلی احتیاج دارد. نتایج مشابهی از DNA استخراج شده با کیت‌های شناسایی کننده حساسیت‌های غذایی[14] هنگام اعمال بر نمونه‌های غذایی از جمله شکلات، بیسکویت، لسیتین و سایر موارد برای تعیین فندق با استفاده از PCR مشاهده شده است [۳۲].

از جمله سنجش‌های تجاری اصلاح شده با استفاده از روش‌های ترکیبی، بررسی عملکرد DNA و تصفیه آن از بادام زمینی خام و بوداده است. در بین روش‌های مختلف انجام شده، خلوص DNA استخراج شده با روش PCR بیشتر بود [۳۳]. آزمایش‌های منتشر شده برای آلرژن‌های غذایی با این روش نشان می‌دهد که هر چه میزان خلوص بیشتر باشد، کیفیت DNA نیز بالاتر است. سنجش PCR برای تشخیص فندق در غذا و مقادیر خلوص (A260/A290) در فندق، شکلات، شیر سویا و مکمل‌های لسیتین سویا برای استخراج DNA گزارش شده‌است. هر چه نسبت (A280/A260) کمتر باشد، تعیین خلوص DNA بهتر است. استفاده از روش مبتنی بر نسبت جذب، موجب قطعه قطعه شدن و نوکلئولیز شدن DNA نمی‌شوند. روش جذب UV روش مناسبی برای تعیین میزان خلوص و کیفیت DNA در تعیین آلرژن‌ها و همچنین روش‌های فلورومتری مناسب نیستند؛ زیرا موجب تخریب DNA شده و اطلاعات دقیقی از حضور مهارکننده‌های PCR ارائه نمی‌دهند [۳۴]. بهترین روش برای ارزیابی کیفیت DNA و غلظت DNA قابل تکثیر جدا شده از نمونه‌های غذایی، ارزیابی توزیع اندازه DNA روی ژل آگارز با رقت مناسب است؛ زیرا موجب تقویت سیستم PCR می‌شود.

میزان حساسیت سنجش

میزان غلظت اولیه DNA نمونه، حساسیت سنجش را محدود می‌کند. حساسیت سنجش را می‌توان با بهینه‌سازی ترکیبی از عوامل مختلف تقویت نمود؛ به‌عنوان مثال:

- انتخاب مجموعه مناسبی از آغازگرها و پروب‌ها؛
- DNA نمونه؛
- غلظت معرف؛
- کیفیت و غلظت DNA استخراج شده؛
- شرایط PCR مانند دما، زمان و تعداد سیکل‌ها.

در طول سنجش‌های توسعه یافته مبتنی بر DNA، این روش‌ها می‌توانند مقادیر ماده حساسیت‌زا از چند میکروگرم در گرم نمونه غذایی (سطح ppm پایین) را با استفاده از الایزا اندازه‌گیری کنند [۳۵]. این روش، قابلیت سنجش با حساسیت بالا در مواد غذایی مانند:گندم سیاه، کرفس، فندق، شکلات و مقادیر ppm ۱۰-۵ در سوسیس‌های چرب نوع امولسیونی را دارد [۳۶].

چگونگی کنترل شرایط تقویت شده

برای اطمینان از خلوص DNA استخراج شده از غذاهای فرآوری شده، بیشتر، وجود یا عدم وجود مهارکننده‌های PCR و بسیاری از سنجش‌ها برای آلرژن‌های غذایی که شامل یک جفت آغازگر یوکاریوتی است، استفاده می‌شود. جفت آغازگر مخصوص گیاه که برای تقویت ناحیه غیرکد کننده کلروپلاست هستند نیز در این شرایط استفاده می‌شوند [۳۷].

غلظت DNA هدف

حداقل غلظت DNA مورد نیاز برای تقویت دستیابی و برقراری حساسیت مطلوب مورد نیاز متفاوت است. نتایج PCR مثبت برای آلرژن‌های غذایی در نمونه‌های حاوی یک نمونه ژن (کپی شده) در فندق گزارش شده‌است [۳۸]. از آنجایی که غلظت DNA در تخم مرغ، شیر، روغن‌های گیاهی و چربی‌های گیاهی کم است، استفاده از PCR برای تشخیص این غذاهای آلرژی‌زا محدود است [۳۹].

کمّی‌سازی داده‌ها

روش Real-time PCR در اصل، ماهیت کمّی دارد. این روش به چگونگی پردازش مواد غذایی نیز وابسته است. در این روش برای کمّی‌سازی داده‌های سنجش، یک منحنی خاص برای هر نوع محصول غذایی ترسیم می‌شود. در چند دهه اخیر، آلبرت اوگستر یک مدل ریاضی برای تعیین کمیت آلرژن‌های خاص با استفاده از PCR توصیف کرده است. این تجزیه تحلیل برای آرد هم انجام شده‌است، از آنجایی که این پردازش موجب تخریب شدید ساختارها نمی‌شود، برای کنسانتره‌های پروتئینی نیز قابل استفاده است [۴۰].

کمّی‌سازی دقیق به عواملی مانند اثر پردازش مواد غذایی بر یکپارچگی اندازه ذرات نمونه، ترکیب و خواص، ساختار DNA غذا، روش استخراج، روش کمّی‌سازی، میزان بازیابی و مواد مرجع نیز بستگی دارند. در حال حاضر، هیچ محدودیتی برای تعیین آلرژن‌ها با استفاده از این روش دیده نشده‌است اما اعمال شرایط خاص به‌منظور استخراج و ایجاد محدودیت‌ها در انتخاب روش تأثیرگذار است [۴۱].

حداقل خطا در سنجش

عدم آماده‌سازی مناسب نمونه‌ها، معرف‌ها، ظروف و لوله‌های حاوی محصولات PCR می‌تواند منجر به خطاهایی در حساسیت، کمیت و نتایج حاصل شده شود:

- استفاده از معرف‌های تاریخ مصرف گذشته یا عدم آماده‌سازی صحیح معرف‌ها.
- واکنش‌های PCR با استفاده از حجم معرف کم (محدوده میکرولیتر) انجام می‌شود. خطاهای تأثیرگذار بر شرایط PCR، موجب ایجاد خطا در جنبه‌های کمّی سنجش نیز می‌شود.
- گاهی ممکن است که تمامی معرف‌ها به درستی مخلوط شده باشند اما تغییرات اعمال شده در نمونه به علت

لوله‌گذاری نامناسب و تغییرات ایجاد شده در معرف‌ها به درستی انجام نشوند.

■ انتقال آلودگی به نمونه نیز موجب ایجاد خطا در استخراج DNA و یا محصولات حاصل از PCR می‌شود. اقدامات پیشگیرانه می‌توانند به سادگی از بروز خطرات احتمالی جلوگیری کند مانند: استفاده از ظروف یکبار مصرف یا ایجاد زیرساخت‌هایی برای محدود کردن فعالیت در محیط انجام آزمایش [۴۲]؛ به‌عنوان مثال، آماده‌سازی نمونه باید در محل متفاوتی از محل انجام آزمایش انجام شود. اقدامی دیگر برای جلوگیری از انتقال آلودگی در محصول، استفاده از دینامیک روابط بین ساختار مولکولی یا (d UTP) به جای لانگو[15] در PCR است. استفاده از بازدارنده‌های استخراج شده همراه با DNA نمونه غذا، موجب کنترل شرایط آزمون‌ها و حذف آلاینده‌های موجود در معرف‌ها و ظروف در حین آماده‌سازی نمونه می‌شود [۴۳].

موارد دیگری در رابطه با تنوع روش‌های نمونه‌گیری و طراحی شرایط سنجش وجود دارد که می‌توان آنها را نیز به حالت مطلوب رساند:

■ اندازه نمونه؛ اندازه ذرات و همگنی نمونه از مهم‌ترین عوامل ایجاد تغییر در تجزیه و تحلیل مواد غذایی هستند. ایجاد یک طرح نمونه‌گیری مناسب پیچیده بوده و ممکن است با توجه به ویژگی‌های نمونه، نوع محصول غذایی و فعالیت‌های فرآوری محدود شود. آلرژن‌های غذایی می‌توانند به دلیل آلودگی در نقاط مختلف تولید و همچنین به علت طراحی شرایط واکنش نامناسب، در محصولات غذایی به‌طور ناهمگن توزیع شوند. چنین محصولاتی حاوی لایه‌های مختلفی از مواد تشکیل دهنده هستند مانند:کوکی‌های شکلاتی. اگر نمونه مورد نظر به‌طور همگن توزیع نشود ممکن است در پردازش انجام شده نیز خطا ایجاد کند. بسته به محل قرارگیری نمونه (در سطوح داخلی محصول) و درجه پردازش، نتایج حاصل از آنالیز نیز متفاوت است. به‌عنوان مثال، نمونه‌های جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف نان حاوی ترکیبات سویا، نتایج متفاوتی در PCR نشان می‌دهند. بنابراین، برای به حداقل رساندن خطاهای ناشی از ناهمگونی نمونه، باید چگونگی نمونه‌گیری و آماده‌سازی آن مناسب باشد [۴۴].

■ روش‌های دیگری نیز می‌توانند در به حداقل رساندن خطاهای تحلیل تأثیرگذار باشند. یک آنالیز PCR برای تشخیص گندم سیاه انجام شده‌است که در آن از یک کنترل کننده استاندارد شده برای جبران تنوع ناشی از بازده استخراج نمونه‌ها استفاده می‌شود [۴۵].

■ بسته به نوع ماده غذایی و ویژگی‌های منحصر به فرد آن، نوع آنالیز، هدف نهایی و کارایی آنها نیز متفاوت است. این موضوع را می‌توان در تعیین و تشخیص آلرژن‌های فندق در شکلات تلخ، شیر سویا، مکمل‌های لسیتین مشاهده کرد. به همین دلیل، سنجش‌ها باید به درستی توسعه داده شوند تا دقت ارزیابی حفظ شود و اختلاف نتایج حاصل شده کاهش یابد [۴۶].

استانداردهای سنجش مبتنی بر DNA

ساختار اعتبارسنجی استاندارد شده‌ای برای تشخیص آلرژن‌های غذایی سنجش شده با روش‌های مبتنی بر DNA وجود ندارد. برای تشخیص آلرژن‌ها از دستورالعمل‌های مورد استفاده برای محصولات مشتق شده در زیست فناوری کشاورزی استفاده می‌شود. با این حال، از موانع عمده‌ای که در معتبر بودن سنجش‌های مبتنی بر DNA آلرژن‌های موجود در محصولات مهندسی شده زیستی وجود دارد، عدم وجود منابع علمی اثبات شده به‌منظور تشخیص وکاربرد آنها است [۴۷]. طی مطالعات انجام شده در آنالیز PCR برای کرفس، خردل و کنجد، دستورالعمل‌ها نشان می‌دهد که تفاوت‌هایی در چگونگی آنالیز یک هدف در سه نمونه ماده غذایی وجود دارد:

(الف): فاز استفاده شده: شامل مواردی همچون جنبه‌های کاربردی، امکان انجام آزمون، دقت، کارایی، انحراف استاندارد تکرارپذیری، حد کمّی‌سازی و میزان استحکام آن است.

(ب): ارزیابی نتایج اعتبارسنجی: شامل الزامات روش عملکردی سیستم از نظر دینامیکی و صحت میانگین بازیابی و تکرارپذیری است. در سنجش کیفی PCR انجام شده برای تشخیص بادام زمینی در غذاها، نشان داده شده‌است که در خمیرهای اتوکلاو شده، برشته، آب‌پز و غیرفرآوری شده از سطوح مختلفی از آرد بادام زمینی بدون چربی (۰/۱ درصد، ۰/۰۱ درصد، ۰/۰۰۱ درصد و ۰ درصد) استفاده شده‌است. نتایج PCR از نمونه‌های خمیر (فرآوری شده و فرآوری نشده) را بررسی کرده و با نتایج حاصل از الایزا مطابقت دادند. آزمایش‌ها نشان داد که این روش برای تشخیص بادام زمینی در انواع غذاهای فرآوری شده قابل تکرار، قابل اعتماد و قابل استفاده است [۴۸].

سنجش‌های تجاری

طیف گسترده‌ای از کیت‌های تجاری الایزا با برندهای انواع شرکت‌ها موجود است. با این حال، تعداد شرکت‌هایی که کیت‌های PCR برای تشخیص آلرژن ارائه می‌دهند، بسیار محدود است. این امر نشان‌دهنده عدم پذیرش و استفاده از این روش برای تشخیص آلرژن‌های غذایی است. در بین روش‌های تجاری مبتنی بر DNA، روش PCR به‌عنوان آزمایش‌های کیفی استفاده می‌شود. همه کیت‌ها دارای محدودیت میزان غلظت در تشخیص مواد غذایی حساسیت‌زا هستند [۴۹].

کیت‌های تجاری Real-time PCR برای بادام زمینی، سویا، بادام، فندق، گردو، سخت پوستان، نرم تنان، کنجد، کرفس، خردل و غلات حاوی گلوتن (گندم-چاودار- جو و کاموت) قابل استفاده هستند. کیت‌های مورد استفاده برای گروهی از آلرژن‌ها، نتایج مثبتی را در میان گونه‌های مختلف ارائه می‌دهند؛ به‌عنوان مثال، کیت‌های متعلق به ماهی قابلیت

فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران سال یازدهم ■ شماره ٤ ■ زمستان ١٤٠٢ ■ شماره پیاپی ٤٤

تشخیص تعداد زیادی از گونه‌های ماهی تجاری را دارند؛ در حالی که کیت‌های متعلق به نرم تنان، فقط امکان تشخیص حلزون و صدف را فراهم می‌سازند.

شرکت‌های تولید کننده کیت‌های سخت پوستان گزارش داده‌اند که کیت‌ها در مقابل سوسک‌ها واکنش متقابلی نسبت به سایر سخت پوستان دارند. این مشکل به دلیل همولوژی ترپومیوزین در بین گونه‌های سخت پوستان است. احتمال آلودگی این حشرات در محصولات در طول دوره رشد، برداشت، حمل و نقل و ذخیره‌سازی وجود دارد که باید برنامه‌ریزی‌های دقیقی برای به حداقل رساندن آلودگی‌ها در کارخانه‌های تولیدی و آزمایشگاه‌ها اعمال شود. شرکت‌ها، کیت‌های متفاوت‌تری را به‌منظور جلوگیری از آلودگی در حین حمل و نقل برای استفاده توصیه می‌کنند. به‌منظور آماده‌سازی و چگونگی واکنش‌دهی و تکثیر این گروه از کیت‌ها، ابزارهای جداگانه‌ای استفاده می‌شود. این کیت‌ها در سیستم PCR موجب اختلال در استخراج DNA در خارج از سیستم اختصاصی می‌شوند. همچنین این کیت‌ها دارای d UPT به جای روابط بین ساختاری TP به‌منظور جلوگیری از آلودگی حامل محصولات PCR هستند که موجب به حداقل رسانی خطاها در سنجش می‌شود. بسیاری از مراکز تخصصی تشخیص دهنده آلرژن‌هایی غذایی براساس موارد گفته شده آنالیزهای لازم را انجام می‌دهند.

نتیجه‌گیری

تشخیص آلرژن‌ها در مواد غذایی و محصولات فرآوری شده می‌تواند به علت تنوع ویژگی‌های مواد غذایی و تنوع روش‌های تولید، عاملی بسیار چالش برانگیز باشد. روش‌های معرفی شده مبتنی بر DNA مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. سنجش‌های مبتنی بر DNA با هدف قرار دادن پروتئین‌ها به‌عنوان نشانگری برای تشخیص عوامل حساسیت‌زا ثابت کرده‌اند که روش‌های مفیدی هستند؛ به‌خصوص با توجه به قوانین اعمال شده، آلرژن‌ها و مواد غذایی مانند سویا، بادام زمینی، گردو برچسب‌گذاری شده روی محصولات با استفاده از این روش‌ها سنجش می‌شوند. سنجش‌های مبتنی بر DNA نه تنها می‌توانند برای تایید نتایج الایزا مورد استفاده قرار گیرند، بلکه می‌توانند برای تشخیص آلرژن‌های غذایی که هیچ روش ایمنی برای دسترسی به آنها وجود ندارد، استفاده شوند. همچنین PCR و Real-time PCR می‌تواند در تشخیص و شناسایی گونه‌های مختلفی از آلرژن‌ها در مواد غذایی مانند ماهی‌ها که در آنها، دسترسی به روش‌های الایزا پیچیده است، مفید باشند. در آینده نزدیک، امکان دارد که سنجش‌های مبتنی بر DNA، بیشتر مورد استفاده قرار گیرند، زیرا توسعه این روش‌ها ساده است و قابلیت غربالگری نیز دارند. بنابراین، روش‌های مبتنی بر DNA نیز برای تجزیه و تحلیل با توان بالا و به علت قابلیت‌های غربالگری اجزای آلرژی‌زا مناسب هستند.

پی‌نوشت

1. The polymerase chain reaction (PCR)
2. A real-time polymerase chain reaction (Real time PCR)
3. HACCP
4. Analytical methods to detect food allergen and gluten
5. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
6. Lateral flow devices (LFDs)
7. Genetically modified organisms (GMOs)
8. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)
9. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism
10. The Bfal restriction enzyme
11. High Performance Liquid chromatography (HPLC)
12. Multiplexing
13. Peptide nucleic acid (PNA)
14. Sure Food PREP Allergen
15. Longo

مرجع

[1] Sicherer SH, Sampson HA. 9. Food allergy. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(2 SUPPL. 2):470–5.

[2] Catassi C, Fasano A. Celiac disease. Curr Opin Gastroenterol. 2008;24(6):687–91.

[3] Amigo MC, Pöpping B. Real-time PCR analysis of food allergens and gluten. InReal-time PCR in food science: Current technology and applications 2013 (pp. 239-252). Caister Academic Press.

[4] Brzezinski A, Modiano E. Dynamic reconfiguration and routing algorithms for IP-over-WDM networks with stochastic traffic. J Light Technol. 2005;23(10):3188–205.

[5] Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, et al. Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. Cell Metab. 2007;6(1):55–68.

[6] Organizational Commitment. Work Orientations. 2019. p. 124–46.

[7] Germini A, Rossi S, Zanetti A, Corradini R, Fogher C, Marchelli R. Development of a peptide nucleic acid array platform for the detection of genetically modified organisms in food. J Agric Food Chem. 2005;53(10):3958–62.

[8] Marian B. Military logistics versus civil logistics – similarities and differences. 2019;(5):0–2.

[9] Houhoula D, Koussissis S, Lougovois V, Tsaknis J, Kassavita D, Papatheodorou S, et al. Detection of Peanut Allergen Traces with a Real Time PCR Assay - The Challenge to Protect Food-Allergic Consumers. J Food Res. 2017;7(1):32.

[10] Caffaz S, Bettazzi E, Scaglione D, Lubello C. An integrated approach in a municipal WWTP: Anaerobic codigestion of sludge with organic waste and nutrient removal from supernatant. Water Sci Technol. 2008;58(3):669–76.

[11] Rossi F, van Beek P, Walsh T. Handbook of Constraint Programming Introduction. Handb Constraint Program. 2006;1–955.

[12] Ditzen B, Schaer M, Gabriel B, Bodenmann G, Ehlert U, Heinrichs M. Intranasal Oxytocin Increases Positive Communication and Reduces Cortisol Levels During Couple Conflict. Biol Psychiatry. 2009;65(9):728–31.

[13] Bell, Thorsten; Urhahne, Detlef; Schanze;Sascha & Ploetzner R. technology To cite this version : r P Fo r R w On ly. 2011;27(02):146–68.

[14] Holck AL, Diaz-amigo C, Kerbach S, Popping B. 9 . Detection of allergens in food. Vol. 661. 2011. 173–210 p.

[15] Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, et al. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: A circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. J Neurosci. 2007;27(22):5903–14.

[16] Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey KJ, et al. LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. J Pharmacol Exp Ther. 1998;284(1):291–7.

[17] Brzezinski A, Vangel MG, Wurtman RJ, Norrie G, Zhdanova I, Ben-Shushan A, et al. Effects of exogenous melatonin on sleep: A meta-analysis. Sleep Med Rev. 2005;9(1):41–50.

[18] Penny WD, Stephan KE, Mechelli A, Friston KJ. Modelling functional integration: A comparison of structural equation and dynamic causal models. Neuroimage. 2004;23(SUPPL. 1).

[19] Mustorp S, Engdahl-Axelsson C, Svensson U, Holck A. Detection of celery (Apium graveolens), mustard (Sinapis alba, Brassica juncea, Brassica nigra) and sesame (Sesamum indicum) in food by real-time PCR. Eur Food Res Technol. 2008;226(4):771–8.

[20] Gryson N, Messens K, Dewettinck K. PCR detection of soy ingredients in bread. Eur Food Res Technol. 2008;227(2):345–51.

[21] Murray EA, O'Doherty JP, Schoenbaum G. What we know and do not know about the functions of the orbitofrontal cortex after 20 years of cross-species studies. J Neurosci. 2007;27(31):8166–9.

[22] Bergerová E, Godálová Z, Siekel P. Combined effects of temperature, pressure and low pH on the amplification of DNA of plant derived foods. Czech J Food Sci. 2011;29(4):337–45.

[23] Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. 2007;25(6):681–6.

[24] Luber F, Demmel A, Pankofer K, Busch U, Engel KH. Simultaneous quantification of the food allergens soy bean, celery, white mustard and brown mustard via combination of tetraplex real-time PCR and standard addition. Food Control. 2015;47:246–53.

[25] Di Pinto A, Forte V, Guastadisegni MC, Martino C, Schena FP, Tantillo G. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. Food control. 2007; 18 (1):76-80.

[26] Tengel C, Schüßler P, Setzke E, Balles J, Sprenger-Haußels M. PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. Biotechniques. 2001;31(2):426–9.

[27] Synthesis A. 3 , 3 0 -Diaryl-BINOL Phosphoric Acids as Enantioselective Extractants of Benzylic Primary Amines. 2011;43(March 2010):34–43.

[28] Bordoni R, Germini A, Mezzelani A, Marchelli R, De Bellis G. A microarray platform for parallel detection of five transgenic events in foods: A combined polymerase chain reaction-ligation detection reaction-universal array method. J Agric Food Chem. 2005;53(4):912–8.

[29] Chisholm J, Conyers C, Booth C, Lawley W, Hird H. The detection of horse and donkey using real-time PCR. Meat Sci. 2005;70(4):727–32.

[30] Scaravelli E, Brohée M, Marchelli R, Van Hengel AJ. Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products. Eur Food Res Technol. 2008;227(3):857–69.

[31] D'Andrea M, Coïsson JD, Locatelli M, Garino C, Cereti E, Arlorio M. Validating allergen coding genes (Cor a 1, Cor a 8, Cor a 14) as target sequences for hazelnut detection via Real-Time PCR. Food Chem. 2011;124(3):1164–71.

[32] Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for Trypanosoma cruzi detection in blood samples. Acta Trop. 2007;103(3):195–200.

[33] Goy G, Croxatto A, Posfay-Barbe KM, Gervaix A, Greub G. Development of a real-time PCR for the specific detection of Waddlia chondrophila in clinical samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(12):1483–6.

[34] Kryvinska N, Olexova R, Dohmen P, Strauss C. The S-D logic phenomenon-conceptualization and systematization by reviewing the literature of a decade(2004–2013). J Serv Sci Res. 2013;5(1):35–94.

[35] Kamiya M, Sekino H, Tsuneda T, Hirao K. Nonlinear optical property calculations by the long-range-corrected coupled-perturbed Kohn-Sham method. J Chem Phys. 2005;122(23):1–10.

[36] Weickert CS, Hyde TM, Lipska BK, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. Mol Psychiatry. 2003;8(6):592–610.

[37] Ma JF, Yamaji N, Mitani N, Tamai K, Konishi S, Fujiwara T, et al. An efflux transporter of silicon in rice. Nature. 2007;448(7150):209–12.

[38] Frew PM, Bernhardt JM. From the Schools of Public Health. Public Health Rep. 2005;120(5):576–8.

[39] Teutenberg T, Tuerk J, Holzhauser M, Kiffmeyer TK. Evaluation of column bleed by using an ultraviolet and a charged aerosol detector coupled to a high-temperature liquid chromatographic system. J Chromatogr A. 2006;1119(1–2):197–201.

[40] Brezna B, Kweon O, Stingley RL, Freeman JP, Khan AA, Polek B, et al. Molecular characterization of cytochrome P450 genes in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading Mycobacterium vanbaalenii PYR-1. Appl Microbiol Biotechnol. 2006;71(4):522–32.

[41] Jung M, Reichstein M, Ciais P, Seneviratne SI, Sheffield J, Goulden ML, et al. Recent decline in the global land evapotranspiration trend due to limited moisture supply. Nature. 2010;467(7318):951–4.

[42] Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol. 1997;63(10):3741–51.

[43] Savoca PE, Longo WE, Zucker KA, McMillen MM, Modlin IM. The increasing prevalence of acalculous cholecystitis in outpatients: Results of a 7-year study. Ann Surg. 1990;211(4):433–7.

[44] Godálová Z, Bergerová E, Siekel P. Effect of high temperature and pressure on quantification of MON 810 maize. Czech J Food Sci. 2013;31(4):376–81.

[45] Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. Nat Med. 2006;12(4):446–51.

[46] Chiba M, Tsuneda T, Hirao K. Excited state geometry optimizations by analytical energy gradient of long-range corrected time-dependent density functional theory. J Chem Phys. 2006;124(14):1–11.

[47] Yassin AF, Young CC, Lai W, Hupfer H, Arun AB, Shen F, et al. Williamsia serinedens sp . nov ., isolated from an oil-contaminated soil. 2007;558–61.

[48] Lau MP, Sander M, Gelbrecht J, Hupfer M. Solid phases as important electron acceptors in freshwater organic sediments. Biogeochemistry. 2015; 123:49-61.

[49] Watanabe S, Minegishi Y, Yoshinaga T, Aoyama J, Tsukamoto K. A Quick Method for Species Identification of Japanese Eel (Anguilla japonica) Using Real-Time PCR : An Onboard Application for Use During Sampling Surveys. 2005;566–74.

No.44 ■ Winter 2024 ■ Issue 4 ■ Volume 11
Iranian Journal of Laboratory Knowledge

Authors

Abbas Abedfar[1*]
Ehda Nourizadeh[2]

*a.abedfar@guilan.ac.ir

1. Department of Food Science and Technology, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Master of student, University of Guilan, Rasht, Iran

Real-time PCR Analysis of Food Allergens and Gluten

Abstract

Food allergens, responsible for IgE-mediated allergic responses and listed in European, North American and Japanese regulation, are exclusively proteins and are ideally detected by analytical methods targeting either peptides or proteins.

However, in some cases where no suitable methods for proteins exist or as an alternative method to substantiate results from protein-based methods, DNA-targeting methods can be used as indicators of the presence of potentially allergenic proteins. The advantage of DNA-targeting methods like PCR, real-time PCR is presently the lower cost and availability of free literature on several detection systems, including a certain degree of multiplexing. Clear disadvantages include the poor sensitivity for egg, milk and samples containing inhibitors (like polyphenols in chocolate) as well as its limited applicability in some industrial protein concentrates. In addition, if quantitative results need to be obtained, the DNA-based system needs to be calibrated for each matrix tested, as protein-to-DNA composition is typically matrix specific. However, PCR based methods are well established in many laboratories and still regularly used. This chapter discusses suitable systems for detection of DNA of ingredients and foods containing allergenic proteins, potential pitfalls and multiplex capabilities of such systems.

Keywords

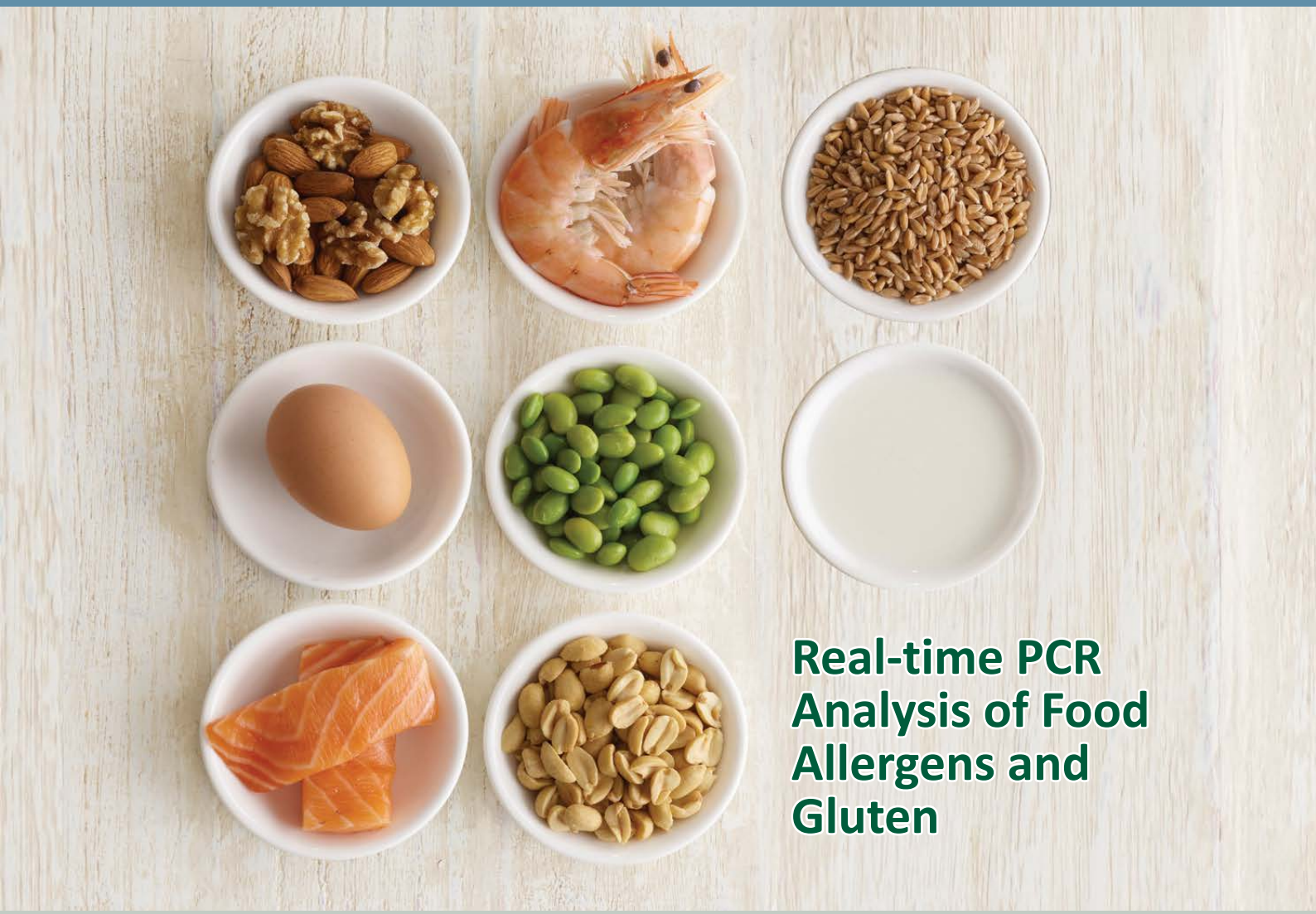
Real-time PCR technique, Detection of food allergens, Fraud detection, Antibiotic diagnosis, Pathogenic microorganisms.

Iran Nanotechnology Laboratory Network

Iranian Journal of laboratory Knowledge

ISSN 2538-3450

Volume 11 ■ Issue 4 ■ Winter 2024 ■ No.44



Real-time PCR Analysis of Food Allergens and Gluten

Defining 'Performance' in Asset Performance Management

Estimation of Remaining Life of ASTM A106 Grade B Steel Pipes Used in Refinery Industries

Examination and Simulation of Failure Analysis in 90-Degree Elbow Joints

Quantification of the composition of liquid hydrocarbon streams: Comparing the GC-VUV to DHA and GCxGC

Introducing the isotope ratio mass spectrometer and the application of stable isotopes in tracing and controlling the authenticity of food

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir