



Notat

Dokumentationskrav til fødevarekvalitet, kemi og sensorik

Implementering af multimetode (LC-MS/MS) til analyse af allergener i fødevarer

25. marts 2019
Proj.nr. 2007081
Version 1
Init. KIJ/MT

Resume

En multimetode til detektion af fødevareallergener er afprøvet i to forskellige fødevarematricer, bagværk og kød, tilsat en blanding af allergener. Forud for analysearbejdet er der udarbejdet en effektiv procedure for oprensning af allergener (proteiner).

Metoden er baseret på en kommercielt tilgængelig protokol fra Sciex, der er sammenlignet med en alternativ protokol fra Waters. Begge protokoller er fundet anvendelige.

Detektion og linearitet, der er en forudsætning for korrekt kvantificering, er undersøgt. Der er desuden evalueret på kromatografi, respons på massespektrometeret, optimale transitioner, og hvorvidt peptiderne er unikke til de enkelte proteiner/allergener (databasesøgning). Repeterbarhed for detektion af de udvalgte peptider er evalueret. Desuden er mulighederne for at implementere isotopmærkede peptidanaloger til kvantificering af proteiner undersøgt, hvilket vil styrke robustheden af analysemetoden, når forskellige komplekse matricetyper skal analyseres.

Det grundlæggende udviklingsarbejde er afsluttet, og det er konkluderet, at metoden kan anvendes kvantitativt, illustreret ved peanutallergenet Ara h1. På baggrund heraf kan metoden videreudvikles til kvantificering af andre allergener i henhold til EU's mærkningsordning (Allergenlisten). Akkreditering af metoden, til brug i fx retslige sammenhænge, vil kræve yderligere dokumentation i forhold til lovgivningen.

Baggrund

Kravene til dokumentation af fødevarekvalitet skærpes fra markeder og myndigheder. Indsigt i den nyeste viden på området er derfor nødvendig, ligesom opretholdelse af en praktisk tilgang til analysemetoder baseret på nyere teknologier er afgørende.

Et emne med stor bevågenhed er fødevareallergi, hvor antallet af diagnosticerede personer er fordoblet inden for de sidste 10 år.

Analyse af fødevareallergener er i dag primært baseret på ELISA-metoder (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) og PCR (Polymerase Chain Reaction), der er billige, hurtige og simple. Ved forarbejdningen af fødevarer indgår der imidlertid ofte en opvarmning af produktet, der medfører ændringer i dele af proteinets struktur. Dette kan medføre falsk negative resultater og derved en underestimering af allergenerne i forarbejdede produkter. Metoderne analyserer for ét allergen ad gangen, hvorfor en evt. helhedsvurdering af produktet vil være flere, trinvis analyser.

Baseret på en litteraturgennemgang af velegnede metoder til analyse af allergifremkaldende ingredienser er der fokuseret på en ny teknologi inden for massespektrometri (LC-MS/MS). Metoden er meget selektiv og præcis og kan dokumentere indholdsstoffer i meget lave koncentrationer. Da alle analyserede allergener er proteiner, er brugen af multimetode oplagt. Der er taget udgangspunkt i afprøvning af en kommercielt tilgængelig protokol til analyse af bagværk, suppleret med forarbejdet kød, der kan betragtes som en meget kompleks biologisk matrice.

Prøvemateriale

Materialer og metoder

Proteiner blev ekstraheret fra chokoladekiks indeholdende allergener fra æg og mælk, samt fra 3 forskellige kødmatricer, henholdsvis fedt, magert og saltet kødprodukt. Kødprodukterne blev spiket med en blanding bestående af 10 fødevareallergener (peanut, soja, pinjekerne, mandel, para-, pistacie-, cashew-, hassel- og valnød). Ekstraktionsproceduren, samt videre prøveforberedelse inden LC-MS/MS-analyse baseret på Sciex- og Waters-protokoller, er beskrevet i bilag 1. Waters-protokol er ikke designet til allergenanalyse og er alene testet til klargøring af ekstraherede proteiner inden LC-MS/MS-analyse.

Protokol og software

Der er taget udgangspunkt i en kommercielt tilgængelig protokol fra Sciex til analyse af 12 udvalgte allergener i bagværk. I protokollen fra Sciex er der ikke angivet specifikt, hvilke proteiner der er målet (target). Disse er i nærværende projektet identificeret ved beregning og litteratursøgning. Identifikation har været nødvendig for at kunne øge antallet af transitioner til specificitet, ikke mindst ved modificering af metoden, samt for at sikre proteinspecificitet for allergenet (på det målte peptid). Der er i protokollen angivet 2 transitioner pr. peptid. Dette er udvidet til 3-4 transitioner pr. peptid for at opnå en mere eksakt identifikation af peptider til allergenidentifikation. Der blev anvendt Skyline-software til udvælgelse af peptider og transitioner. Skyline blev installeret og sat op til videre

metodeoptimering ved installation af biblioteker over massespektre samt baggrundsproteomer.

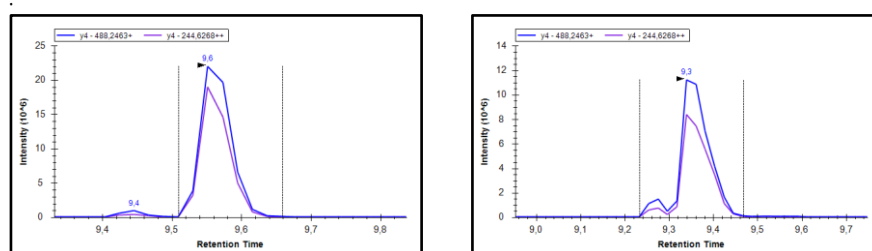
Analyseudstyr

Prøverne blev analyseret på AB Sciex QTRAP 6500 (LC-MS/MS), sammensat af en Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) og et tripel-quadrupol massespektrometer (MS/MS).

Sciex- versus Waters-protokol

Analyseresultater

Både Sciex- og Waters-protokollerne fungerede til analyse af allergener i de undersøgte matricer. Eksempler på kromatogrammer på et udvalgt peptid for mælk (alpha-S1-kasein, peptid EDVPSER) er vist i nedenstående figurer, med henholdsvis Sciex (venstre)- og Waterprotokol (højre) til prøveforberedelse.



Figur 1. Kromatogrammer af peptid (EDVPSER) fra mælk (alpha-S1-kasein)

Fordelen ved Sciex-protokollen er fleksibilitet, da reagenser fremstilles lokalt i laboratoriet. Ved anvendelse af Sciex-protokollen kan volumen og prøvemængde let modificeres. Dette er en begrænsning ved Waters-protokollen, der anvender 96-brønds-format. Der ses ved anvendelse af Waters-protokollen lavere respons ved det endelige peptidekstrakt, da der anvendes mindre prøvemateriale. Dette kan på sigt give problemer, hvis der stilles krav til lav detektionsgrænse for allergener i fødevarer. Det drejer sig om ca. en halvering i signal, jf. figur 1, så det er ikke kritisk for analysen, hvilken protokol der anvendes. Ved lavere prøveantal på fx 8-12 prøver er Sciex-protokollen mere brugervenlig. En fordel ved Waters-protokollen er et egentligt SPE-oprensningstrin inden LC-MS/MS-analyse. Det er sandsynligvis muligt at kombinere online SPE-oprensningstrin med Sciex-protokollen for at opnå renere peptidekstrakt og reducere den manuelle prøveforberedelse inden analyse.

Det anvendte LC-MS/MS-udstyr måler peptider i lavere koncentration end foreskrevet i Sciex-protokollen. Dette er en fordel, når metoden er færdigimplementeret i laboratoriet og skal anvendes til detektion af allergener i fødevarer.

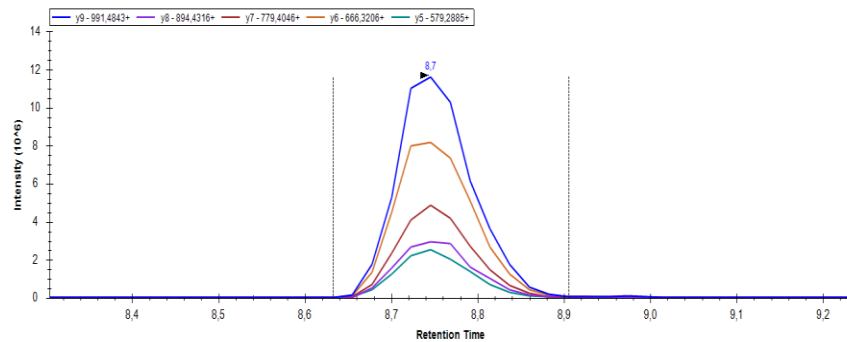
Linearitet, identifikation og kromatografi

Linearitet og identifikation er undersøgt for et specifikt peptid, i koncentrationsområdet 0,9-15 mg/g. Der blev opnået en korrelationskoefficient på ca. 0,995, og kromatograferingen gav en sikker identifikation, set i forhold til retentionstid og forholdet mellem transitionerne for kontrolprøver.

Kromatografi, respons samt optimale transitioner

Peptiderne udvælges og vurderes på baggrund af respons, stabilitet og kromatografering ved en LC-MS/MS-analyse.

I figur 2 vises kromatografering af et peptid, der er vurderet ud fra, om toppen er entydig, og om transitionerne ligger ensartet under hinanden, hvilket underbygger identificeringen af peptidet. De fire mest sikre transitioner udvælges.



Figur 2. Kromatografering af peptidet R.EGEPDLSNFGK.L

Unikke peptider (selektivitet)

Ved udvælgelse af et unikt peptid for et allergen er aminosyresekvensen afgørende. I databasen UniProt findes der informationer om de enkelte proteiner og peptider. Med funktionen BLAST gennemgås databasens peptider, og det bedømmes, hvorvidt peptiderne er unikke til de enkelte proteiner/allergener (% match). Et dårligt match kan medføre et falsk positivt resultat. Identifikation af proteinet kan sikres ved at udvælge minimum 2 unikke peptider pr. protein.

Repetierbarhed

Repetierbarheden for detektion af udvalgte peptider blev evalueret på en prøve tilsat blandingen med 10 forskellige allergener. Ekstraktion og forbehandling blev gentaget 5 gange, og desuden blev ekstraktet injiceret 2 gange. For hovedparten af peptiderne var der ikke signifikant forskel mellem første og anden injektion. Forskellen mellem de 5 gentagelser var ikke entydig og bør gentages, hvis der er behov for en mere korrekt vurdering af repetierbarheden.

Isotopmærkede peptid-analoger

Mulighederne for at implementere isotopmærkede peptidanaloger til kvantificering af proteiner er undersøgt, hvilket vil styrke robustheden af analysemetoden, når forskellige komplekse matricetyper skal analyseres.

Der foreslås anvendelse af 2H- og 13C-mærkede peptider, PSAQ-standarde (mærkede proteiner) eller concatamerer (QconCAT, kunstige proteiner designet ud fra target-peptider) til kvantitativ måling på LC-MS/MS. SpikeTides™ (intern standard) samt SpikeTides™ TQL (intern standard til kvantificering) vil ydermere hjælpe til korrekt identifikation (specificitet) af peptider.

Konklusion

Multimetode (LC-MS/MS) til analyse af udvalgte allergifremkaldende komponenter i komplekse biologiske matricer er afprøvet. Metoden kan anvendes kvantitativt, illustreret ved peanutallergenet Ara h1. På baggrund heraf kan metoden videreudvikles som et hurtigt og sikkert dokumentationsværktøj til kvantificering af andre allergener i henhold til EU's mærkningsordning (Allergenlisten). Akkreditering af metoden, til brug i fx retslige sammenhænge, vil kræve yderligere dokumentation i forhold til lovgivningen.

Henvisninger

Materiale i forbindelse med datahåndtering, planer m.m., findes i Y:\Lab-space\LABM3_Labspace\Allergens-Screen.

RUO-MKT-08-3515-B (April 2016) Sciex Method application: For multiple screening in food matrices using LC-MS/MS.

ProteinWorks – Waters 2018. Reproducible and Standardized Protein Quantification with a Simplified Kit-Based Approach.

http://www.waters.com/waters/en_IL/ProteinWorks-eXpress-Digest-Kits/nav.htm?cid=134857789&locale=en_IL

Kvantificering af ara h1 på LC-MS/MS i komplekse matricer. Charlotte Stork Thy. Afgangprojekt laboranteksamen.

Allergener. Dokumentationskrav til fødevarekvalitet, kemi og sensorik. Statusrapport 2017 (RUB).

Bilag 1. Fremstilling af reagenser

	Reagenser	Fremstilling	Holdbarhed
1	Acetone	-	-
2	Ekstraktionsbuffer (til 20 prøver)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bland 0,6057 g Tris og 12,0120 g Urea i et bægerglas. 2. Tilføj 25 mL MilliQ og bland, til det er opløst. 	Fremstilles på dagen
3	Denatureringsopløsning	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bland 1,0 g OGS med 4,0 mL MilliQ. 2. Ryst omhyggeligt for ikke at lave bobler i opløsningen. 	
4	Reduceringsopløsning	50 mM Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP). 16,35 mg tris i 1 mL H ₂ O.	
5	Cystine-bloking reagent	Bland 280 µL ammonium bicarbonat (0,1581 g opløst med 20 mL MilliQ) med 280 µL 200 mM stock MMTS (dæk med stanniol, da den er lysfølsom).	
6	Digestionbuffer	<ol style="list-style-type: none"> 1. 79,1 mg ammoniumbicarbonate i 10 mL H₂O (rækker til 10 prøver). 2. Calciumchloridopløsning (1 M) 0,555 g opløses i 5 mL H₂O. 3. 7,96 mL 100 mM ammoniumbicarbonatbuffer + 40 µL 1 M calciumchloridopløsning, V_{tot} = 8 mL 	Fremstilles på dagen
7	Trypsinopløsning	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tilføj 500 µL MilliQ til 500 µg trypsin. 2. Mix forsigtigt på en Vortexmikser. 3. Centrifuger, indtil hele opløsningen er samlet/accumulated i bunden. 	
8	Myresyre	-	-

BILAG 2. FORBEHANDLING AF PRØVE

DAG 0 - HOMOGENISER PRØVEN

1. Afvej 1 g prøve i et 10 mL centrifugerør.

DAG 1 - FJERN LIPIDER FRA PRØVEN

1. Tilføj 7,5 mL acetone (1) til hvert rør.
2. Sæt prøverne på ultralydsbadet og omryst på Vortexmikseren hver 5. minut i 15 minutter.
3. Centrifuger derefter prøven ved 4000 x g i 20 min.
4. Udtag supernatanten.
5. Gentag trin 1-3 to gange, fratag supernatanten og smid ud.
6. Tør prøven ved et blidt flow nitrogen uden varme, evt. på inddampningsanlæg.
7. Når prøverne er helt tørre, rystes prøven kraftigt på Vortexmikser, så resten løsner sig.

Hvis x g funktionen ikke findes på centrifugen kan følgende formel bruges:

$$RPM = \sqrt{\frac{x \text{ g}}{\text{radius af centrifugen i cm} \times (1,118 \times 10^{-5})}}$$

EKSTRAHER PROTEIN FRA PRØVERNE

1. Tilføj 3,8 mL ekstraktionsbuffer (2) og 200 µL denatureringsopløsning (3).
2. Ryst kraftigt på Vortexmikser for at homogenisere prøven.
3. Mix prøverne i 60 minutter på et rystebord.
4. Centrifuger prøverne ved 4000 x g i 30 min.
5. Overfør 1,2 mL i et 2 mL mikro-centrifugerør og centrifuger ved 12.000 x g i 8 min.
6. Udtag 500 µL af supernatanten i et 2 mL mikro-centrifugerør.

DAG 2 - REDUCERING

1. Tilføj 50 µL reduceringsopløsning (4) til hver prøve.
2. Mix forsigtigt på Vortexmikser.
3. Inkuber ved 60°C, med omrystning på 1000 rpm, i 1 time på termomixeren.

ALKYLERING

1. Nedkøl prøverne til stuetemperatur.
2. Tilføj 25 µL cysteine-blocking reagent (5)
3. Mix forsigtigt på Vortexmikser.
4. Inkuber prøverne i 15 min. ved stuetemperatur.

NEDBRYDNING

1. Tilføj 425 µL digestionbuffer (6).
2. Tilføj 20 µL trypsinopløsning (7).
3. Mix forsigtigt på Vortexmikser.
4. Inkuber prøverne ved 37°C i 16-17 timer, med omrystning på 300 rpm.
5. Tilføj 30 µL myresyre (8) for at stoppe processen.
6. Mix prøverne på Vortexmikser.
7. Centrifuger prøverne ved 12.000 x g i 8 min.
8. Overfør 400 µL af supernatanten til et 10 kDa MWCO filter.
9. Centrifuger ved 12.000 x g i 20 min.
10. Overfør 200 µL af filtratet til 250 µL HPLC vial, til LC-MS/MS-analyse.
11. Prøverne kan fryses ned ved -20°C til efterfølgende analyse.