

# DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Molekuláris biológiai módszerek fejlesztése gluténmentesség  
ellenőrzésére

*Némedi Erzsébet*

Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

Budapest

2009

# **TARTALOMJEGYZÉK**

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
1. BEVEZETÉS .....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	9
2.1. Cöliákia és gabona allergia.....	9
2.2. Búza és vele keresztreakciót mutató egyéb gabonafélék.....	12
2.2.1. Gabonafehérjék szerepe .....	13
2.2.2. Genetikai összefüggések.....	16
2.3. Búzával keresztreakciót nem mutató gabonafélék és pszeudocereáliák .....	18
2.4. Az élelmiszer-allergének jelölésére vonatkozó törvényi szabályozás.....	20
2.5. Glutén szennyezettség kimutatása .....	23
2.5.1. Immunanalitikai módszerek és az ezekkel kapcsolatos tapasztalatok .....	24
2.5.2. DNS-alapú technikák és az ezekkel kapcsolatos tapasztalatok .....	26
2.5.2.1. PCR alapú technikák .....	27
2.5.2.2. Egyéb nukleinsav alapú, illetve PCR termék alapú módszerek.....	32
2.5.2.3. A DNS alapú allergén kimutatási módszerek kialakulása és fejlődése .....	33
3. CÉLKITŰZÉSEK .....	36
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	37
4.1. Minták.....	37
4.1.1. Módszerek beállításához használt minták.....	37
4.1.1.1. Búzafajták és belőlük készült hőkezelt minták .....	37
4.1.1.2. Búzával keresztreakáló gabonafélék és pszeudocereáliák .....	38
4.1.2. Sütőipari technológia ellenőrzése során vett minták .....	40
4.1.3. Kísérleti fázisban lévő gluténmentes termék mintái.....	42
4.2. Oldatok és reagensek .....	42
4.2.1. DNS-izolálás reagensei .....	42
4.2.2. PCR reakció reagensei .....	43
4.2.3. Gélelektroforézis reagensei.....	44
4.2.4. PCR-RFLP vizsgálat reagensei.....	45
4.3. Műszerek .....	45
4.4. Alkalmazott módszerek .....	46
4.4.1. DNS izolálás lépései .....	46
4.4.2. A tisztított DNS oldatok jellemzése.....	47
4.4.3. DNS sokszorozás .....	47

4.4.4. Alkalmazott PCR-RFLP analízis lépései.....	50
4.4.5. Termékanalízis lépései.....	51
5. KUTATÁSI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....	53
5.1. DNS tisztasága és sokszorozhatósága .....	53
5.1.1. Hőkezelt minták DNS-ének töredezettség vizsgálata.....	53
5.1.2. Abszorbancia értékek alapján meghatározott DNS tisztaság .....	54
5.1.3. Növény-specifikus kloroplasztisz primer pár segítségével meghatározott DNS eredet és sokszorozhatóság.....	58
5.1.3.1. Növény-specifikus módszer optimalizálása a minta-típusokra.....	58
5.1.3.2. DNS-ek növényi eredetének és sokszorozhatóságának ellenőrzése növény-specifikus kloroplasztisz primer párral.....	61
5.2. Alkalmazott módszerek optimalizálása.....	64
5.2.1. TRO1/TRO2 primer páron alapuló módszer optimalizálása.....	65
5.2.2. P1/P2 primer páron alapuló módszer optimalizálása .....	67
5.2.3. WBR11/WBR13 primer páron alapuló módszer optimalizálása.....	69
5.2.3.1. PCR-RFLP vizsgálat optimalizálása.....	71
5.3. A primer párok alkalmazhatósága specifikus DNS szekvenciák kimutatására és megkülönböztetésére .....	72
5.3.1. TR01/TR02 primer párral végzett kimutatás eredményei .....	72
5.3.2. P1/P2 primer párral végzett kimutatás eredményei .....	73
5.3.3. WBR11/WBR13 primer párral végzett kimutatás eredményei .....	75
5.3.3.1. PCR-RFLP vizsgálat eredményei .....	77
5.4. Gyakorlati alkalmazások .....	78
5.4.1. Gluténmentes sütőipari technológia kritikus kontroll pontjainak meghatározása .....	78
5.4.1.1. Kísérleti beállítások és a mintavételezés módszere .....	81
5.4.1.2. Sütőipari mintákból származó DNS sokszorozása során kapott eredmények .....	84
5.4.2. Gluténmentes sárgaborsóból készített tészta vizsgálata .....	90
6. ÖSSZEGZÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK .....	94
6.1. Új eredmények.....	100
7. TOVÁBBI JAVASLATOK.....	102
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	103
9. SUMMARY .....	106
10. MELLÉKLETEK.....	109
M1. Irodalomjegyzék.....	109

M2. Adatbázisban megtalálható szekvencia-információk.....	122
M3. Aktuális törvénymódosulások.....	129
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	132

## JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>bp</b>	Base pair Bázispár
<b>CTAB</b>	Cetyl trimethylammonium bromide Cetil-trimetil-ammónium-bromid
<b>dNTP</b>	di-Nukleotid-Tri-Foszfát
<b>EDTA</b>	Ethylene diamine tetracetic acid Etilén-diamin-tetraecetsav
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunosorbent assay Szilárdfázisú enzimjelzéses immunoanalitikai eljárás
<b>GMO</b>	Genetically Modified Organism Genetikailag módosított szervezet
<b>GMP</b>	Good Manufacturing Practice Jó Gyártási Gyakorlat
<b>HACCP</b>	Hazard Analysis of Critical Control Points Veszély Elemzés Kritikus Ellenőrzési Pontoknál
<b>HLA</b>	Human leucocyte antigen Humán leukocita antigén
<b>HMW</b>	High Molecular Weight Nagy molekula tömeg jelzője fehérjék esetében
<b>IgA</b>	Immunoglobulin A típusú ellenanyag
<b>IgE</b>	Immunoglobulin E típusú ellenanyag
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G típusú ellenanyag
<b>LMW</b>	Low Molecular Weight Alacsony molekula tömeg jelzője fehérjék esetében
<b>Mab</b>	Monoclonal antibody Monoklonális antitest
<b>PAGE</b>	Polyacrialmide gel electrophoresis Poliakrilamid-gél elektroforézis
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction Polimeráz láncreakció
<b>R5</b>	Monoklonális ellenanyag, mely a gliadinokhoz,

	szekalinokhoz és a hordeinekhez kötődik
<b>RAPD</b>	Random Amplification of Polymorphic DNA Polimorfikus DNS véletlenszerű sokszorozása
<b>RFLP</b>	Restriction fragment length polimorfism Restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate Nátrium-lauril-szulfát
<b>SSR</b>	Simple Sequence Repeat Eukarióták DNS-ében található rövid ismétlődő szekvenciák
<b>TBE</b>	Trisz-bórsav-EDTA
<b>TE</b>	Trisz-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N,N,-tetrametil-etilén-diamin
<b>TNE</b>	Trisz-Nátrium-EDTA
<b>TRIS</b>	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
<b>TRIS-HCl</b>	Trisz-sósav

# 1. BEVEZETÉS

A gabonafélék a humán táplálkozásban már ősidőktől fogva fontos szerepet töltenek be. Összes energiabevitelünk 50%-át és az összes fehérjebevitelünk 45%-át gabonafélékből fedezzük. A cereáliák azon kívül, hogy fontos vitamin-, ásványi anyag- és komplex szénhidrát-források, élelmi rostokban is rendkívül gazdagok. Közülük ma is az egyik leginkább elterjedt gabonaféle a búza, hiszen lévén egyik legellenállóbb haszonnövény, nagy területeken termesztik világszerte.

Egy szűk embercsoport számára azonban a búza és még néhány rokon gabonaféle fogyasztása súlyos egészségügyi problémák okozójává válhat (EFSA-Q-2003-016, 2004). Bizonyított, hogy a búza, rozs, árpa, tritikálé, esetleg a zab, alkoholban oldható fehérje frakciói, a prolaminok felelősek a bélnyálkahártya bolyhainak deformálódásáért és az ebből adódó felszívódási zavarokért. A betegséget gluténszenzitív enteropathianak, vagy coeliachianak (cöliákia) nevezik. A cöliákia autoimmun betegség, amely egy egész életre szóló „gluténmentes” diétát követel meg a betegektől. Ez a vékonybélben lezajló kóros biokémiai folyamat gyermek- és felnőttkorban egyaránt kialakulhat (Horacsek, 1995), illetve genetikai hajlam esetén megnő az esélye a betegség előfordulásának. Tekintettel arra, hogy a felsorolt cereáliák közül a búzának van a legnagyobb szerepe a humán táplálkozásban, a kutatások túlnyomó része a búza prolaminjára, illetve a gluténre irányul. A glutént, vagyis a búza sikért az alkohol oldható gliadin és a sav- és lúgoldható glutenin alkotja. A búza glutén frakcióján belül a gliadinok és gluteninek egymáshoz viszonyított tömegaránya azonos (1:1).

A zab káros hatása a mai álláspont szerint nem megalapozott, de nem lévén megfelelő bizonyíték az ellenkezőjére, a jelenlegi Codex Alimentarius ajánlások szerint gluténmentes diéta során nem fogyasztható.

A gluténszenzitív enteropathiás betegek teljes értékű életet élhetnek, amennyiben a számukra előírt gluténmentes étrendet megtartják, ami annyit jelent, hogy tartózkodnak mindegyik számukra ártalmas gabonafélétől és származékaiktól. Megfelelő gluténmentes étrenddel nemcsak az akut esetek tünetei szüntethetők meg, hanem megelőzhetők a betegséghez társuló egyéb szövődmények, amelyek közül a legsúlyosabbak a daganatos betegségek (Horacsek, 1995). Jelenleg tisztázatlan a cöliákiások esetében a következmények nélkül elfogyasztható glutén mennyiség, a klinikai tünetek súlyossága és a szövettani eltérések közötti összefüggés. Az egyéni variációk és a klinikai heterogenitás megnehezíti annak megállapítását, hogy gluténmentes étrendben mennyi lehet a nyomokban előforduló glutén mennyisége.

A teljesen gluténmentes termék készítése lenne a cél, de ez csak ideális esetekben valósítható meg. A gyakorlat viszont azt mutatja, hogy itt az abszolút „0 tolerancia” elve nem alkalmazható. Jó

gyártási gyakorlattal (GMP) azonban biztosítani lehet a prolamin-szennyeződés minimálisra csökkentését.

A cöliakiás betegek elkerülhetetlen napi prolamin-bevitelének mennyiségéről a szakemberek is vitatkoznak, de abban egyetértenek, hogy a 10 mg alatti mennyiség az esetek többségénél nem okoz tüneteket. Irodalmi források szerint azonban előfordulnak olyan esetek is, ahol a minimális prolamin mennyiség volt a tünetek okozója (Collin et al., 2004). A prolaminok kimutatására kidolgozott referencia módszer fehérje alapú, és a prolamin extrakció után R5 ellenanyagon alapuló szendvics ELISA technikát alkalmaz. Ez a módszer specifikus a búza, rozs és árpa prolaminra, nincs keresztreakciója zabbal. A módszer érzékenysége 1,5 mg/kg gliadin ([www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)).

A fehérje vizsgálaton alapuló módszerek nem minden esetben működnek megfelelően. Ennek az az oka, hogy az élelmiszerek gyakran tartalmaznak szerkezet-változáson átesett fehérjéket. A feldolgozott, hőkezelt élelmiszereknél a denaturálódott fehérjék kioldhatósága nagymértékben csökken, ezáltal az így kapott eredmény sokszor nem fedti a valóságot. Ilyen esetekben szükség lehet egy olyan kiegészítő vagy előszűrő módszerre, amely komplexebb mátrixból, technológiai behatásoknak kitett élelmiszerekből is kimutatja a szennyeződéseket. Ezen kívül megbízható és reprodukálható, de – legfőképpen – jól kiegészíti és megerősíti az ELISA módszerrel vagy fehérje gyorsesztekkel kapott eredményeket. Ilyen kiegészítő módszer lehet egy DNS alapú molekuláris biológiai módszer, mely a polimeráz láncreakciót (PCR) felhasználva mutatja ki a gabonanyomokat az élelmiszerekből. A DNS a fehérjénél jóval hőstabilabb molekula, ezért jobban ellenáll a feldolgozási technológia során alkalmazott hő- és mechanikai hatásoknak. A gluténmentes élelmiszerek utólagos ellenőrzésénél nagyobb valószínűséggel található meg viszonylag ép DNS, mint nem roncsolódott fehérje. Nagyon fontos megemlíteni, hogy a DNS alapú PCR indirekt módszer, tehát nem fehérjét mutat ki, ezért nem az allergént detektálja közvetlenül, hanem a DNS egy releváns szakaszát. A DNS és a fehérje előfordulásának korrelációjára a feldolgozott élelmiszerek esetében még nincs elég irodalmi bizonyíték, ezért a DNS jelenléte nem minden esetben jelenti azt, hogy maga az allergén is jelen van az élelmiszerben. Bizonyosan csak az állítható, hogy az adott élelmiszer valamikor érintkezett-e, szennyeződött-e a nemkívánatos allergén összetevőkkel (mint például: búzával, vagy egyéb keresztreakáló gabonákkal), amelyek, mint egy „ujjlenyomat”, ott hagyták nyomukat DNS formájában az élelmiszerben. A DNS alapú módszerek ezért kiegészítő, illetve megerősítő vizsgálatokra alkalmasak a fehérje alapú módszerek mellett.

A DNS alapú kutatások azért is indokoltak, mert ideális esetben a „gluténmentes” kifejezés azt jelenti, hogy a termék gyártása során a felsorolt gabonafélék egyike sem került a termékbe és a gyártás és csomagolás során a terméknek a fenti prolaminokkal való szennyeződése is kizárható. Ha a termék bármely összetevőjének eredete nem tisztázott, a termék nem tekinthető biztonságos gluténmentesnek.



## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Cöliákia és gabona allergia

Bizonyos gabonafélék fogyasztása egyes emberekben kóros immunológiai folyamatokat indít el, amelynek következményeként táplálékintolerancia körébe sorolható betegség alakul ki az arra érzékenyeknél. A hasonló tünetek mögött nagyon is különböző immunológiai folyamatok állhatnak, ugyanakkor nagyon változatos tünetek is utalhatnak egyazon a betegségre, ezért a lisztérzékenység (cöliákia, gluténszenzitív enteropátia) régóta a gasztroenterológusok érdeklődésének középpontjában áll. A betegségre az angol irodalomban a „coeliac sprue”, illetve „coeliac disease”, német nyelvterületen az „einheimische Sprue” elnevezést is használják. A sprue szó a flamand eredetű „sprouw” szóból származik, jelentése aphthosus elváltozás. Az első tünetek leírása már több mint kétezer éve megtörtént. Aretaeus (Αρεταίος), a Kappadókiából származó görög orvos, aki Kr. u. II. század végén élt Rómában, és aki sebész és diietetikus gyógyításmódjáról volt híres, adta az első elfogadható leírást a coeliachia nevű jelenségről. A „cöliákia betegség” fogalma Samuel Gee 1888-as publikációjához köthető. Sokáig tisztázatlan volt, hogy vajon mi is okozhatja a megmagyarázhatatlannak tűnő tüneteket. Még maga Gee is bizonytalanul írt erről cikkében, mint ahogy afelől sem volt teljesen bizonyos, hogy a boncolások során megfigyelt „kisimult” bélnyálkahártya általános tünet lenne. A betegség kialakulásában a gabonamagvak és a glutén szerepét 1950-ben Dicke tisztázta. Willem Dicke, a holland gyermekgyógyász ismerte fel és mutatta be egy publikációjában, hogy a búza kihagyása a beteg gyermekek étrendjéből, tünetmentessé teszi őket. Az, hogy hogyan kötötte össze a cöliákiát a búzaliszttel, a mai napig nincs tisztázva, de úgy vélik, hogy a második világháború alatti gabonakészlet ideiglenes hiánya, majd a búza kínálat jelentős növekedése döbbsentette rá Dicke-ot a betegség okára. Jelenlegi ismereteink szerint az intoleranciának ebben a formájában a glutén olyan kóros immunológiai folyamatokat indít be, amelyek végeredményeként a szervezet saját kötőszöveti struktúráját károsító úgynevezett autoantitestek termelődnek, melyek a vékonybél krónikus betegségét (vékonybélbolyhok sorvadását) okozzák. A cöliákia patogenezisében genetikai, környezeti és immunológiai tényezők is szerepet játszanak: a jelenlegi álláspont szerint a kórképet, amelynek lefolyása és aktivitása külső, étkezéssel bevitt fehérjétől függ, autoimmun patomechanizmusú szisztémás betegségnak tekintik. Ezen kívül a cöliákia a genetikailag komplex, poligénes, multifaktoriális betegségek csoportjába tartozik. Jelenleg nem ismerünk olyan kezelési módot, amely a gluténérzékenységet meg tudná szüntetni. A glutén étrendi kiiktatása viszont megállítja a kóros immunológiai folyamatokat, és így a betegség minden tünete elmúlik, a vékonybél-nyálkahártya teljesen normalizálódik, a beteg teljes életet élhet.

Az étrendből a búzát, árpát, rozst, zabot (ez utóbbi gabonának cöliákiás étrendbe iktatása még kérdéses) és származékait teljesen és véglegesen száműzni kell. Helyettük például kukorica, szója vagy rizs használható (Arendt et al., 2004).

A cöliákia megjelenésének időpontja drámaian megváltozott az elmúlt 30–40 évben. Korábban többnyire gyermekkori betegségnek tartották, a diagnosztizált gyermekek többsége 2 évnél fiatalabb volt. Jelenlegi ismereteink szerint – mely a megbízható szerológiai módszerek eredményein alapszik – a cöliákia bármely életkorban jelentkezhet (Polgár, 1996).

Az irodalomban szereplő adatok is a korábban feltételezettnél lényegesen nagyobb gyakoriságra utalnak. A legnagyobb epidemiológiai vizsgálatot Olaszországban végezték iskoláskorú gyermekek bevonásával: az előfordulási gyakoriság 1:184, az ismert és a korábban nem diagnosztizált esetek aránya 1:7 volt. Véralók között Svédországban 1:256 gyakoriságot észleltek. Észak-Írországban 1:152, Írországban 1:300 arányú prevalenciáról számoltak be (Parnell és Ciclitira, 1999).

A cöliákia hazai prevalenciáját Korponay-Szabó és mtsai (1999) vizsgálták egészséges gyermekek, illetve a cöliákiás gyermekek családja körében. Az általuk kidolgozott többlépcsős szűrési rendszerrel – melynek segítségével az IgA-hiányos cöliákiás betegeket is felismerték – a vizsgált 427 (3–6 éves) gyermeknél 1:85 arányú gyakoriságot állapítottak meg. Ismert cöliákiás betegek családjait vizsgálva az elsőfokú rokonok 8,5%-ában diagnosztizáltak coeliakiát: a betegség szignifikánsan gyakrabban fordult elő a testvérek és az utódok körében, mint a szülőknél.

A betegség megnyilvánulási módja egyénről egyénre változhat, nincs két egyforma cöliákiás beteg. Fontos megemlíteni, hogy a vékonybélbolyhok sorvadását a gluténérzékenységen kívül más ártalmak is előidézhetik. A cöliákia diagnózisának megállapításához tehát nemcsak a boholysorvadás tényét kell szövettanilag igazolni, hanem azt is, hogy ez az elváltozás glutén hatására alakult ki.

A cöliákiára utaló általános tünetek: a súlygyarapodás és/vagy a növekedés elégtelensége, fogyás, nemi érés késése; elhúzódó vagy visszatérő hasmenés (ha nem bélfertőzés okozza); súlyos, szokásos kezeléssel nem befolyásolható vashiányos vagy egyéb hiány-eredetű vérszegénység; egyéb hiányállapotok (például fehérjehiány, kalciumhiány, D-vitamin-hiány) (Polgár, 2005). Nagyon fontos hangsúlyozni, hogy ezeket a tüneteket nemcsak cöliákia idézheti elő, hanem más betegségek is. Ezért a tünetek csak a gyanú megfogalmazására adnak módot, a diagnózis korrekt megállapítása pusztán a tünetek alapján nem lehetséges.

A cöliákia megfelelő diagnosztizálása igen fontos, mivel a betegség csak az érintettek egy részénél jár kifejezetten betegségjellegű tünetekkel, ezek az esetek képezik az úgynevezett „cöliákia-jéghegy” csúcsát. Diétás kezelésre az aktuális klinikai tünetektől függetlenül azok az egyének szorulnak, akiknél a vékonybél nyálkahártyája károsodott, boholysorvadásuk van

(Várkonyi, 2000). A gluténérzékenység igazolására specifikus ellenanyagok - endomysium elleni antitest, jejunum elleni antitest – kimutatása szolgál. A bélbolyhok sorvadásának igazolásához a vékonybélből vett közvetlen minta (biopsziás minta) szövettani vizsgálatára van szükség. Falchuk és munkatársai (1980) mutattak rá, hogy a pontos diagnosztizáláshoz (elsőfokú rokonok esetében a veszélyeztetettség megállapításához) nagyon fontos megvizsgálni bizonyos hisztokompatibilitást kódoló gének kifejeződését. Az úgynevezett HLA (humán leukocita antigén) gének által kódolt fehérjék fontos mediátor szerepet játszanak a glutén vékonybél nyálkahártyára gyakorolt hatása közben. Ilyen fehérje lehet például a HLA-B8 is. További genetikai kutatások is folynak a betegség diagnosztizálását illetően. Reinton és munkatársai (2006) javaslatot tettek a HLA antigének vizsgálata mellett mintegy kiegészítésként bizonyos genetikai markerek valós idejű PCR mérésére, nevezetesen a HLA-DQ2 antigént kódoló DQA1\*05 gén és DQB1\*02 gén, illetve a HLA-DQ8 antigént kódoló DQB1\*0302 gén kimutatására.

Mielőtt tovább haladnánk, fontos tisztázni a cöliákiához hasonló betegségek mibenlétét. *Dermatitis herpetiformis* (Duhring-betegség): a gluténérzékenységnek erre a formájára viszkető, hólyagos bőrelváltozás jellemző, viszont ezek a tünetek helyi bőrgyógyászati kezeléssel nem szüntethetők meg. A vékonybél is érintett, de az emésztőszervi tünetek rendszerint enyhébbek. Ezen betegség is permanens betegség, tehát egész életen át tartó gluténmentes diétát kell a betegnek követnie, hogy tünetmentes maradjon (Kovács, 2000).

A gabona- (glutén) allergia a cöliákiához hasonló tünetekkel járó megbetegedés, viszont a háttérben lévő immunológiai folyamatok alapvetően mások. Gabonaallergia esetén IgE (Immunoglobulin E) típusú ellenanyag termelődés játszódik le, míg a cöliákia esetében nem IgE mediált reakció alakul ki, hanem T-sejt által kiváltott immunológiai reakció zajlik. A gabonaallergiában és a cöliákiában egy a közös, hogy mindkét betegséget a glutén váltja ki, ugyanakkor a gabonaallergiát a gluténen kívül okozhatják más gabonafehérjék is. A gabonaallergia esetében azonban nem elegendő az allergiát bizonyítani, hanem a gluténmentes diéta bevezetése előtt célszerű azt is megvizsgálni, hogy a beteg nem cöliákiás-e. A megfelelő diagnózis igen fontos, mert míg a cöliákia és a *dermatitis herpetiformis* életre szóló gluténérzékenységet jelent, addig a gluténallergia lehet időleges, és nem feltétlenül szükséges minden gabonafajtától és minden gluténtartalmú ételtől eltiltani a beteget. A gabona- (glutén-) allergia és a cöliákia közti tényleges különbség csak diagnosztizálás során derül ki (Kovács, 2000).

Fontos még megjegyezni a betegség szempontjából a közelmúltban népszerűvé vált érdekes feltételezést, melyet a Finn Cöliákia Társaság tett, miszerint a zab nem okoz problémát cöliákiásoknál. A mai napig nincs egységes vélemény a zabot illetően. A diétára szoruló betegek 70%-a probléma nélkül használja jelenleg is, de másoknál komoly tüneteket okoz.

## 2.2. Búza és vele keresztreakciót mutató egyéb gabonafélék

A különböző gabonafélék szerepét lisztérzékenység kialakulása és toxicitásuk jellege alapján Kasarda (2001) csoportosította és jellemezte. A gabonaféléknek bizonyos hasonló szerkezetű fehérjéi tartalmazzák az érintettek számára ártalmas alkotórészeket. Ezt a jelenséget nevezzük keresztreakciónak. Kialakulásának feltétele a hasonló molekulaméret, legalább részben azonos aminosav szekvencia és funkcionális homológia az immunreaktivitásban. A gabonaféléknek öt faja hozható kapcsolatba a cöliákiával: a búza, a tritikálé (rozs és búza keresztezésével hozták létre), a rozs, az árpa és esetleg a zab.

A búza (*Triticum*) a pászitfűfélék (*Poaceae*) családjába tartozó növényfaj, amelyet a világon a második legnagyobb mennyiségben termesztenek a kukorica után. A *Triticum aestivum* fajta könnyen alkalmazkodik a különböző ökológiai feltételekhez. az északi félgömb mérsékelt éghajlati övében termesztenek, elsősorban kenyérbúzánaként.

A tritikálé, a búza és a rozs keresztezéséből származó, az első, ember által alkotott nemzetséghibrid, amely köztermesztésbe került. Neve a búza (*Triticum*) és a rozs (*Secale*) latin nevének kombinációjából ered. A nemesítés célja az volt, hogy a búza termőképességét, nagy fehérje- és sikértartalmát a rozs ellenállóképességével keresztezzék.

Az árpa a Kárpát-medence egyik legrégebbi gabonája. Az árpa mai termesztett formái 99%-ban egyetlen diploid fajhoz, tudományos nevén a *Hordeum vulgare* L.-hoz tartoznak. Sikér tulajdonságai gyengék, ezért kenyeret nem lehet sütni belőle. Termesztésének oka mégis a nagy fehérjetartalma.

Európában a jelenleg termesztett rozs (*Secale cereale* L.) őse gyomnövényként került be a búzával. Hazánkban a búza mellett a rozs az a gabona, amelyet még kenyérgabonának tekintenek.

A zab szekunder kultúrnövény, azaz a búza és az árpa gyomnövénye volt és csak későbbi, már a mérsékelt égöv vidékén végrehajtott szelekció nyomán került termesztésbe. Rendszertanilag a zab az *Avena* nemzetségbe tartozik.

A zab fehérjéinek cöliákiás tüneteket kiváltó tulajdonságáról még vitatkoznak a kutatók. Ez a gabonaféle a jelenleg érvényes szabályozásban még szerepel mint a csomagoláson feltüntetendő allergén, de már csak zárójelben. Ebből adódóan az ajánlások ugyan ezt a gabonafélét szintén kizárják a cöliákiások étrendjéből, de számos publikáció (Janatuinen et al., 2002; Högberg et al., 2004) bizonyította már, hogy a zab nem ártalmas a bél nyálkahártyájára és nem vált ki cöliákiás tüneteket. Egy 1995-ben végzett vizsgálat szerint (CX/NFSDU 03/4 OKT., 2003) - melyet később más vizsgálatok is megerősítettek - a kezelt és frissen diagnosztizált cöliákiás betegek is jól tolerálták a zabot. Öt éves nyomonkövetéses vizsgálat szerint napi 93 g zab fogyasztása hosszabb távon sem okozott egészségkárosodást. Ennek valószínűsíthető oka, hogy a zab prolaminja az

avenin, szignifikánsan kevesebb prolint tartalmaz, mint a búza gliadin. A zab ártalmas voltáról is jelentek meg publikációk, melyek az előbbieket ellentétét állították (Lundin et al., 2003). Az eredmények azt mutatják, hogy a zab nagyon sokszor búzával, vagy más cöliákia szempontjából ártalmas gabonafélével szennyeződik szállítása vagy raktározása során (Janssen et al., 1998; Thompson, 2004), így megfelelő szűrővizsgálatok nélkül nem javasolható fogyasztásra. Hernando és munkatársai (2005; 2006) az R5 monoklonális antitestre tervezett ELISA módszert, a Western blotot, a PCR módszert és a tömegspektrometriás mérést sikeresen alkalmazták a szennyeződés kiszűrésére. Továbbá a HACCP következetes betartásával és a gyártási folyamat megfelelő minőségbiztosításával (Tamási, 1999) (összetételi spektrum ismerete, nyersanyag nyomonkövetés, szelektív tárolás, csomagolás ellenőrzése, hulladékkezelés, illetve rendszeres továbbképzés) elkerülhető lenne ez a probléma.

### 2.2.1. Gabonafehérjék szerepe

A fehérjék antigén jellege szempontjából nagy szerepet játszik egyrészt immunogén karakterük, másrészt stabilitásuk mind az élelmiszeripari kezelések, mind a tápcsatornán való áthaladásuk folyamán (Aalberse, 1995). Általában a 10-100 kDa közötti molekulatömegű fehérjék viselkednek immunogén antigénként. A 10 kDa-nál kisebb molekulatömegű fehérjék nem váltanak ki immunválaszt, míg a 100 kDa-nál nagyobbak nem tudnak felszívódni a bélcsatornán keresztül. Tsuji és munkatársai (2001), Fränken és munkatársai (1994), valamint James és munkatársai (1997) egyetértenek abban, hogy bizonyos 47 kDa fehérjék a legintenzívebb allergének a búzában, de találtak ezen kívül 17, 20, 27, 31 kDa nagyságú allergiát kiváltó fehérjéket is.

A gabonaszemek fehérjéi többféleképpen csoportosíthatók (Lásztity, 1981):

*Biológiai funkciójuk alapján:* A fehérjéket biológiai szempontból funkcionális és tartalék fehérjékre oszthatjuk. Funkcionális fehérjék az enzimek, egyes organellek, a membránokat felépítő fehérjék, valamint a szabályozási folyamatokban résztvevő fehérjék. A tartalék fehérjékhez az endospermium, az aleuronréteg, valamint a csíra különböző, eltérő oldhatóságú fehérjefrakciói tartoznak.

*Oldhatóság szerint:* Osborne (1907) nyomán igen elterjedt a gabonafehérjék oldhatóság szerinti csoportosítása. Így vízoldható albuminokat, sóoldható globulinokat, alkohol oldható prolaminokat (búzában: gliadin; rozsban: szekalin; árpában: hordein; zabban: avenin (Arendt et al., 2004) és sav-, illetve lúgoldható glutelineket (búzában: glutenin) különböztetünk meg. Az albuminok és a globulinok élettanilag aktív fehérjék, a prolaminok és a glutelinek tartalék fehérjék.

A gabonafehérjéknek általában kicsi a lizin- és triptofán tartalma, nagy bennük a glutaminsav és a prolin mennyisége (Kasarda et al., 1984; Koppelman és Hefle, 2006). Egyes kutatások szerint az aminosav összetétel nagy szerepet játszik az epitópok képződésénél a cöliákiás autoimmun reakciók kialakulásában (Gorinstein et al., 1998). Fehérjetartalom szempontjából a búza az egyik leggazdagabb gabonaféle. A búzák nagy többségénél a fehérjetartalom 12-15%-os lehet, amelynek jelentős része vízben nem oldható sikerfehérje (glutén). Ezeket a búza endospermium tartalékfehérjét gliadinokra (prolaminok), illetve gluteninekre (glutelinek) osztották aszerint, hogy 70%-os alkoholban, illetve híg savban vagy lúgban oldódnak-e.

A glutén egynegyede glutenin, háromnegyede gliadin. A glutenin nagy molekulatömegű, míg a gliadin kis molekulatömegű, ezért tömegarányuk kb. 1:1 a glutén frakcióban és elválasztás-technikai eljárásokkal, elsősorban elektroforézissel komponensekre bonthatók (Lásztity, 1996, 1999):

- kis molekulatömegű (LMW) gliadin (prolamin) komponensek, amelyekre jellemző, hogy egy polipeptidláncból állnak, diszulfid kötéseik intramolekulárisak, molekulájuk globuláris jellegű;
- nagy molekulatömegű és kis molekulatömegű glutenin komponensek (HMW-GS és LMW-GS), amelyekre jellemző, hogy több polipeptidláncból épülnek fel, melyeket intermolekuláris diszulfidkötések kapcsolnak össze, a molekula lineáris jellegű.

Az elektroforetikus mobilitásuk alapján további  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\omega$ -prolaminokat különböztethetünk meg, amelyek mennyiségi eloszlása minden gabonanövénynél más és más (Kasarda et al., 1983). Cöliákiásokra nézve az  $\alpha$ - és  $\beta$ -típusú prolaminokat tartják elsősorban toxikusnak (búza esetében 60%-át teszik ki a gliadin frakciónak), a  $\gamma$ -prolamin (30%-ot képvisel a gliadin frakción belül) kevésbé bizonyult toxikusnak. Tudni kell azonban, hogy a hőkezelt élelmiszerekben csak a hőstabil és szintén toxikus  $\omega$ -prolaminok (10%-ot tesznek ki a gliadin frakción belül) kimutatására van mód (Charbonnier és Mossé, 1980). A gliadinok toxicitásában levő különbségek részben a prolin tartalmukban való eltérésükből adódik (Skerritt és Devery, 1990a). A köztudatban sokáig csak a gliadinokat tartották ártalmasnak, de mára már világossá vált, hogy a HMW gluteninek is ártalmasnak bizonyultak *in vivo* kísérletek során a cöliákiás betegek nagy százalékánál (De Vincenzi et al., 1996; Ellis et al., 2005)

A glutén vagy siker fehérjéinek szerepe technológiai szempontból is igen jelentős, hiszen nedvesség-felvevő képessége, ízjavító és ízfokozó hatása meghatározó. A gliadin és glutenin komponensek jelenléte és aránya lényegesen hat a kenyér minőségére: a gliadin arányának növekedése a siker lágyulását, csökkenése a siker keménységét fokozza (Matuz, 2000). Bizonyított

tény (Yuan He et al., 2005), hogy a HMW glutenin alegység arányának jelenléte meghatározza a kenyértészta dagasztási, keverési tulajdonságait. Transzgén búza vonalak esetében ezt az értéket, mint minőségi faktort alkalmazzák és így prognosztizálják az adott vonal jövőbeni tulajdonságait.

A táplálék fehérjék szerkezetét az élelmiszeripari eljárások különböző mértékben módosíthatják. Ezek az eljárások azonban a fehérjék potenciális allergén jellegét általában nem csökkentik. A legbiztosabb megoldás a cöliákiások szempontjából a gliadin és a többi prolamin eltávolítása lenne, azonban a reológiai szerkezetet befolyásoló fehérjék nélkül a lisztekből nem lehetne kenyeret sütni. Végleges megoldás hiányában a tápanyag-allergének aktivitásának csökkentése céljából jelenleg enzimes kezelésekkel is próbálkoznak. A cöliákiás tüneteket kiváltó gabonafélék esetében az egyik ilyen lehetőség a transzglutamináz enzimes módosítás, melyet széles körben alkalmaznak az élelmiszeripar területén. A transzglutamináz enzim nagy lehetőséget rejt a gabonaipar számára, hiszen a reológiai szerkezet javulásával minőségi tészta is előállítható a nem tradicionális, pszeudocereália örleményekből, kukoricakeményítőből, sárgaborsóból vagy akár rizslisztből is (Gerrard és Sutton, 2005). A reológiai szerkezet javulásával párhuzamosan arra is van esély, hogy az enzimes módosítás hatására az allergén jelleg csökken (Takács et al., 2007), de erre egyelőre nincs elég irodalmi bizonyíték.

Három másik gabonafajta, a tritikálé, rozs, és árpa prolaminjai ugyanolyan hatást váltanak ki cöliákiásoknál, mint a gliadin. A zabot, vitatott hatásai miatt a jelenlegi törvényi szabályozás még cöliákiások számára ártalmas gabonaféleként kezeli, de már csak zárójelben tünteti fel a többi jelölésre kötelezett gabonaféle mellett.

A tritikále, a búza és a rozs keresztezéséből származik, ezért megtalálhatók benne a gliadin és a szekalin nyomai is. Nagy a fehérjetartalma, időjárástól függően még a búza fehérjetartalmát is meghaladhatja.

Az árpa endospermiumjában levő fehérjék oldhatósága alapján a következő csoportba sorolhatóak: albuminok, globulinok, illetve prolamin (hordein) és glutelin, melyek az endospermium tartalék fehérjéi. Ezek közül a legnagyobb mennyiségben az utóbbi kettő van az árpában. Az árpa aminosav tartalmát tekintve más gabonafélékhez hasonlóan magas glutaminsav és prolin tartalommal rendelkezik, de kevés lizint tartalmaz (Lásztity, 1996).

A rozs fehérjetartalma kisebb, mint a búzáé. Az Osborne-féle csoportosítás alapján a rozs albuminokat, globulinokat, prolaminokat és glutelineket tartalmaz. Az endospermiumban található kis molekulatömegű prolamin a szekalin (elektroforetikus mobilitásuk alapján C, A és B szekalinok) (Lásztity, 1996).

A zab endospermiuma kevés prolamin (avenint) (10%-a az összfehérje tartalomnak) tartalmaz (Denery-Papini et al., 1999), ezzel szemben globulinban gazdag. A zab prolamintok közül  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -aveninteket különböztetnek meg elektroforetikus mobilitásuk alapján (Lásztity, 1996).

Az **1. táblázat** tartalmazza a fent említett gabonafélék néhány beltartalmi tulajdonságát.

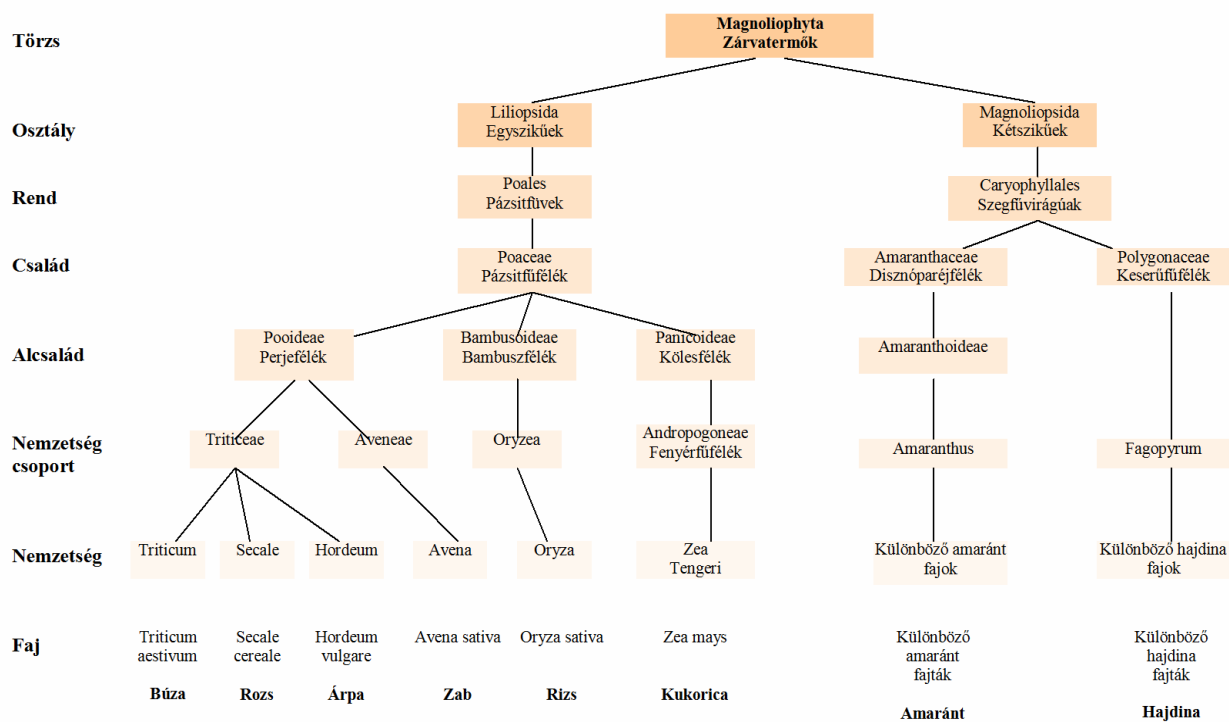
**1. táblázat** Cöliákiás tüneteket kiváltó gabonafélék beltartalma (Rodler, 2005)

	Energia [kcal]	Fehérje [%]	Szénhidrát [%]
Árpa	363	10,6	73,1
Búza (teljes mag)	347	14,4	66,2
Durumbúza	339	12,7	71,13
Rozs (teljes mag)	330	9,6	67,0
Zab (teljes mag)	398	15,0	65,0
Tritikálé	336	14-18	72,13

### 2.2.2. Genetikai összefüggések

A gabonafélék botanikai rendszertani besorolását az **1. ábra** mutatja. Jól látható, hogy a glutén-érzékenyek számára tiltott fogyasztású gabonafajok (búza, árpa, rozs, zab) ugyan egyszikű növények, mégis más alcsaládba tartoznak, tehát jól elkülönülnek a biztonságosan fogyasztható kukorica és rizs fajoktól (Hajósné, 1999). A pszeudocereália (hajdina, amaránt) fajok a kétszikűek osztályába tartoznak, így rendszertanilag is igen távol állnak a lisztérzékenységet kiváltó fehérjét tartalmazó fajoktól.





**1. ábra** A zárvertermők törzséhez tartozó családok néhány képviselője

A gabonafélék esetében is, ugyanúgy, mint más növényeknél, feltérképezték a genetikai tulajdonságokat, illetve az öröklőanyag pontos összetételét. A búzáról tudjuk, hogy allohexaploid, vagyis  $2 \times 3$ , különböző fajból származó genomja van: A, B és D genomok. Genommérete nagynak számít a gabonafélék között, ugyanis  $16 \times 10^9$  bp/ 1 kromoszóma nagyságrendről van szó. A genomjának több mint 80%-a ismétlődő szekvenciákból áll.

Röder és munkatársai (1998) mikroszatellit primerek segítségével derítették ki egyes gének elhelyezkedését a kromoszómákon (többek között bizonyos prolaminokat kódoló géncsaládok tagjainak pozícióját is) kihasználva azokat a 6 bp-nál kisebb hosszúságú tandem szekvencia ismétlődéseket, melyek az eukarióták jellemzői. A búza prolaminokkal kapcsolatosan számos kutatásról tudunk, amelyek a genetikai tulajdonságok és a fehérje kifejeződés közti összefüggéseket vizsgálták. Ezek főleg a kelt tészta tulajdonságainak pontosabb felmérése és további javítása érdekében történtek. Branlard (2004) a következőképpen foglalta össze ezeket az eredményeket: a gliadin fehérjék monomerek (30-80 kDa nagyságúak), a glutenin fehérjék polimerek és 2 fő részből, a nagy molekulásúlyú gluteninekből (HMW-GS: 75-120 kDa nagyságúak) és kis molekulásúlyú gluteninekből (LMW-GS: 25-45 kDa nagyságúak) állnak. Ugyan mindegyik felsorolt fehérjét génklaszterek kódolják, mégis megfigyelhető némi törvényszerűség, nevezetesen, hogy az A1, B1, D1 kromoszómák hosszú karján található a Glu-1 géncsalád (HMW-GS-t kódolják), a rövid karján

pedig a Glu-3 (LMW-GS-t kódolják) és a Gli-1 ( $\omega$ -gliadinokat kódolják) géncsalád. Az A6, B6, D6 kromoszómák rövid karján azonosították a Gli-2 géncsaládot, mely az összes többi gliadin fehérje ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -) kódolásáért felelős.

Juhász és munkatársai (2001) megállapították, hogy a Bánkúti 1201 magyar búzafajta esetében a reológiai tulajdonságok kiválósága egy pontmutációnak köszönhető a többi vizsgált fajtához képest. Azt is megállapították, hogy az allél összetétel jobban összefügg a glutén minőséggel, mint annak mennyiségével.

Abból a tényből kiindulva, hogy a kloroplasztisz DNS rendszerek tanulmányozása adhatja számunkra a legtöbb felvilágosítást a faj törzspejlődéséről és a genomjában megtalálható jellemző hipervariábilis régiókról, Ogihara és munkatársai (2002) szekvenálták és térképezték a búza kloroplasztisz DNS-ét, a pázsitfűfélék közül a rozs és a kukorica után harmadikként. Eredményként egy 134 545 bp hosszú szekvenciát kaptak, mely kísérleteim során jelentős segítséget nyújtott a primerek kiválasztásánál és az amplikonok kiértékelésénél.

A búza, az árpa és a rozs genetikai összehasonlítása is megtörtént (Moore et al., 1995) és a kutatók megállapították, hogy ugyanazok a lokuszok ugyanolyan sorrendben találhatóak mindhárom cereáliánál. A Triticeae fajok genetikai állományának rizs és kukorica genomjával való összehasonlítása során kiderítették, hogy a haploid kromoszóma számok között eltérések vannak: a kukorica 5, a rizs 12, a búza, az árpa és a rozs pedig 7-es alap kromoszómaszámmal rendelkezik. A haploid DNS tartalom mégis a rizsben a legkisebb és a Triticeae fajokban a legnagyobb.

### **2.3. Búzával keresztreakciót nem mutató gabonafélék és pszeudocereáliák**

Az ajánlások szerint (Barna, 2000) cöliákiában szenvedő betegek étrendjében szerepelhetnek a búzával keresztreakciót nem mutató gabonafélék, mint a kukorica és a rizs, illetve olyan pszeudocereáliák, mint az amaránt és a hajdina. A pszeudocereáliák botanikailag ugyan nem tartoznak a gabonafélék családjába, mégis azért sorolják a gabonafélék közé, mert nagy keményítő tartalmú, lisztes magvukat a gabonafélékhez hasonlóan hántolva, őrölve használjuk fel ételeinkben. Valódi glutént nem tartalmaznak, ezért alkalmasak a gluténmentes élelmiszerek tápértékének kiegészítésére vagy annak növelésére.

A kukorica (*Zea mays*) a kalászosokkal és a fűfélékkel együtt szintén a pázsitfűfélék (*Poaceae*) családjába tartozik. A kukorica hazai megjelenésekor alapvetően emberi táplálékul szolgált. Az Osborne-féle oldhatóság alapján albuminokra, globulinokra, alkoholban oldódó prolaminokra (zein) és glutelinekre lehet felosztani a kukorica fehérjéit. A kukorica magbelső

aminosav összetételét tekintve alacsony lizin és triptofán tartalom a jellemző. Napjainkban a lisztérzékeny cöeliákiás betegek diétájának fontos eleme a kukorica.

A rizs a pászitfűfélék (*Poaceae*) családján belül, az *Oryza* nemzetségbe tartozik. A házasított, termesztett rizsek túlnyomó többsége az *Oryza sativa* L. fajhoz tartoznak. A rizs szem szerkezete hasonló más gabonákéhoz. A tartalék fehérjék közül kis és nagy molekulatömegű fehérjéket különböztetünk meg. A rizs kis molekulatömegű, 70% (v/v) alkohollal kivonható tartalék fehérjéit prolaminoknak nevezzük, ahogy más gabonák esetében is. A búza, árpa és kukorica prolaminjaival összehasonlítva a rizs ezen fehérje frakcióját nem vizsgálták még meg alaposabban. Ez annak tulajdonítható, hogy ez a frakció kis mennyiségben van jelen és nem játszik jelentős szerepet a rizs minőségének meghatározásánál. Az aminosav összetételt tekintve általában nagyobb a rizs lizin tartalma, és kisebb a glutaminsav, illetve a prolin tartalma a többi gabonáéhoz képest (Bienvenido, 1993)(Lásztity, 1996).

A hajdina (pohánka) (*Fagopyrum esculentum* Moench) a Himalája vidékéről származik. Rendszertanilag a zárvatermők törzsébe, a kétszikűek osztályába a keserűfűfélék (*Polygonaceae*) családjába, a *Fagopyrum* nemzetség fajai közé tartozik. A liszt nyersfehérje tartalmának 94%-a valódi fehérje. Ennek 94%-a glutelin, amely könnyen emészthető, metionin tartalma magas. Lizin és arginin tartalma is jelentős. A hántolt hajdinát kása ételként, lisztjét kenyér és tésztafélék készítéséhez használják. Mivel siker tulajdonságai gyengék, ezért lisztjéből hagyományos módon nem készíthető laza szerkezetű kenyér. Gazdag esszenciális aminosavakban (Biacs et al., 1999).

Az amaránt (*Amaranthus*) egy kultúrnövény-nemzetség összefoglaló magyar neve, mely a világ számos részén elterjedt. Kb. 60 faj tartozik ide, melyek egy része gyomnövényként ismert, másokat takarmányozási, vagy fogyasztási célokra termesztenek már nagyon rég óta (az inkák „kiwicha”-nak, az aztékok „huautli”-nak hívták, Indiában disznóparéj néven fogyasztott, spenótszerűen elkészíthető konyhai növény). Minden faja kétszikű, a *Caryophyllales* (szegfűvirágúak) rendjébe tartozó *Amaranthaceae* család tagja. Az amaránt (*Amaranthus* sp.) szárazságtűrő növény, kedvező termesztési és táplálkozás-élettani jellemzői miatt termesztik (Dávid, 1999). Az amaránt mag nagy fehérje tartalma miatt jó lehetőség a közepes biológiai értékű élelmiszerek vagy lisztérzékenyek számára fogyasztható alapanyagok tápértékének kiegészítésére. A mag 13-18% fehérjét tartalmaz, többet, mint a kukorica, árpa, rozs és rizs. A fehérjetartalom a csírában 65%, a közepső raktározó szövetben pedig 35%. Az amaránt lizin tartalma jelentős.

Az **2. táblázat** tartalmazza a fent említett gabonafélék és pszeudocereáliák néhány beltartalmi tulajdonságát.

**2. táblázat** Cöliákiás tüneteket nem okozó gabonafélék és pszeudocereáliák beltartalma (Rodler, 2005)

	Energia [kcal]	Fehérje [%]	Szénhidrát [%]
Amaránt	359	16,0	63,0
Hajdina	345	12,0	72,0
Kukorica (teljes mag)	339	9,0	65,0
Rizs	353	7,4	77,5

Kasarda (2001) szerint az amaránt és a hajdina bizonyos fehérjéi okozhatnak ugyan más jellegű allergiás tüneteket egyeseknél, de olyan távoli a rokonság a cöliákiát kiváltó gabonafélék és a pszeudocereáliák között, hogy ez a két pszeudocereália is nagy valószínűséggel beilleszthető a cöliákiás betegek diétájába. Ezen kívül az aminosav összetétele, amely nagy szerepet játszik az autóimmun reakciók kialakulásában, az amaránt- és búzamazagnál csak 63,6 %-os hasonlóságot mutat (Gorinstein et al., 1998). Gorinstein és munkatársai (2002) megállapították, hogy az amarántban léteznek prolamin-szerű alkohol oldható fehérjék, melyek viszont csak 2%-át tartalmazzák a fehérjék teljes nitrogén tartalmának, ellentétben a búzával, melynek prolaminjai a teljes nitrogén mennyiségnek a 45%-át kötik le. Következésképpen a prolamin-szerű vegyületek nem tartalék fehérjék. Mennyiségük is olyan kicsi más cereáliákhoz képest, hogy fogyasztásuk feltehetően nem jelent gondot cöliákia fennállása esetén sem.

#### **2.4. Az élelmiszer-allergének jelölésére vonatkozó törvényi szabályozás**

A világon mindenütt egyre több az élelmiszerallergiában, illetve más élelmiszer intolerancia betegségekben szenvedők száma. Ezért szükségessé vált, hogy a fogyasztók tájékoztatására az élelmiszerek címkéjén a felhasznált főbb élelmiszer-allergének fel legyenek tüntetve. Az élelmiszer jelölése nem vezetheti félre a fogyasztót az élelmiszer tulajdonságait illetően. A termék csomagolásán magyar nyelven, közérthetően, egyértelműen, jól olvashatóan fel kell tüntetni a fogyasztók tájékoztatásához szükséges jelöléseket.

A jelenleg érvényes 2003/89/EC (2003/89/EK, 2003; Cheftel, 2005) (magyar törvénykezésben is megjelent 19/2004. (II. 26.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet az élelmiszerek jelöléséről, a 167/2004 rendeleti módosítással (2004)) direktíva alapján, 2004. november 25-étől az Európai Unió területén belül előállított élelmiszerek címkéjén kötelező a gyártóknak feltüntetni a következő allergének jelenlétét:

○ Sikértartalmú gabonafélék (pl. búza, rozs, árpa, zab (még zárójeliesen ugyan, de szerepel a listán!), tönkölybúza, kamut, illetve azok hibridizált fajtái) és az azokból készült termékek;

○ Rákfélék és az azokból készült termékek;

○ Tojás és az abból készült termékek;

○ Hal és az abból készült termékek;

○ Földimogyoró és az abból készült termékek;

○ Szójabab és az abból készült termékek;

○ Tej és az abból készült termékek (beleértve a laktózt);

○ Csonthéjasok, például mandula (*Amygdalus communis L.*), mogyoró (*Corylus avellana*), dió (*Juglans regia*), kesudió (*Anacardium occidentale*), pekándió [*Carya illinoensis (Wangenh.) K. Koch*], brazil dió (*Bertholletia excelsa*), pisztácia (*Pistacia vera*), makadámia és queenslandi dió (*Macadamia terriifolia*) és az azokból készült termékek;

○ Zeller és az abból készült termékek;

○ Mustár és az abból készült termékek;

○ Szezámmag és az abból készült termékek;

○ Kén-dioxid és a 10 mg/kg, illetve 10 mg/liter töménységet meghaladó, SO<sub>2</sub>-ben kifejezett szulfitek.

Ennek az irányelvnek a III. mellékletét, amely az előbb felsorolt allergéneket tartalmazza, 2006-ban módosították (2006/142/EK), így a lista kiegészült még két ponttal:

○ Csillagfürt és abból készült termékek;

○ Puhatestűek és abból készült termékek.

Ez a szabály több szempontból is változást jelent az előző EU szabályozáshoz képest:

- A glutén felkerült az élelmiszer-allergének listájára - az EU irányelv 1. sz. melléklete szerint.

- Az allergén listán szereplő (például glutén tartalmú) összetevőket fel kell tüntetni, ez a szabály az ún. "összetett alkotórészekre" is érvényes, azaz fel kell sorolni és részletezni kell valamennyi alkotórészt (ez a régi "25%-os" szabály hatályon kívül helyezését jelenti).

Glutén kontamináció szempontjából két típusú élelmiszert különböztetünk meg. Az eredendően glutént nem tartalmazó, de nem speciális gluténmentes diétára szánt élelmiszert, amelyen a gyártónak fel kell tüntetnie a lehetséges gluténszennyezés tényét, ha ez nyilvánvaló (például, ha a technológiai eszközökkel más gluténtartalmú élelmiszer gyártása is rendszeresen történik és a tisztítás bizonyítottan nem megfelelő; vagy egyik nyersanyag deklaráltan nyomokban tartalmazhat glutént). Ebben az esetben a jelölési kötelezettség attól függetlenül fennáll, hogy valójában mennyi glutént tartalmaz a termék, tehát a "rejtett" gluténtartalomról is tájékoztatni kell a fogyasztókat. Ez a szabály ugyanúgy érvényes adalékanyagok, aromahordozók, technológiai segédanyagok és más összetevők "rejtett" gluténtartalmára is.

A másik típusú termék a speciális táplálkozási célú gluténmentes élelmiszer. A gluténmentes élelmiszerekre vonatkozó jelenlegi, magyarországi szabályozás szerint a lisztérzékenységben szenvedők részére készült gluténmentes élelmiszerek előállításánál nem használható búza, tönkölybúza, árpa, rozs, zab és ezek hibridjei, vagy ezekből származó készítmények (beleértve a keményítőt és élelmi rostokat is) és előállításuk során biztosítani kell, hogy az említett gabonafélékből származó anyagok nem kerülnek az élelmiszerbe.

A fent említett rendelkezések indokolják egy vagy több olyan érzékeny és specifikus ellenőrzési módszer kidolgozását, amelyek lehetővé teszik komplex élelmiszer-mátrixból a gluténnal való szennyezettség kimutatását.

A gluténmentes Codex Alimentarius ajánlás érvényben lévő változata szerint a gluténmentes élelmiszer definíciója (ALINORM 08/31/26):

1. olyan összetevőkből áll, melyek nem tartalmaznak búzából, vagy *Triticum* fajokból (például: tönkölybúza, durumbúza, rozs, árpa), vagy zabból és annak keresztezett változataiból származó prolamint. Gluténtartalmuk nem lehet több, mint 20 mg/kg, vagy
2. tartalmaz búzából, rozsból, árpából, zabból, tönkölybúzából vagy annak keresztezett változataiból származó összetevőket, de technológiai eljárással „gluténmentessé” alakították, és gluténtartalma nem több, mint 20 mg/kg.

Ezenkívül csökkentett gluténtartalmú élelmiszernek nevezzük azt az élelmiszert, amely szintén tartalmaz búzából, rozsból, árpából, zabból, tönkölybúzából vagy annak keresztezett változataiból származó összetevőket, és gluténtartalma 20 és 100 mg/kg közötti, de ez nem fogyasztható gluténmentes élelmiszerként.

A magyar törvényben még a 200 mg/kg határérték szerepel a régi Codex ajánlás szerint (167/2004, 2004) a legújabb 20 mg/kg határérték helyett. A határérték csökkentése törvényi szinten a közeljövőben várható, hiszen számos publikáció szerint (Collin és Kaukinen, 2005, Hischenhuber et al., 2006) ez az a glutén mennyiség, mely alatt a betegek nagy százalékánál még nem mutatkoznak a betegség jellemző tünetei.

Az Európai Unióhoz történt csatlakozást követően a korábbi termék-engedélyezést a notifikálás (bejelentés) váltotta fel. A bejelentést a gyártónak, vagy a forgalmazónak legkésőbb a termék piacra kerülésének napján kell megtennie a készítmény jelölésének és a termékre vonatkozó adatlapnak az Országos Élelmiszerbiztonsági és Táplálkozástudományi Intézethez (OÉTI) való benyújtásával.

A gluténmentes élelmiszerek különleges táplálkozási célú élelmiszerek, így a termékek jelölésén fel kell tüntetni a "gluténmentes" vagy "lisztérzékenyek is fogyaszthatják" kifejezést. A szöveg mellett piktogram (**2. ábra**) is alkalmazható (Horacsek, 2005).



**2. ábra** Gluténmentes piktogram

A törvényi szabályozásokon kívül a fogyasztókat az allergológiával foglalkozó szakemberek által létrehozott úgynevezett táplálékintolerancia adatbank (<http://www.taplalekallergia.hu>) is segíti, hogy megfelelő információkhoz jussanak a termékekkel kapcsolatban (Barna, 2000).

## 2.5. Glutén szennyezettség kimutatása

Az élelmiszerek gluténnal való szennyezettségének kimutatása két irányba fejlődik. Nevezetesen megkülönböztetünk fehérje alapú és DNS alapú kimutatást (Poms, et al., 2004).

A cöliákia esetében toxikus biomolekulának számító glutén fehérje detektálása többféle módon történhet. Ki lehet mutatni mikroszkópos, elektroforetikus, kromatográfiás és immunanalitikai módszerekkel. Manapság már bizonyosságot nyert, hogy ezek közül az immunanalitikai kimutatás a legpontosabb, leggyorsabb és legolcsóbb, a többi pedig a pontatlansága és a költséges volta miatt idejétmúlt. A legújabb Codex ajánlások is megerősítik ezt a tényt (ALINORM 08/31/26).

A DNS alapú kimutatás pontosságát, megbízhatóságát és gyorsaságát szintén nem kérdőjelezi meg, de indokoltsága sokáig vitatott volt, hiszen nem magát a glutén érzékenységet okozó fehérjét detektálja, hanem vagy az azt kódoló DNS részletet, vagy a vékonybél nyálkahártyát károsító

fehérjét tartalmazó gabonafélék valamelyik másik jellemző DNS-ét. A DNS alapú módszerek tehát csak közvetett módszerek, így kvantitatív mérésre csak abban az esetben használhatóak, ha bizonyítható, hogy a DNS és a hozzá tartozó fehérje mennyisége arányos, közöttük a mintában megfelelő korreláció áll fenn. DNS alapú eljárás két alapvető esetben ajánlott: elsőként azoknál az eseteknél vizsgáltak ilyen módszerrel, amelyeknél így bizonyosságot nyertek a felől, hogy az adott minta nem érintkezett egyik veszélyes gabonafélével sem. Ilyenkor a minták előszűrése történt a módszerrel. Másodsorban kiegészítő módszerként kezdték alkalmazni, mikor bebizonyosodott, hogy a fehérje alapú módszereknek is vannak korlátai, főleg feldolgozott élelmiszer minták esetében, ahol a fehérjék denaturálódnak és kémiai oldhatatlanná válnak (Boross és Sajgó, 2003). Az immunanalitikai módszerek alkalmazása során előfordult fals-pozitív, illetve fals-negatív eredmény is. Ez tette indokolttá a DNS alapú ellenőrzést.

### **2.5.1. Immunanalitikai módszerek és az ezekkel kapcsolatos tapasztalatok**

A FAO/WHO Codex Alimentarius Táplálkozástudományi és Különleges célú Élelmiszerek Bizottsága (CX/NFSDU) szerint az élelmiszerekben és élelmiszeralkotókban a glutén kvantitatív kimutatása immunológiai módszerrel ajánlott (pl. ELISA, Western blot, immunkromatográfia), alternatív módszerként pedig a DNS alapú meghatározás javasolt (ALINORM 08/31/26).

Az immunanalitikai alapokon működő módszerek előnye, hogy élelmiszerek esetében a glutén kvantitatív mérésére alkalmasak. Előnyük még, hogy sokkal gyorsabban adnak eredményt, mint a többi, fent említett vizsgálati módszer.

A glutén immunológiai alapon történő kimutatása kétféle módon történhet:

- Immunkromatográfia elvén működő gyorsmódszerrel, amely 5-10 percet vesz igénybe, de csak kvalitatív mérésre szolgál. Azt mutatja meg, hogy a megengedett határérték fölött vagy alatt van-e az adott minta gluténkoncentrációja.
- Szilárd fázisú enzimjelzéses immunszorbens elvű analízissel (ELISA), melynek kompetitív vagy szendvics változata ugyan idő- és műszerigényesebb a gyorseszteknél, viszont kvantitatív és kvalitatív mérésre is alkalmas.

Az ELISA vizsgálatoknál monoklonális és poliklonális ellenanyagokat is alkalmaznak, az immunkromatográfias gyorsmódszereknél viszont csak monoklonális ellenanyagokat használnak (Takács, et al., 2005).

A glutén kimutatására alkalmas, forgalomba lévő kitek ellenanyag szerint csoportosítása:

- poliklonális, gliadin specifikus
- monoklonális  $\omega$ -gliadin specifikus,



- monoklonális R5-ellenanyagra alapozott (pl. Méndez-féle R5 szendvics ELISA).

### A glutén kimutatás fejlődése

Az elmúlt 10 évben nagy előrelépés történt az élelmiszerek glutén tartalmának glutén/gliadint felismerő ellenanyag alapján alapuló analízisében (Janssen, 2006). Kezdetben poliklonális ellenanyagot használtak a gliadin altípusok együttes jelenlétének kimutatására. Később többen próbálkoztak monoklonális antitestre tervezett módszerfejlesztéssel (Ciclitiria és Ellis, 1991), végül Skerrit fejlesztett ki egy érzékenyebb,  $\omega$ -gliadin ellenanyag alapú módszert, amely különösen a hőstabil gliadin frakciók felismerésére irányult. Skerrit (1990b) durum búza, árpa, rozs, zab, kukorica és rizs teljes tartalék fehérje frakcióinak SDS-PAGE-val történő elválasztása után a fehérjéket monoklonális antitest alapú immunblottal különítette el. A kísérlet eredményei szerint a monoklonális antitestet fel lehet használni glutén kimutatására, árpa maláta hamisításának kimutatására, illetve a kenyér búza kimutatására durum tésztában. A kereskedelmi kitek többsége ezt az ellenanyagot használja. A módszer gyengesége, hogy az  $\omega$ -frakció, ugyan hőstabilitása miatt élelmiszerekből könnyebben detektálható, csak kis részét teszi ki az összes prolamin tartalomnak és a különböző gabonafajtákban az  $\omega$ -gliadin mennyisége változó (Denery-Papini et al., 1999). Ennek ismeretében mondhatjuk, hogy a Skerrit-féle ELISA módszer koncepciója nem volt teljesen következetes. Mivel nem egyforma mértékben ismeri fel az árpa- és a rozs prolaminokat, a mérések gyakran nem reprodukálhatóak. Ennek oka lehet az is, hogy az egyes gyártók különböző minőségű gliadin preparátumokat használnak kalibrációs standardként.

A következő előrelépés Méndez és kutatócsoportja (Valdés et al., 2003) által kifejlesztett, gliadin epitópokat felismerő R5-ELISA volt. Az epitópok a fehérjemolekulának azon részei, melyek a specifikus antitestekhez tudnak kapcsolódni. Az  $\omega$ -szekalin (rozs prolamin) antigén ellen termeltetett monoklonális R5 ellenanyag a gliadinokat, szekalinokat és a hordeineket (árpa prolamin) egyforma mértékben, ugyanazokon a szakaszokon ismeri fel. Ezek a régiók az irodalom szerint speciális, glutaminban gazdag pentapeptid szekvenciák, melyek bizonyítottan fontos immunológiailag aktív részletei a fehérjéknek (Kahlenberg et al., 2006). Az R5 ellenanyaggal, melynek nevében az „R” a rozsra, az „5” pedig a pentapeptid szekvenciákra utal, főleg az  $\alpha$ -,  $\gamma$ -típusú toxikus gliadin epitópokat tudják kimutatni. Az R5-ELISA-val az érzékenység, a specificitás és a reprodukálhatóság is javult. Ezt a módszert körvizsgálat keretei között validálták és a gluténkimutatás ajánlott módszereként bekerült a Codex Alimentarius ajánlásokba (Méndez et al., 2005).

További kutatások indultak a Méndez féle vonalon és azóta már született néhány, a szekvencia azonosságon alapuló, Méndezéhez hasonló módszer, amely a tüneteket kiváltó prolaminok

mindegyikére specifikus, a fehérjék hidrolizált formáját is detektálja, illetve a különböző fehérjekivonáshoz használt vegyszerekkel is kompatibilis (Redondo, et al., 2005).

Az immunanalitikai módszerek korlátait Skerritt és munkatársainak (1990c) kutatásai bizonyították, hiszen az általuk kifejlesztett ellenanyag bizonyos esetekben keresztreakálhat egyes keményítő granulátumok felszínén megtalálható fehérjékkel, így nem valós pozitív eredményeket produkálhat. Azt is bizonyították, hogy a polifenolok jelenléte lényegesen ronthatja a prolaminok extrakcióját (Skerritt és Hill, 1990b). Rumbo és munkatársai szerint (1996) a magas hőmérsékleten történő hőkezelés (>130°C) adott kísérleti körülmények között bizonyítottan 80%-kal rontotta a gliadinok kioldhatóságát. A gliadin kimutathatóságának csökkenését hőterhelés hatására más kísérletek is bizonyították (Horacsek, 1995). Ez összefügg a gliadinok hő hatásra bekövetkező denaturációjával/degradációjával/aggregációjával, ami alapvetően megváltoztatja az oldhatóságot. A szerző a változásokat nemcsak az alkalmazott hőbehatással és annak idejével magyarázta, hanem egyértelműen az egyes élelmiszeralkotók (pl. nedvesség, tojás, cukor, keményítő) jelenlétével és azok gliadinnal való kölcsönhatásával is. A puding, piskóta és virsli modellek vizsgálata választ adott arra, hogy a fent említett komponensek milyen mértékben csökkentik a gliadin kimutathatóságát a vele való kölcsönhatásból, illetve abból adódóan, hogy bizonyos móltömegű alkohololdható frakciói egybeesnek a gliadin azonosítását elősegítő 30.000 - 50.000-es móltömegű fehérjékkel. Zsírtalanítással az érzékenység a hőkezelt termékek esetén nem volt növelhető, csak az elektroforetikus kép minősége javult tőle.

### **2.5.2. DNS-alapú technikák és az ezekkel kapcsolatos tapasztalatok**

Ha allergén kimutatás kapcsán DNS alapú technikákról beszélünk, akkor elsősorban a polimeráz láncreakción alapuló technikákat (pl. PCR, QC-PCR, real-time PCR, PCR-RFLP, PCR-ELISA), illetve a hibridizációs technikákat (Southern blot, hibridizációs gyorsesztek, esetleg RNS-t detektáló Northern blot) értünk ezeken.

A dezoxiribonukleinsav (DNS) kimutatáson alapuló módszerek élelmiszer analitikába való bevezetésekor több kritikus kérdés vetődött fel. Ilyenek voltak a technológia során bekövetkezett történések hatásai a DNS-re, mint például a fragmentumtörés, vagy a mátrix hatás. Ezek elsősorban a DNS izolálás során befolyásolták a DNS mennyiségét, beleértve a sokszorozásnál kritikus DNS méretet is.

A mátrixból a megváltozott méretű DNS fragmentumok elegendő mennyiségben és minőségben történő kivonása céljából az élelmiszeralkotók közül a fehérjék, zsírok, poliszacharidok, polifenolok (tannin) és egyéb ingrediensek eltávolítása az elsődleges lépés, mivel

ezek számos esetben irreverzibilis kapcsolatot alakítanak ki a termékben található nukleinsavakkal, megnehezítve a kinyerést (Bálint, 2000a).

Az alkalmazott DNS alapú módszerek kiválasztásánál figyelembe kell venni az összetétel okozta DNS-izolálási nehézségek mellett a feldolgozási technológia során bekövetkező átlagos DNS-lánchossz csökkenést is. A hőkezelés, sterilizálás, sütés, de bármiféle fizikai vagy kémiai kezelés (pl. pH, hőmérséklet, nyíró erők) a DNS károsodásához vezet és a különböző helyeken bekövetkező lánc-törések miatt a kimutatás lehetetlenné is válhat.

A DNS degradáció ellenére az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a fehérje molekulákhoz képest a DNS lényegesen jobb állapotban megmarad ezekben az élelmiszer mátrixokban, így jobb nyomkövetést tesz lehetővé. Tilley (2004) kutatásai szerint, aki a kenyérgyártás folyamatát vizsgálta DNS alapú detektálással, a kis és nagy kópiaszámban lévő gének kimutatása egyaránt lehetséges volt még a végtermék esetében is. A DNS molekula relatív stabilitását bizonyítja az is, hogy a nyomokban előforduló élesztő DNS-ét is detektálni tudta egészen a technológia végéig.

#### **2.5.2.1. PCR alapú technikák**

A PCR-technika, azaz a polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction), olyan *in vitro* módszer, amellyel a sejtek genetikai információját hordozó DNS célszekvenciáit enzimatikus reakció segítségével megsokszorozhatjuk (amplifikálhatjuk). A módszer három alaplépése a megfelelő tisztaságú DNS izolálása, a DNS-szakaszok hőstabil polimeráz enzimmel történő felsokszorozása, végül a DNS termékek azonosítása.

A módszer alapjának tekinthető DNS sokszorozást (amplifikációt) már a 70-es évek elején leírták, de akkor még annyira nehézkes volt a kivitelezése, hogy a módszer sokáig nem tartott nagy érdeklődésre számot. Rohamos fejlődésnek a nyolcvanas évek közepén, a DNS szintetizáló készülékek bevezetésével egyidőben indult meg. A technika részleteit és láncreakcióvá fejlesztését K. B. Mullis dolgozta ki 1985-ben (Mullis, 1987), aki e területen végzett munkásságáért 1993-ban Nobel díjat kapott. A láncreakcióvá fejlesztett technika lényege, hogy néhány óra lefutása alatt ciklikus hőmérséklet változtatással kevés DNS molekulából milliárdos kópiaszámú fragmentum állítható elő, amely már alkalmas a kimutatásra (Candrian és Lüthy, 1991). A technika sikere nem kis mértékben az úgynevezett hőstabil *Taq* polimeráz enzimnek köszönhető, melynek felfedezése sarokpont a technika alkalmazhatósága szempontjából. A *Taq* polimeráz egy, a *Thermus aquaticus* nevű baktériumból izolált DNS-polimeráz. A *Thermus aquaticus*-t a Yellowstone Nemzeti Park egyik gejzírjében találták, ez garanciát jelentett arra, hogy a belőle kinyert enzim tolerálja majd a reakciót kísérő hőingadozást és nem inaktiválódik.

Beszélhetünk kvalitatív, fél-quantitatív és quantitatív PCR technikáról is (hagyományos kvalitatív vagy fél-quantitatív PCR, ahol az amplifikált DNS szakaszok azonosítása utólagosan

történik; kvantitatív valós idejű (real-time) PCR, ahol az amplifikált DNS szakaszok azonosítása az amplifikációval egy időben történik).

A megfelelő tisztaságú DNS izolálása különösen fontos ennél a technikánál, hiszen kis anyagmennyiségekkel dolgozunk. Zimmermann és munkatársai (1998) 9 különböző DNS extrakciós eljárást hasonlítottak össze szója minták elemzése során. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a DNS-kötő gyantát felhasználó módszerek, mint a WIZARD, DNeasy, Nucleon Phytopure esetében, valamint a CTAB módszer alkalmazásakor viszonylag alacsony hozamú, de igen jó minőségű DNS nyerhető. Ugyanakkor az egyszerűbb, gyorsabb és olcsóbb eljárások, mint a ROSE, alkáli vagy a Chelex 100 viszonylag nagyobb hozamú, de gyenge minőségű DNS-t eredményeznek. Mindegyik módszert arra fejlesztették ki, hogy a DNS-t minden más biomolekulától, szerves és szervetlen vegyülettől elválassza (proteinázos, RN-ázos emésztéssel; kloroformos extrakcióval, ethanolos mosással; stb.). Ez a cél az élelmiszer-mátrixok esetében is, habár egyes mintákban nagyon kevés és nehezen hozzáférhető a DNS tartalom. Gabonamagok esetében különösen fontos megemlíteni, hogy a poliszacharidok a DNS kinyerésénél jelentős gondokat okozhatnak (Sharma et al., 2000; Varma et al., 2007). Szintén gabonaminták vizsgálatánál kell azzal számolni, hogy a jelentős mennyiségben jelenlévő lipid transzfer proteinek (például: LTP1) ellenállnak a proteinázoknak, ezáltal a minta fehérje-szennyezettsége megnőhet (Jones és Marinac, 2000). Számos kísérlet bizonyította, hogy a gabonafélék és pszeudocereáliák magjában hőstabil proteáz inhibitorok vannak, amelyek akadályozhatják a DNS feltárás során a proteináz enzim működését (Belozersky et al., 1995; Tsybina et al., 2001). A mintákban így jeletős mennyiségű fehérje maradhat.

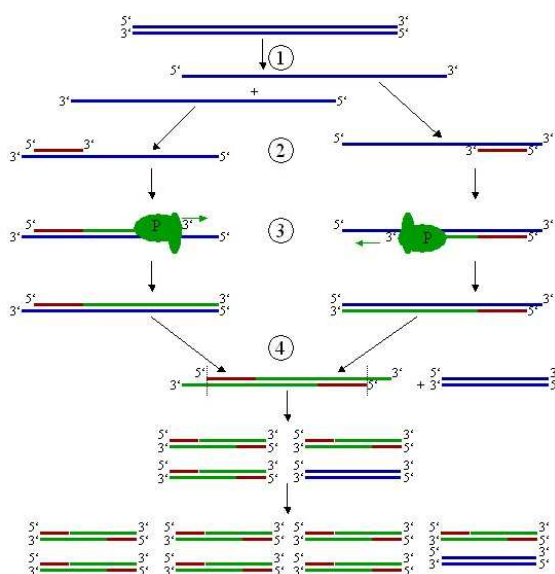
A kinyert DNS-oldat tisztaságának és koncentrációjának meghatározására spektrofotométeres mérés alkalmazható, mely során megállapítható az oldat koncentrációja és tisztasága. Amennyiben a minta 260 nm hullámhosszon mért abszorbancia értéke 1,0 - az megfelel 50 µg/ml koncentrációjú, duplaszálú DNS oldatnak. Az oldat tisztaságára vonatkozó információt a 260 nm-en és 280 nm-en mért abszorbancia hányadosa adja, amelyet R értéknek nevezünk. Ez akkor megfelelő, ha ennek a hányadosnak az értéke 1,7-2,0 között van. 1,7 alatti értéknél az oldat fehérjével, 2,0 felettinél pedig a mintaoldat RNS-sel szennyezettnek tekinthető (Maniatis et al. 1989). Ezenkívül az extrahált DNS tisztaságának megállapítására agaróz gélelektroforézist követő denzitométeres kiértékelés használható etidium-bromidos vagy fluoreszcens festést követően.

A következő lépés a DNS-szakaszok hőstabil polimeráz enzimmel történő felsokszorozása. A PCR reakció lánckezdő rövid, egyszálú oligonukleotidok (primerek) jelenlétében, a hőmérsékletet gyorsan és pontosan változtatni képes készülékben, úgynevezett thermocyclerben történik. A DNS-

fragmentumok enzimatisz fellszaporításához két olyan oligonukleotid primer felhasználása szükséges, amelyek a célszekvenciák mindkét szálának 5' végével komplementerek. Az egyszálúsított templátról a DNS polimeráz a primertől kiindulva 5'-3' irányban komplementer szálát szintetizál, hasonló módon, mint ahogy az általában az élő sejtekben is végbemegy.

A PCR-reakció hőmérsékleti ciklusok sorozatából áll, egy ciklus pedig a következő lépésekből áll (3. ábra):

- Denaturálás: a szaporítandó kettős DNS-szál 93-95°C körüli hőmérsékleten egyszálúsá denaturálódik.
- Primer kötődés (annealing): a hőmérséklet 50-60°C-ra csökkentésével a rövid, általában 8-20 nukleotidból álló szintetikus egyszálú oligonukleotid molekulák, a primerek kapcsolódnak a célszekvenciákhoz. A primerek a megsokszorozandó párhuzamos, denaturálódott DNS lánc két végéhez kötődnek, ellenkező irányból. Az épülő DNS szál „építőkövei” a dNTP-k.
- Lánchosszabbodás: 72-75°C-on a hőstabil DNS *Taq* polimeráz az egyszálú templát DNS-hez kapcsolódó primerek 3' végeit meghosszabbítja (elongáció), és ezzel egyidőben megtörténik a templát DNS-sel komplementer szál szintézise (extenzió) is 5'-3' irányban.



### 1. lépés

Denaturáció 94°C-on

### 2. lépés

Primerkapcsolódás

50 - 60°C-on

### 3. lépés

Lánchosszabbítás (P – polimeráz enzim)

72-75°C-on

### 4. lépés

Az első ciklus véget ért. Az eredményül kapott két DNS-szál a következő ciklus templátja lesz, azaz minden ciklusban megkétszereződik a DNS mennyisége.

(Forrás: <http://hu.wikipedia.org/wiki/PCR>)

**3. ábra** A polimeráz láncreakció egy termociklusában lezajló folyamatok elvi vázlata

Ezzel az első ciklus befejeződik, és olyan kettős szálú DNS molekulát kapunk, amely a primert is tartalmazza. A molekulák újbóli denaturálásával kezdődik a második ciklus, az új kópiák templátként szolgálnak, ennek következtében a DNS molekula mennyisége minden ciklusban megkétszereződik.

A hőmérsékleti ciklusok megkezdése előtt a reakció specifikusságának és hatékonyságának növelése érdekében elődenaturációt, az összes hőmérsékleti ciklus lezajlása után pedig szintén a fent említett célból utólagos lánchosszabbítást szoktak alkalmazni.

A ciklusok számát az határozza meg, hogy mennyi cél-DNS-re van szükség. Pikogrammnyi DNS-ből 30-40 ciklus alatt mikrogrammnyi mennyiséget lehet előállítani, viszont 40 ciklus után már nem növekszik exponenciálisan a DNS mennyisége, mert gátló hatás lép fel. Ez az úgynevezett plató fázis.

A plató fázist előidéző faktorok:

- *Taq* DNS-polimeráz inaktiválódása,
- *Taq* DNS-polimeráz limitáló koncentrációja,
- primerek és dNTP-k koncentrációjának folyamatos csökkenése
- denaturáció hatékonyságának ciklusonkénti csökkenése,
- primer kapcsolódás hatékonyságának csökkenése,
- termék bomlása a polimeráz enzim 5'-3' endonukleáz aktivitása miatt.

A PCR reakció során több hibalehetőséggel kell számolni, mert a módszer igen érzékeny, és az eljárás nagyon kicsi anyagmennyiségeket alkalmaz (Yap et al., 1994). A primer kapcsolódási helye specifikus, így elviekben csak a megfelelő nagyságú DNS-fragmentumok képződnek, de a rosszul megválasztott hőmérsékletek, anyagmennyiségek miatt ez a gyakorlatban nem mindig van így. Ezek a hibák a hagyományos PCR technika során agaróz vagy akrilamid gélen elektroforézises elválasztással kimutathatók, valós időben (real-time PCR) pedig a generált jelek számítógépen detektálhatóak és a rendszer tovább optimálható. A reakció optimálása (Hajósné, 1999; Bálint, 2000a és 2000b) során az enzim működéséhez szükséges  $MgCl_2$ , a DNS és a primerek koncentrációja tág határok között változhat. A hőmérsékleti ciklusokon belüli hőmérsékletek finom változtatásával szintén növelhető a specifikusság. Nem teljesen optimális körülmények között, illetve magas primer koncentrációk esetén nem specifikus DNS szakaszok vagy „primer-dimerek” (primer párok egymással kapcsolódnak össze) is sokszorozódhatnak.

Egy másik hibalehetőség az inhibitorok jelenléte a mintákban a láncreakció során. Elméletileg a reakcióval igen kis mennyiségű, akár 1 kópia DNS sokszorozása is lehetséges, azonban egyes PCR inhibitorok az élelmiszeranalitikai célú vizsgálatokra alkalmazott módszerek esetében igen

jelentős gátló tényezők lehetnek. Inhibitorok lehetnek az élelmszerösszetevők, mint pl. a szénhidrát komplexek, enzim inhibitorok vagy az izolálás során használt vegyszerek. Rossen és munkatársainak (1992) kutatási eredményei azt bizonyították, hogy a nátriumklorid, a szacharóz és maga a kivont DNS is gátolhatja a polimeráz láncreakciót. Az extrakció során felhasznált vegyszerek közül az SDS, az etanol, az EDTA, a guanidin-izotiocianát és a CTAB szintén ilyen inhibitor hatású lehet. Ezeket az eredményeket Wilson (1997) kutatásai is alátámasztják, ezenkívül bizonyítják a zsírok, pollenek, laboratóriumi műanyag és cellulóz gátló hatását is. Gabonamag mintáknál bizonyos poliszacharidok jelentős PCR inhibitorok is lehetnek (Sharma et al., 2000; Varma et al., 2007). Rogers és munkatársai (1996) gabona levelekből és magokból izoláltak DNS-t, de főleg mag DNS-ek esetében tapasztaltak inhibíciót a PCR során. Fang és munkatársai (1992) előzőleg refrakciós úton, míg Rogers és munkatársai (1996) enzimatisz módszerrel próbálták megmérni az izolátumok poliszacharid tartalmát, de ezekkel a módszerekkel nem találtak bennük mérhető mennyiséget. Rether és munkatársainak (1993) javaslata alapján az ilyen típusú szennyeződések glikozid-hidrolázok alkalmazásával, majd fenol/kloroformos mosással jó hatásokkal eltávolíthatók.

Az inhibitorok elsődleges kiszűrésére a fent már említett spektrofotométeres mérés alkalmazható. A további inhibitor hatás vizsgálatára célszerű egy belső kontroll PCR reakció használata, még a specifikus PCR reakció használata előtt. Ilyen kontroll PCR lehet a növényi DNS esetében a B49317 és A49855 kloroplasztisz DNS primer pár, amelyik a *trnL* (UAA) gén intronjának egy nem kódoló szakaszát amplifikálja. Taberlet és munkatársai (1991) populációs és evolúciós biológiai kísérletek során fejlesztették ki ezt a primer párt, mellyel növények inter-, és intraspecifikus filogenetikai vizsgálatait végezték. Ez a primer pár a DNS amplifikálhatóságát és növényi eredetét hivatott bizonyítani, hiszen széles taxonómiai határok között sokszorozható vele a cpDNS ezen nem kódoló régiója. A DNS amplikon hosszúsága függ a növény rendszertani besorolásától. A cikk szerint a rizs 614 bp hosszú amplikont eredményezett, de ezen kívül a szerzők vizsgáltak más szegfűvirágúak, fészekvirágúak és boglárkavirágúak rendjébe tartozó növényeket is.

A felsorolt hibák kiküszöbölésére sok hasznos irodalmi forrás és protokoll jelent meg ([www.promega.com](http://www.promega.com), Protocols&Applications Guide; Innis et al., 1990).

A technika utolsó lépése a DNS termékek azonosítása. A keletkezett különböző hosszúságú DNS-fragmentumok gélelektroforézissel nagyság szerint elválaszthatók egymástól. Az elektroforézis elve az, hogy az oldatban lévő különböző molekulatömegű és töltésű részecskék az elektródák közti elektromos erőtér hatására töltésük szerint vándorolnak. A DNS töltése negatív, ezért elektromos térben a DNS darabok méret szerint válnak el. Az agaróz vagy poliakrilamid gélen

történő elektroforézises elválasztás során, a rövidebb DNS–fragmentumok tovább futnak a gélben, mint a hosszabbak. A várható DNS részletek hossza, több részlet esetén a hosszak közötti különbségek alapján a gélek anyaga (poliakrilamid vagy agaróz), illetve töménysége (%-os formában) megválasztható. A keletkezett DNS szakaszok hosszát becsülni lehet a velük együtt futtatott DNS molekula méret (bp) marker segítségével. Az elektroforézis után a gélben lévő szabad szemmel láthatatlan molekulákat gélfestéssel láthatóvá kell tenni. DNS-fragmentumok futtatása esetén a gélfesték lehet etidium-bromid, SYBR Green gélfesték vagy más interkalálódni képes festék, amely a DNS-száiba beépül és UV fény hatására láthatóvá válik (Ausubel, 1989).

Valós idejű PCR esetében a keletkező fragmentumok mérése a hozzáadott SYBR Green festék, vagy a különböző próbák (TaqMan, Molecular beacon, Scorpions) segítségével számítógépes jelet generál és azonnali kiértékelést, illetve mennyiségi meghatározást tesz lehetővé, megspórolva ezzel a gélelektroforézis lépést (Bálint, 2000b).

#### ***2.5.2.2. Egyéb nukleinsav alapú, illetve PCR termék alapú módszerek***

Léteznek olyan kvalitatív vagy kvantitatív PCR módszerek, amelyeknél a láncreakciót nem elektroforézises kiértékelés követi, illetve a láncreakció és az elektroforézises futtatás között egyéb lépéseket alkalmaznak a pontosabb eredmény elérése céljából. Ezeken kívül itt meg kell említeni olyan nukleinsav alapú módszereket is, amelyek nem polimeráz láncreakcióra épülnek.

A PCR-restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus (PCR-RFLP) fajspecifikus azonosításra igen széles körben használt módszer. Alkalmazása annyiban tér el az egyszerű PCR-rendszerétől, hogy a primerpárral kapott PCR-terméket egy vagy több restrikciós enzimmel hasítják, így több kisebb méretű fragmentum keletkezik. A restrikciós enzimek általában specifikus, 4-8 nukleotid hosszú szekvenciát ismernek fel a DNS-láncban és azt, annak meghatározott pontjain hasítják. Az így keletkezett DNS-fragmentumok nagyság szerint poliakrilamid vagy agaróz gélen elválaszthatók és a kapott jelek mérete és száma lesz fajra jellemző (Bálint, 2000b).

A PCR-ELISA egy a PCR és az ELISA technika összeolvasztásával nyert új kvantitatív eljárás, amely a polimeráz láncreakció során keletkező amplikonokat használja fel kiindulópontként a további ELISA-szerű detektálási eljáráshoz. A PCR reakció ebben az esetben csak annyiban más, hogy biotinnal jelölt primereket alkalmaznak. A keletkező biotinilált amplikonokat streptavidinnel bevont mikrotiter lemezre kötik. A DNS szakaszok denaturációja után a meg nem kötött egyszálú DNS részeket eltávolítják, majd a megkötött részeket szekvencia specifikus jelölt oligonukleotid próbákkal hibridizáltatják. A próbák detektálása enzimjelzéses antitesttel történik, mely az enzim-



szubsztrát hozzáadásával kiváltott színjelzés intenzitásának mérésével határozható meg (Holzhauser et al., 2006).

A PCR-ELISA tulajdonképpen a PCR módszer harmadik lépését, a gélelektroforézist váltja ki egy kvantitatív lépéssel, amely során meghatározható a jelen lévő specifikus DNS mennyisége.

Egyéb hibridizáción alapuló technikák is szóba jöhetnek allergének, így a glutén mérésénél is, de ezek főként a kapott PCR szakaszok specifikusságának ellenőrzésére alkalmazhatók (Southern blot)(Bálint, 2000a), vagy bizonyos gyorsesztek kifejlesztésére használhatók, mint amilyenek az előszűrésre alkalmas tesztsíkok. Ilyen technikák kifejlesztése még folyamatban van.

### ***2.5.2.3. A DNS alapú allergén kimutatási módszerek kialakulása és fejlődése***

Az allergének DNS alapú kimutatását számos genetikai kutatás támasztja alá, hiszen szükséges volt a megfelelő genetikai alapok feltérképezése, az allergének keresztreakciói, a genetikai rokonságok megállapítása, illetve a konzervatívabb és variábilisabb szekvenciák meghatározása a megfelelő primer kiválasztása előtt. A glutén DNS alapú kimutatásához az egyik ilyen genetikai forrás volt a gabonafélék markerezése során feltérképezett szekvenciák, melyek kiinduló pontjai lehetnek az egyedi, specifikus részletek detektálásának cöliákias tüneteket okozó gabonafélék esetében.

Ko és munkatársai (1994) olyan primer párok tervezésén dolgoztak, melyekkel elkülöníthetők voltak a különböző gabonafajok egymástól. 5S riboszómális RNS gének közti spacer szekvenciára terveztek primer párt, illetve ezen kívül RAPD primereket használtak az elkülönítésre. A két primer közül gabonafélék keverékei esetében a spacer szekvenciára tervezett primer bizonyult hatékonynak. Devos és munkatársai (1995) markerezésre használtak két, prolamin fehérjét kódoló gén mikroszatellit régiójában ((CAG)(CAA) ismétlődések) sokszorozó primer párt, melyek közül a P1/P2 primert (mikroszatellit (SSR) primer pár, mely az LMW glutenin gén mikroszatellit régiójában sokszoroz az 1A lokuszon) később Törjék és munkatársai (2001 és 2002) próbálták meg különböző búza vonalak elkülönítésére alkalmazni. A primer pár segítségével nem találtak különbségeket az említett búza vonalak között, így ez a primer pár, prolamin-specifikussága miatt, lehetőséget adott a búza általános detektálására.

Az allergének, illetve azokon belül a glutén, mint élelmiszer kontamináns DNS alapú detektálásának kezdetei az 1990-es évek elejére tehető. A terület fontosságára több olyan haláleset is ráirányította a tudományos figyelmet, melyeket élelmiszerekben nyomokban előforduló allergén anyagok okoztak.

Allmann és munkatársai (1993) az ELISA módszerek alternatívájaként emlegetik az általuk kidolgozott PCR módszert. Az általuk használt TR01/TR02 primer pár egy 109 bp hosszú fragmentumot sokszoroz a búza riboszómális RNS génjének 25S és 18S lokusza között lévő intergenikus régió egy sűrűn ismétlődő szakaszán. Ezt a módszert használták emulgeátorok, lisztek keményítők, instant levesporok, polenta, curry és más élelmiszerek szűrésére (Meyer és Candrian, 1996). Ugyanezt a primer párt használták Köppel és munkatársai (1998) 5 különböző országból származó müzli összetevők ellenőrzésére. A vizsgálataikat kiegészítették a toxicitás szempontjából kérdéses zab DNS detektálására képes primer pár használatával, így bizonyítva több esetben is a zab jelenlétét. Szintén a TR01/TR02 primer párt adaptálták 1998-ban Szamos és munkatársai magyar gyártású zsemlemorzsa, kekszek és húsleves kockák szűrésére.

A búza, rozs és árpa egyidejű szűrését élelmiszerekből Dahinden és munkatársai (2001) által tervezett primer pár alapozta meg, mely specifikusan csak a búza, árpa és a rozs kloroplasztisz DNS trnL gén intronjának egy nem kódoló szakaszát amplifikálja (a búza és a rozs esetében 201 bp, árpa esetében 196 bp amplikon). Kísérleteik során ezzel a primer párral vizsgáltak különböző gabonaféléket és keményítőtartalmú magvakat, mint például: búza, tönkölybúza, árpa, rozs, zab, kukorica, szója, szezám, veteménybab, napraforgó, sárgaborsó, hajdina, rizs, köles. Ezen minták közül, a WBR11/WBR13 primer pár alkalmazásával, csak a búzára, tönkölybúzára, árpára és rozusra kaptak pozitív jelet. További kísérleteik során vizsgáltak még hőkezelt élelmiszereket is (kenyereket, tésztákat és bébiételeket), melyeknél szintén sikerrel tudták alkalmazni ezt a primer párt a toxikus gabonafélékkel való szennyezettség kimutatására. Ugyanazokkal a mintákkal a PCR-vizsgálatok mellett párhuzamosan ELISA vizsgálatokat is végeztek a kontamináció szűrésére. Ezek az eredmények jól bizonyították a DNS módszer szükségességét és alkalmazhatóságát, a fals-pozitív, illetve fals-negatív eredmények kizárására. Ezeket az információkat felhasználva az Európai Unió 5. keretprogramjának „MolSpec-ID” nevű kollaboratív projektjének keretein belül Kuchta (2004) az RFLP analízissel kibővített módszerrel laboratóriumok közötti körvizsgálatot indított. A körvizsgálat során instant bébitápszereket szűrték meg a módszer segítségével. A körvizsgálat eredményeiről Olexová és munkatársai (2006) számoltak be az eredmények kiértékelése után. Bebizonyosodott, hogy a módszer elég érzékeny, megbízható és gyors, hogy rutin módszerként elterjedjen. Az eredményekből kiindulva Mujico és Méndez (2005) valós idejű PCR módszert fejlesztettek ki a primer pár segítségével, melyet párhuzamosan alkalmaztak R5 ELISA vizsgálattal. A kísérlet során bizonyítást nyert a lineáris korreláció a mérések során használt minták prolamintartalma és a DNS mennyisége között (0,5 ng DNS/mg élelmiszer ekvivalens 20 mg/kg prolaminnal).

2003-ban Sandberg és munkatársai eljárásokat dolgoztak ki a búza detektálásán kívül a rozs, a zab és az árpa DNS alapú szűrésére is. A 4 gabonafajra 4 különböző primer párt terveztek. A primer párok tervezésénél figyelembe vették a tartalék fehérjét kódoló gének egy ősgéntől való származását. Főleg liszteket, tésztákat, kuskuszt, fagylalt-, és süteményporokat vizsgáltak a módszerükkel.

2004-ben Delano és Schmidt kutatásai már építenek a meglévő genetikai információkra. Munkatársaikkal egyetlen primer párt terveztek, mely különböző hosszúságú fragmentumokat sokszoroz a repce, a kukorica, a burgonya, a szója, a rizs, a mogyoró és a búza genomjában, pontosabban a kloroplasztisz tRNS gén *trnL* (UAA) régiójában. A *trnL* (UAA) részlet katalitikus tulajdonságainak köszönhetően kevésbé variábilis, mint az intergénikus spacer régiók. A tRNS gének sokkal konzervatívabbak, mint a fehérjét kódoló, vagy riboszomális gének, ezért minimális eltéréseik miatt alkalmasabbak több faj együttes jellemzésére.

Szintén 2004-ben fejlesztették ki (Terzi et al.) az első valós idejű PCR módszert rozs detektálására nyersanyagokból és késztermékekből. A módszert SYBR Green festékre és TaqMan próbára is kidolgozták. A módszer alkalmazása során kiderült, hogy tritikálé is detektálható vele. 2005-ben ezt egy másik valós idejű PCR vizsgálat követte (Hernandéz et al.), amely négy, egymástól független real-time PCR mérésből állt és a szerzők az árpa  $\gamma$ -hordeinének DNS szekvenciájára, a rizsnek a *gos9* DNS szekvenciájára, a napraforgó heliantininének DNS szekvenciájára, illetve a búzának az acetyl-CoA karboxiláz DNS szekvenciájára terveztek primereket és Taq-Man próbákat. A módszert hőkezelt élelmiszereken (kekszek, kenyerek) és kevés DNS tartalmú élelmiszer-mintákon (olaj, sör) is tesztelték.

Terzi és munkatársai 2005-ös összefoglaló publikációja szerint az eddig felsorolt összes módszert sikeresen alkalmazták, adaptálták nyomokban előforduló gabonafélék szűrésére, így mindegyik alkalmas rutinvizsgálatok végzésére. A publikációból az is kiderül azonban, hogy mindegyik módszernek voltak hátrányai a minták komplexitásai miatt, tehát nem mondható, hogy egy módszer metodikája megfelelne az összes élelmiszer minta esetében. Ez a tény mindenképpen indokolja a további módszerfejlesztést. Ennek egyik legújabb eredménye az R-Biopharm cég által kifejlesztett real-time PCR készülékre kidolgozott kit, amelynek neve 'SureFood® ALLERGEN Gluten real-time PCR' és méréshatára  $< 5$  DNS kópia /  $< 5$  ppm ([www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)).

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Az irodalmi adatok ismeretében munkám célja olyan primer-pár kombinációk bevezetése volt a magyarországi glutén kimutatás fejlesztése érdekében, amelyek megbízhatóan, illetve jól reprodukálhatóan alkalmazhatóak a búza és a vele keresztreakciót mutató gabonák nyomainak kimutatására az élelmiszerek széles spektrumában (pl.: nyers, hőkezelt, feldolgozott élelmiszerek, kontaminált gluténmentes élelmiszerek). Olyan DNS-alapú PCR-módszerek fejlesztése volt a cél, amelyek rutinvizsgálatokká válva jól kiegészítik és alátámasztják a glutén fehérje alapú detektálásának eredményeit olyan kérdéses esetekben, amelyeknél kétely merül fel a mért értékeket illetően.

A fentiek ismeretében fő céljaim az alábbiakban összegezhetők:

- Olyan primer pár kombinációk adaptálása, amelyek az élelmiszerek széles spektrumában alkalmazhatók megbízhatóan a Magyarországon köztermesztésben lévő búzafajták és velük keresztreakciót mutató egyéb gabonafajok esetleges jelenlétének kimutatására.
- A gabona mintákból izolált növényi DNS, illetve feldolgozott élelmiszermintákból kivont DNS sokszorozhatóságának (A49855/B49317 primer pár), eredetének (TR01/TR02 primer pár; WBR11/WBR13 primer pár) bizonyítása, illetve az allergén részletet kódoló DNS jelenlétének megállapítása (P1/P2 primer pár).
- Az adaptált és fejlesztett módszerek tesztelése egy gluténmentes terméket gyártó technológiai sor megállapított kritikus pontjainál az esetleges szennyeződés kiszűrésére nyomonkövetéses kísérlettel. Ugyanezen módszerek segítségével a technológiai sor mesterséges szennyezése után a gabonafélék végtermékből való kimutathatóságának tesztelése.
- Az adaptált és fejlesztett módszerek alkalmazása egy különleges fogyasztási célra szánt gluténmentes termék példáján keresztül.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Minták

#### 4.1.1. Módszerek beállításához használt minták

A módszerek optimalizálása olyan teljes kiőrlésű lisztek segítségével történt, melyeket a búza, rozs, árpa, tritikálé, zab, rizs, kukorica, hajdina és amaránt különböző, Magyarországon elterjedt fajtáiból nyertem (**3 - 6. táblázat**). A hőkezelés hatásainak vizsgálata során kenyerek, száraztészták és főzött tészták (**3. táblázat**) szolgáltak modellként. A vizsgált mintákat a Szegedi Gabonakutató Kht. (Szeged), a Klorofill Bt. (Kecskemét) és a Dél Gabona Malomipari Rt. (Szeged) bocsátotta rendelkezésemre. A nyers gabonaminták hántolatlan, szemes formában érkeztek, ezért a liszt finomságú őrlemények előállítása Retsch GRINDOMIX GM200-as darálóval történt. A kenyerek és a tészták esetében szárítás után szintén darálással jutottam a további felhasználáshoz megfelelő szemcsemérethez (<1000 µm).

##### 4.1.1.1. Búzafajták és belőlük készült hőkezelt minták

A **3. táblázatban** található azok a minták, amelyek a primer párok működési körülményeinek teszteléséhez és a módszerek optimalizálásához feltétlenül szükségesek voltak. A kiválasztási szempontok (pl. különböző búza fajták és különböző feldolgozottsági szintű minták) elsősorban olyanok voltak, amelyek segítették a primer párok működőképességének vizsgálatát.

#### 3. táblázat A módszerek optimalizálásánál használt búzafajták és különböző hőkezelt minták

Minták	Egyéb jellemzők	Minták jelölése a továbbiakban
Búza ( <i>Triticum aestivum</i> )	CY-45 Q (2001) vegyszermentes termesztés; származás: GK Kht.	Búza „CY-45 Q”
Búza ( <i>Triticum aestivum</i> )	T-128 Q (2001) vegyszermentes termesztés; transzgén vonal; származás: GK Kht.	Búza „T-128 Q”
Búza ( <i>Triticum aestivum</i> )	CY-45 Grandstar (2001) vegyszeres termesztés; származás: GK Kht.	Búza „CY-45 Grandstar”
Búza ( <i>Triticum aestivum</i> )	T-128 Grandstar (2001) vegyszeres termesztés; transzgén vonal; származás: GK Kht.	Búza „T-128 Grandstar”
Búza ( <i>Triticum aestivum</i> )	Izabella (évjárat: nem ismert) kereskedelmi forgalomban lévő liszt, származás: Dél Gabona Malomipari Rt. (Szeged)	Búza „Izabella”
Búza ( <i>Triticum durum</i> )	D-78 (2004) származás: GK Kht.	Búza „D-78”
Aestivum lisztből készült száraztészta	Izabella lisztből 25 °C-on szárított; alapanyag származása: Dél Gabona Malomipari Rt. (Szeged); összetétel: liszt, víz	„Izabella” száraztészta

Minták	Egyéb jellemzők	Minták jelölése a továbbiakban
Durum lisztből készült száraztészta	D-78 lisztből 25 °C-on szárított; alapanyag származása: GK Kht.; összetétel: liszt, víz	„D-78” száraztészta
Aestivum tészta (5 percig főzött)	100 °C-on 5 percig főzött	5 percig főzött „Izabella” száraztészta
Aestivum tészta (10 percig főzött)	100 °C-on 10 percig főzött	10 percig főzött „Izabella” száraztészta
Durum tészta (5 percig főzött)	100 °C-on 5 percig főzött	5 percig főzött „D-78” száraztészta
Durum tészta (10 percig főzött)	100 °C-on 10 percig főzött	10 percig főzött „D-78” száraztészta
Búza kenyerek (4 minta)	Alapanyaga CY-45 Q liszt (2001); 260 °C-on 25 percig sütött; származás: GK Kht.	CY-45 Q kenyerek
Búza kenyerek (transzgén búzából) (3 minta)	Alapanyaga T-128 Q liszt (2001); 260 °C-on 25 percig sütött; származás: GK Kht.	T-128 Q kenyerek

#### 4.1.1.2. Búzával keresztreagáló gabonafélék és pszeudocereáliák

A búza, árpa, rozs, tritikálé, zab, rizs, kukorica, amaránt és hajdina fajoknak a magyarországi köztermesztésből válogatott fajtái a **4-6. táblázatokban** találhatóak. A minták kiválasztásánál egyrészt a különböző módszerekkel a lisztérzékenységi tüneteket okozó gabonafajok elkülönítése volt a cél. A különböző fajták vizsgálata a módszerek specifikusságának tesztelésére irányult.

**4. táblázat** Búza és vele keresztreagáló gabona minták (Magyarországon köztermesztésben lévő fajták)

Minták	Egyéb jellemzők	Minták jelölése a továbbiakban
Búza ( <i>Triticum spelta</i> )	ÖKO-10 tönköly búza (2004); származás: GK Kht.	Búza „ÖKO-10”
Búza ( <i>Triticum durum</i> )	D-78 durum búza (2004); származás: GK Kht.	Búza „D-78”
Búza ( <i>Triticum aestivum</i> )	GK Cipó (2004) ; származás: GK Kht.	Búza „GK Cipó”
Árpa ( <i>Hordeum vulgare</i> )	STC I. 22-03 (2004); tavaszi; származás: GK Kht.	Árpa „STC I. 22-03”
Árpa ( <i>Hordeum vulgare</i> )	GK Rezi (2004); őszi; származás: GK Kht.	Árpa „GK Rezi”
Árpa ( <i>Hordeum vulgare</i> )	GK Árpád (2005); őszi, csupasz; származás: GK Kht.	Árpa „GK Árpád”
Rozs ( <i>Secale cereale</i> )	GK Wibro (2004); származás: GK Kht.	Rozs „GK Wibro”
Rozs ( <i>Secale cereale</i> )	Matador (2004); származás: GK Kht.	Rozs „Matador”
Rozs ( <i>Secale cereale</i> )	Gamet (2004); származás: GK Kht.	Rozs „Gamet”
Tritikalé ( <i>Triticale rimpai</i> )	Kargo (2004); Spring Triticale (tavaszi); STc 2 normál; származás: GK Kht.	Tritikalé „Kargo” normál

Minták	Egyéb jellemzők	Minták jelölése a továbbiakban
Tritikalé ( <i>Triticale rimpai</i> )	Kargo (2004); Spring Triticale (tavaszi); STc 2 stresszelt; származás: GK Kht.	Tritikalé „Kargo” stresszelt
Tritikalé ( <i>Triticale rimpai</i> )	EMBR 18 (2004); Spring Triticale (tavaszi); STc 5 normál; származás: GK Kht.	Tritikalé „EMBR 18” normál
Tritikalé ( <i>Triticale rimpai</i> )	EMBR 18 (2004); Spring Triticale (tavaszi); STc 5 stresszelt; származás: GK Kht.	Tritikalé „EMBR 18” stresszelt

**5. táblázat** Búzával nem keresztregáló gabona minták (Magyarországon köztermesztésben lévő fajták)

Minták	Egyéb jellemzők	Minták jelölése a továbbiakban
Rizs ( <i>Oryza sativa</i> )	Janka (2003); származás: GK Kht.	Rizs „Janka”
Rizs ( <i>Oryza sativa</i> )	Bioryza (2003); származás: GK Kht.	Rizs „Bioryza”
Rizs ( <i>Oryza sativa</i> )	Ábel (2003); származás: GK Kht.	Rizs „Ábel”
Kukorica ( <i>Zea mays</i> )	Sze TC 269 (hibrid neve) (2004); FAO 200 (Éréscsoport); származás: GK Kht.	Kukorica „Sze TC 269”
Kukorica ( <i>Zea mays</i> )	Ella SC (hibrid neve) (2004); FAO 300 (Éréscsoport); származás: GK Kht.	Kukorica „Ella SC”
Kukorica ( <i>Zea mays</i> )	Sze SC 352 (hibrid neve) (2004); FAO 300 (Éréscsoport); származás: GK Kht.	Kukorica „Sze SC 352”
Amaránt ( <i>Amarantus moleros</i> )	Róza (2005); származás: GK Kht.	Amaránt „Róza”
Amaránt ( <i>Amarantus cruentus</i> )	Maros (2005); származás: GK Kht.	Amaránt „Maros”
Amaránt ( <i>Amarantus hypochondriacus</i> )	Edit (2004); származás: Klorofil Bt.	Amaránt „Edit”
Hajdina (pohánka) ( <i>Fagopyrum esculentum</i> )	430 törzs (2003); származás: GK Kht.	Hajdina „430 törzs”
Hajdina (pohánka) ( <i>Fagopyrum esculentum</i> )	P425 törzs (2004); származás: GK Kht.	Hajdina „P425 törzs”
Hajdina (pohánka) ( <i>Fagopyrum esculentum</i> )	P427 törzs (2004); származás: GK Kht.	Hajdina „P427 törzs”

**6. táblázat** Keresztreakció szempontjából nem egyértelmű besorolású gabona minták (Magyarországon köztermesztésben lévő fajták)

Minták	Egyéb jellemzők	Minták jelölése a továbbiakban
Zab ( <i>Avena nuda</i> )	GK Zalán (2004); csupasz; származás: GK Kht.	Zab „GK Zalán”
Zab ( <i>Avena sativa</i> )	GK Iringó (2004); pelyvás, tavaszi; származás: GK Kht.	Zab „GK Iringó”
Zab ( <i>Avena sativa</i> )	GK Impala (2004); pelyvás, őszi; származás: GK Kht.	Zab „GK Impala”

#### 4.1.2. Sütőipari technológia ellenőrzése során vett minták

A módszerek optimalása után a Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt. segítségével sor került egy ipari körülmények között elvégzett kísérletre. Ennek során a technológia feltételezett kritikus pontjainak mesterséges módon történt szennyezését követtem nyomon a technológia során. Szennyező gabonaféle gyanánt az első kísérletnél búzát, majd a másodiknál a vele keresztreakciót mutató rozst használtam. Teszteltem a végtermékből a minimális szennyeződés kimutathatóságát.

Az üzemben kidolgozott gluténmentes kenyérgyártás a következő módon történt: a receptúra alapján kimért rizslisztet, burgonyapelyhet, kukoricakeményítőt, tojásport, élesztőt, zsiradékot, cukrot és sót a dagasztóban vízzel összedolgozták, majd pihentetés után a kiolajozott sütőformákban kelesztették. Sütés, hűtés és szárítás után csomagolták és jelölték a kenyereket.

A későbbiekben részletezett technológiai folyamat alapján 3 ponton (dagasztó tál, sütőformák, szárításra használt helyiségek) történt mesterséges szennyezés, majd az így készült egész kenyeret használtam mintákként a vizsgálatokhoz. A mintavételezési módszer ebben az esetben az egész kenyerek szárítása, darálása (Retsch GRINDOMIX GM200-as daráló) és homogenizálása volt. Vizsgáltam továbbá a nyersanyagokból és félkész termékekből vett mintákat is. A nyersanyagokból származó minták (7. táblázat) a tárolás hibáit, a félkész termékek (7. táblázat) a technológia hibáit, végül a végtermékek (8. táblázat) a technológia és az utókezelés hibáit voltak hivatottak kiszűrni.

**7. táblázat** Mesterséges szennyezéses kísérlet nyersanyag mintái a Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt.-től

Minták	Egyéb jellemzők	Minták elnevezése a továbbiakban
Rizsliszt	Gluténmentes kenyér nyersanyaga	Rizsliszt
Kukoricakeményítő	Gluténmentes kenyér nyersanyaga	Kukoricakeményítő
Burgonyapelyhely	Gluténmentes kenyér nyersanyaga	Burgonyapelyhely
Tojáspor	Gluténmentes kenyér nyersanyaga	Tojáspor
Élesztő	Gluténmentes kenyér nyersanyaga	Élesztő
Előre bekevert kenyérpor	A fenti alapanyagokból otthoni sütéshez készült félkész termék	Kenyérpor
Nyers kenyértészta minta	Dagasztóból vett félkész termék	Kenyértészta



**8. táblázat** Mesterséges szennyezés kísérlet során sült kenyerek a Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt.-től

Minták	Egyéb jellemzők	Minták elnevezése a továbbiakban
<b>A</b>	Teljesen gluténmentes kenyér (A sarzs*). Búzaliszttel történt mesterséges szennyezés <u>előtt</u> készült, tehát <u>nem</u> szennyezett!	<b>A</b> gluténmentes kenyér
<b>B</b>	Teljesen gluténmentes kenyér (B sarzs**). Rozsliszttel történt mesterséges szennyezés <u>előtt</u> készült, tehát <u>nem</u> szennyezett!	<b>B</b> gluténmentes kenyér
<b>A2</b>	Gluténmentes technológiával tiszta dagasztótálban és tiszta sütőformában készült kenyér (A sarzs*)	<b>A2</b> (tiszt+tiszt)
<b>A3</b>	Gluténmentes technológiával tiszta dagasztótálban és búzaliszttel szennyezett sütőformában készült kenyér (A sarzs*)	<b>A3</b> (tiszt+szennyezett)
<b>A4</b>	Gluténmentes technológiával búzaliszttel szennyezett dagasztótálban és tiszta sütőformában készült kenyér (A sarzs*)	<b>A4</b> (szennyezett+tiszt)
<b>B2</b>	Gluténmentes technológiával tiszta dagasztótálban és tiszta sütőformában készült kenyér (B sarzs**)	<b>B2</b> (tiszt+tiszt)
<b>B3</b>	Gluténmentes technológiával tiszta dagasztótálban és rozsliszttel szennyezett sütőformában készült kenyér (B sarzs**)	<b>B3</b> (tiszt+szennyezett)
<b>B4</b>	Gluténmentes technológiával rozsliszttel szennyezett dagasztótálban és tiszta sütőformában készült kenyér (B sarzs**)	<b>B4</b> (szennyezett+tiszt)
<b>B5</b>	Gluténmentes technológiával rozsliszttel szennyezett dagasztótálban és rozsliszttel szennyezett sütőformában készült kenyér (B sarzs**)	<b>B5</b> (szennyezett+szennyezett)
<b>A5</b>	Gluténmentes technológiával búzaliszttel szennyezett dagasztótálban és búzaliszttel szennyezett sütőformában készült kenyér (A sarzs*)	<b>A5</b> (szennyezett+szennyezett)
<b>Ü</b>	Teljesen gluténmentes kenyér – hagyományos kenyérgyártó üzemben szárítva!	<b>Ü</b> (üzemben szárítva)
<b>S</b>	Teljesen gluténmentes kenyér – silóban, üzemi körülményeknél kedvezőtlenebb helyen szárítva!	<b>S</b> (silóban szárítva)
<b>B1</b>	Rozsliszból készült kenyér (B sarzs**)	<b>B1</b> rozskenyér
<b>A1</b>	Búzaliszból készült kenyér (A sarzs*)	<b>A1</b> búzakenyér

\***A sarzs** – a szennyezési kísérlet 1. napján készült kenyerek; itt minden egyes esetben búzalisztet használtam szennyezési faktorként.

\*\***B sarzs** – a szennyezési kísérlet 2. napján készült kenyerek; itt minden egyes esetben rozsliszttel használtam szennyezési faktorként.

### 4.1.3. Kísérleti fázisban lévő gluténmentes termék mintái

A kidolgozott módszerek segítségével vizsgáltam kísérleti gyártásban lévő sárgaborsóból előállított száraztésztát, amelyet gluténmentes terméként kívánnak forgalomba hozni. A tészta reológiai tulajdonságainak javítására transzglutamináz enzimet használt a gyártó. A minták a **9. táblázatban** láthatók.

#### 9. táblázat Sárgaborsó száraztésztával végzett kísérletek mintái

Minták	Egyéb jellemzők	Minták elnevezése a továbbiakban
Sárgaborsó szemek ( <i>Pisum sativum</i> )	Sárgaborsó szemekből laboratóriumi körülmények között hántolt és Retsch GRINDOMIX GM200-as darálóval készített őrlemény. A szemek kereskedelmi forgalomba kaphatók. (referencia minta) (2 párhuzamos minta)	Sárgaborsó szemek
Sárgaborsó liszt	Hunor fajta; malomban őrölt, kereskedelmi forgalomban kapható (3 párhuzamos minta); származás: Balogh vállalat, Budapest	Sárgaborsó liszt
Sárgaborsó tészta	39 °C-on 24 óráig, majd szobahőmérsékleten 2 napig szárítva; összetétel: sárgaborsó liszt, víz, transzglutamináz enzim; (3 párhuzamos minta)	Sárgaborsó tészta

## 4.2. Oldatok és reagensek

### 4.2.1. DNS-izolálás reagensei

#### Wizard (Promega) DNS izolálás

- DNS extrakciós puffer (TNE) összetétele:
  - 10 mM TRIS-HCl (pH 8,0)
  - 150 mM NaCl
  - 2 mM EDTA
  - 1% SDS (szodium-dodecil-szulfát)
- 5 M Guanidin hidroklorid oldat
- 20 mg/ml Proteináz-K oldat (Sigma)
- Wizard DNA Clean-Up kit (Promega)
- 80%-os Izopropil alkohol

- Visszaoldó puffer (TE): 10 mM TRIS-HCl (pH 8,0)

#### 4.2.2. PCR reakció reagensei

##### Növény-specifikus primerre kidolgozott PCR-hez szükséges reagensek

- Kloroplasztisz primer pár (Taberlet et al., 1991) (Szintetizáltatva: Bio-Science Kft.)
 

A49855	(20 nukleotid)	0,1 µM/25 µl
B49317	(20 nukleotid)	0,1 µM/25 µl
- Master mix (Roche)
  - 0,05 U/µl *Taq* polimeráz
  - 20 mM TRIS-HCl
  - 100 mM KCl
  - 3 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 0,01% (v/v) Brij 35
  - dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) egyenként 0,4 mM
- Steril bidesztillált víz
- Izolált tiszta DNS

##### Búza specifikus primerre kidolgozott PCR-hez szükséges reagensek

- Búza riboszomális RNS génjére tervezett primer pár (Allmann et al., 1993) (Szintetizáltatva: Bio-Science Kft.)
 

TR01	(25 nukleotid)	0,4 µM/50 µl
TR02	(25 nukleotid)	0,4 µM/50 µl
- Master mix (Roche)
- Steril bidesztillált víz
- Izolált tiszta DNS

##### Glutenin specifikus primerre kidolgozott PCR-hez szükséges reagensek

- Az LMW glutenin gén mikroszatellit régiójára tervezett primer pár (Törjék et al., 2001) (Szintetizáltatva: Bio-Science Kft.)
 

P1	(18 nukleotid)	0,1 µM/25 µl
P2	(18 nukleotid)	0,1 µM/25 µl

- Master mix (Roche)
- Steril bidesztillált víz
- Izolált tiszta DNS

#### Búza-, árpa- és rozs-specifikus kloroplasztisz primerre kidolgozott PCR-hez szükséges reagensek

- A trnL kloroplasztisz gén nem kódoló régiójára tervezett primer pár (Dahinden et al., 2001)  
(Szintetizáltatva: Bio-Science Kft.)
 

WBR11	(24 nukleotid)	0,1 µM/25 µl
WBR13	(24 nukleotid)	0,1 µM/25 µl

- Master mix (Roche)
- Steril bidesztillált víz
- Izolált tiszta DNS

#### **4.2.3. Gélelektroforézis reagensei**

##### 10%-os poliakrilamid gélhez szükséges oldatok

- Akrilamid 30% oldat (Acrylamide/bis-acrylamid)(29:1) (Sigma)
- 0,89 M TBE (pH 8,0) puffer, 10x törzsoldat
- Desztillált víz
- TEMED (N,N,N,N,-tetrametil-etilén-diamin)
- Ammónium-perszulfát oldat

##### Futtatáshoz

- Műanyag gélkazetta (Novex)
- mintafelviteli puffer (GEL Loading Solution 6x, Sigma)
- TRIS-bórsav-EDTA elektroforézis puffer (0,89 M TBE puffer), pH 8,0 1x oldat
  - 108 g TRIS
  - 55 g bórsav
  - 40 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA
- DNS molekula méret (bp) marker (DirectLoad Step Ladder, Sigma) 50 bp-től 3000 bp-ig (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000 bp)
- Festő oldat (1:10 arányban)
  - Friss TBE (1x) oldat
  - SYBER™ Green I. gélfesték (Sigma)

#### 2% -os agaróz gélhez szükséges oldatok

- Agaróz (Ne Sieve GTG Agarose) (50 és 700 bp hosszú szakaszok elválasztása esetén 2%-os agaróz alkalmazható)
- 1x TBE puffer

#### Futtatáshoz:

- mintafelviteli puffer (GEL Loading Solution 6x, Sigma)
- TRIS-Bórsav-EDTA elektroforézis puffer (0,89 M TBE puffer), pH 8,0 1x oldat  
108 g TRIS  
55 g bórsav  
40 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA
- DNS molekula méret (bp) marker (DirectLoad™ Step Ladder, Sigma) 50 bp-től 3000 bp-ig (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000 bp)
- Festő oldat (1:10 arányban)  
Friss TBE (1x) oldat  
SYBER™ Green I. gélfesték (Sigma)

#### **4.2.4. PCR-RFLP vizsgálat reagensei**

- *AluI* *Arthrobacter luteus*-ből származó restrikciós endonukleáz (Fermentas) (10 U/μl)
- *Alw26I* (*BsmAI*) *Acinetobacter Iwoffii* RF L26-ből származó restrikciós endonukleáz (Fermentas) (10 U /μl)
- Yellow Tango™ puffer (10x) (Fermentas)  
33 mM Tris-acetát (pH 7.9 at 37°C)  
10 mM magnézium-acetát  
66 mM kálium-acetát  
0,1 mg/ml BSA

### **4.3. Műszerek**

A mérések során alkalmazott műszereket a következő csoportosításban alkalmaztam.

#### Mintaelőkészítésnél használt műszer

- Retsch GRINDOMIX GM200-as daráló

#### Izolálásnál használt műszerek

- Jouan BR4i centrifuga
- UV-1601 UV-Visible Spectrophotometer

#### PCR sokszorozáshoz használt műszerek

- Perkin ELMER GeneAmp PCR System 2400
- BLS PDR-91 DNA Reproducer

#### Gélelektroforézishez használt műszerek és szoftverek

- Elektromos tápegység (LKB Bromma 2301 Macrodrive1) (poliakrilamid gél futtatásához)
- Futtatókád (XCell Sure Lock) (poliakrilamid gél futtatásához)
- Elektromos tápegység (Embi Tec Run One™ Power Supply) (agaróz gél futtatásához)
- Futtatókád (Embi Tec Run One™ Electrophoresis Cell) (agaróz gél futtatásához)
- KODAK EDAS 290 számítógépes kiértékelő rendszer
- KODAK 1D Image Analysis Software (képanalizáló program elektroforetikus kép kiértékeléséhez)

## **4.4. Alkalmazott módszerek**

A méréseim során PCR alapú módszerekkel dolgoztam. Ezenkívül alkalmaztam PCR-RFLP analízist is, ahol a PCR amplikonokat az elektroforetikus elválasztást megelőzően restrikciós endonukleázokkal hasítottam. Ezt követően került sor az elektroforetikus elválasztásra és az UV fény alatti kiértékelésre.

### **4.4.1. DNS izolálás lépései**

A DNS izolálások során a rendelkezésemre álló mintamennyiségtől függően a Wizard technika (Zimmermann et al. 1998) segítségével 2 vagy 3 párhuzamos izolálás történt. A darált és homogenizált mintákat 2 ml-es centrifuga-csővekbe mértem, mintánként 300 mg-ot. Ehhez 860 µl Wizard puffert, 100 µl guanidin-hidroklorid oldatot és 40 µl proteináz-K-t adtam. Az így kapott minta oldatot 3 óráig rázatva inkubáltam 60°C-on, majd 10 percig centrifugáltam (12400 rpm, AB2.14 szögrotor). Ezek után steril Eppendorf csövekben 500 µl felülúszót 1 ml Wizard gyantához adtam, amelyet összerázás után fecskendővel egy speciális Wizard mini szűrőoszlopon átnyomtam. A DNS-t tartalmazó gyanta az oszlopban lévő szűrőn fennmaradt. A gyantát tartalmazó oszlopon ezután 2 ml, 80%-os izopropanol oldatot nyomtam át fecskendő segítségével, a gyanta gömböcskéken maradt szennyeződések eltávolítására. A fennmaradt alkoholt centrifugálással távolítottam el (12400 rpm, 2 perc, AB2.14 szögrotor). A gyantáról a tisztított DNS-t 50 µl 65°C–75°C-os TE puffer rápipettázásával, majd centrifugálással válsztottam le (12400 rpm, 5 perc,

AB2.14 szögrotor). Az izolált DNS oldatok tisztasági fokát és a DNS koncentrációkat spektrofotometriás méréssel határoztam meg, majd felhasználásig -20°C-on tároltam őket.

#### 4.4.2. A tisztított DNS oldatok jellemzése

A DNS oldat jellemzésére spektrofotometriás mérést végeztem, a hőkezelt minták DNS töredezettségét pedig az optimálás során agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem.

A technológiai feldolgozás DNS-re gyakorolt hatását, a fragmentumnagyság változását 2 %-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. Az elektroforézist Maniatis et al. (1989) szerint végeztem 120x80x5 mm gélapon, 100 V állandó feszültség mellett, 45 percig, 12 µl DNS oldat/zseb mintafelvitellel, 1xTBE pufferben. A géleket SYBER Green I. gélfesték (Sigma) oldattal (0,1 µl/ml) festettem, majd UV fény alatt lefényképeztem és kiértékeltem.

#### 4.4.3. DNS sokszorozás

A primer párokat az irodalomban ismertetett szekvencia információk alapján szintetizáltattam. A kiválasztás során figyelembe vettem, hogy a hőkezelés egyes esetekben akár 1000 bp alá is csökkentheti az átlagos DNS méretet. A szekvenciákat és a vonatkozó referenciákat a **10. táblázatban** soroltam fel.

**10. táblázat** A különböző polimeráz láncreakciók során alkalmazott primerpár szekvenciák összefoglalása

Primer jelölése	Primer szekvenciája	Referencia	Célgén
B49317	5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG -3'	Taberlet et al., 1991	(400 bp-700 bp) <i>trnL</i> (UAA) gén intronjának egy nem kódoló szakasza
A49855	5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC -3'		
TR01	5'-GAACGGGCTGTACGAGGACACGGGA -3'	Allmann et al., 1993	(109 bp) búza riboszómális RNS génjének 25S és 18S lokusza között lévő intergenikus régió egy sűrűn ismétlődő szakasza
TR02	5'-GCGGCGTGTGCCACGTACGTGGTTT -3'		
P1	5'-TCCCGCCATGAGTCAATC -3'	Törjék et al., 2001 és 2002	(150 bp) LMW glutenin gén mikroszatellit régiója
P2	5'-TTGGGAGACACATTGGCC -3'		
WBR11	5'-GGTAACTTCCAAATTCAGAGAAAC -3'	Dahinden et al., 2001	búza, rozs (201 bp) és árpa (196 bp) <i>trnL</i> gén intronjának homogenitást mutató szakasza
WBR13	5'-TCTCTAATTTAGAATTAGAAGGAA -3'		

A kinyert DNS tisztaságát, illetve sokszorozhatóságát B49317 és A49855 kloroplasztisz DNS primer pár segítségével vizsgáltam. A DNS eredetét a búza specifikus TR01/TR02 primer párral igazoltam, amelyet Allmann és munkatársai (1993) terveztek.

Továbbá a P1/P2 primer párt alkalmasnak találtam glutenin kontamináció detektálására, mivel Törjék és munkatársai kísérleteik során nem tudtak jellemző markereket és fajtákon belüli polimorfizmust detektálni ezzel a primer párral, illetve ez a primer pár a glutén egyik összetevőjét, a glutenint kódoló gén egy nem kódoló szakaszát sokszorozza.

Végül egy másik speciális kloroplasztisz DNS primer párt (WBR11/WBR13) alkalmaztam cöliákiás tüneteket okozó gabonafajokkal való szennyeződés kiszűrésére.

A PCR vizsgálat előtt a különböző koncentrációjú DNS oldatokat 25 ng/5 µl töménységűre hígítottam. A DNS sokszorozást 25 µl és 50 µl végtérfogatban, vékony falú PCR csövekben végeztem el. A végtérfogat az alkalmazott PCR készülékek függvénye volt. A készülékválasztás tapasztalati úton történt és nagyban befolyásolta a készülékek hűtési és fűtési sebessége, amely a különböző primer párok működése szempontjából fontos befolyásoló tényezőnek bizonyult. Negatív kontrollként DNS-t nem tartalmazó vak próbát alkalmaztam. Az élelmiszervizsgálatok esetében pozitív kontrollként az adott vizsgálatnak megfelelő gabonaféléből izolált DNS oldatot használtam. A reakciót minden esetben forró indítással (94°C) kezdtem, ezzel csökkenthető volt a nem specifikus termékek képződése. A láncreakciót minden esetben hűtéssel állítottam le (4°C). A hőkezelt mintáknál a reakció érzékenységének növelése érdekében bizonyos esetekben szükség volt a templát DNS mennyiség 25 ng/5 µl-ről 250 ng/5 µl-re növelésére, illetve a ciklusszám módosítására. A további ciklusparaméterek adatait a következőkben foglaltam össze.

#### Növény-specifikus primerre (B49317/A49855) kidolgozott PCR szakaszai

A PCR elegyet mintánként 0,5 ml-es vékony falú PCR csövekbe állítottam össze:

- 0,5-0,5 µl oligonukleotid (primer) oldat (reakció elegyben a primer végkoncentrációja: 0,1 µM volt)
- 6,5 µl bidesztillált víz
- 12,5 µl master mix
- 5 µl izolált DNS (25 ng/5 µl)

Az PCR elegy végső mennyisége 25 µl volt. Az amplifikálásra alkalmazott készülék a Perkin ELMER GeneAmp PCR System 2400 volt.



Alkalmazott program:

Ciklus szám: 35

Elődenaturáció: 94°C-on, 2 percig

Denaturáció: 96°C-on, 20 másodpercig

Primer kapcsolódás (annealing): 59°C-on, 40 másodpercig

Komplementer szál szintézise (extenzió): 72°C-on, 40 másodpercig

Végső lánchosszabbítás: 72°C-on, 3 percig

#### Búza specifikus primerre (TR01/TR02) kidolgozott PCR szakaszai

A PCR elegyet mintánként 1 ml-es vékony falú PCR csövekbe állítottam össze:

- 4-4 µl oligonukleotid (primer) oldat (reakció elegyben a primer végkoncentrációja: 0,4 µM volt)
- 12 µl bidesztillált víz
- 25 µl master mix
- 5 µl izolált DNS (25 ng/5 µl)

Az PCR elegy végső mennyisége 50 µl volt. Ebben az esetben az amplifikálásra a BLS PDR-91 DNA Reproducer készüléket alkalmaztam.

Alkalmazott program:

Ciklus szám: 30

Elődenaturáció: 94°C-on, 2 percig

Denaturáció: 95°C-on, 20 másodpercig

Primer kapcsolódás (annealing): 65°C-on, 30 másodpercig

Komplementer szál szintézise (extenzió): 72°C-on, 10 másodpercig

Végső lánchosszabbítás: 72°C-on, 2 percig

#### Glutén specifikus primerre (P1/P2) kidolgozott PCR szakaszai

A PCR elegyet mintánként 0,5 ml-es vékony falú PCR csövekbe állítottam össze:

- 0,5-0,5 µl oligonukleotid (primer) oldat (reakció elegyben a primer végkoncentrációja: 0,1 µM volt)
- 6,5 µl bidesztillált víz
- 12,5 µl master mix
- 5 µl izolált DNS (25 ng/5 µl)

Az PCR elegy végső mennyisége 25 µl volt. Az amplifikálásra alkalmazott készülék a Perkin ELMER GeneAmp PCR System 2400 volt.

Alkalmazott program:

Ciklus szám: 40

Elődenaturáció: 94°C-on, 2 percig

Denaturáció: 94°C-on, 10 másodpercig

Primer kapcsolódás (annealing): 60°C-on, 30 másodpercig

Komplementer szál szintézise (extenzió): 72°C-on, 1 percig

Végső lánchosszabbítás: 72°C-on, 2 percig

#### Búza-, árpa- és rozs-specifikus kloroplasztisz primerre (WBR11/WBR13) kidolgozott PCR szakaszai

A PCR elegyet mintánként vékony falú 0,5 ml-es PCR csövekbe állítottam össze:

- 2,5-2,5 µl oligonukleotid (primer) oldat (reakció elegyben a primer végkoncentrációja: 0,5 µM volt)
- 2,5 µl bidesztillált víz
- 12,5 µl master mix
- 5 µl izolált DNS (25 ng/5 µl)

Az PCR elegy végső mennyisége 25 µl volt.

Jelen esetben is a Perkin ELMER GeneAmp PCR System 2400-as készüléket alkalmaztam a sokszorozásra.

Alkalmazott program:

Ciklus szám: 35

Elődenaturáció: 94°C-on, 3 percig

Denaturáció: 96°C-on, 20 másodpercig

Primer kapcsolódás (annealing): 60°C-on, 1 perc 20 másodpercig

Komplementer szál szintézise (extenzió): 72°C-on, 1 perc 20 másodpercig

Végső lánchosszabbítás: 72°C-on, 3 percig

#### **4.4.4. Alkalmazott PCR-RFLP analízis lépései**

A WBR11/WBR13 primer párral sokszorozott amplikonok restrikciós endonukleázos emésztése *AluI* és *BsmAI* enzimekkel történt. Az enzimeket Tango puffer 1x oldatával kétszeresére hígítottam, majd az így kapott oldatból 10 U/2 µl-t adtam 8 µl PCR-termékhez, amelyet előzőleg a WBR11/WBR13 primer párral amplifikáltam. A kétféle enzimet külön reakciócsövekbe mértem össze a különböző mintákkal. Az emésztés 37°C-on 3 óráig, majd az inaktiválás 65°C-on 20 percig

történt. Az enzimes hasítás után a pozitív mintákra az *AluI* esetében 68 bp és 133 bp hosszú DNS-fragmentumok, míg a *BsmAI* esetén pedig 86 bp és 115 bp hosszúságú DNS-szakaszok voltak jellemzőek, melyek igazolták a sokszorozott szekvencia specifikusságát. Az eredményeket gélelektroforézissel ellenőriztem.

#### 4.4.5. Termékanalízis lépései

A PCR termékeket és a restrikciós termékeket az optimalálás során akrilamid gélelektroforézis segítségével jelenítettem meg. Az optimált módszer további alkalmazása során agaróz gélelektroforézist alkalmaztam a költségek csökkentése érdekében. A módszerek rutinszerű és megfizethető vizsgálatokká fejlesztése érdekében volt erre szükség.

##### Akrilamid gélelektroforézis

Egy 10%-os gél készítéséhez (Ausubel, 1989) 3,3 ml akrilamidot, 1,0 ml (10x) TBE puffert, 5,7 ml desztillált vizet, 8 µl TEMED-et és 80 µl ammónium-perszulfátot elegyítés után, még folyékony állapotban bemértem a műanyag gélkazetta falai közé. A zsebek a megfelelő fésű segítségével kerültek kialakításra. 20-25 perc szilárdulási idő után eltávolítottam a fésűt és 1x TBE pufferrel átmostam a zsebeket. A 25 µl PCR amplikon mintákból, 5 µl mintafelviteli puffer hozzáadása (50 µl minta esetén 10 µl mintafelviteli puffer) után zsebenként 10 µl-t vittem fel a gélre. A fragmentumok hosszúságát a gél első zsebébe kerülő 5 µl DNS molekula méret (bp) marker (DirectLoad™ Step Ladder (50 bp-3000 bp), Sigma) segítségével határoztam meg. A futtatást 200 V állandó feszültség mellett 40 percig végeztem, majd a géleken a fragmentumokat 20 percig SYBR Green festékoldatban áztatva tettem detektálhatóvá. A festék oldatot 6 µl SYBR Green festékből és 60 µl friss (1x) TBE oldatból (1:10) készítettem. A megfestett gélét Kodak EDAS 290 kiértékelő rendszer segítségével UV fény alatt lefényképeztem és számítógépen KODAK 1D Image Analysis Software segítségével kiértékeltem.

##### Agaróz gélelektroforézis

Egy 2%-os gél készítéséhez 1 g agarózt 50 ml (1x) TBE pufferrel kevertem össze, majd addig melegítettem, amíg a kristályok eltűntek és homogén lett az oldat. A horizontális gél megöntése előtt az oldatot körülbelül 60°C-osra hűtöttem. Itt is fésűt alkalmaztam a zsebek kialakítására. 35-40 perc szilárdulási idő után a gélét a futtatókádba 1x-es TBE pufferbe süllyesztettem. A 25 µl mennyiségű mintákhoz itt is 5 µl mintafelviteli puffert adtam. Mintáimból zsebenként 5 µl-t vittem fel a gélre. Itt is a gél első zsebébe került az 5 µl DNS molekula méret (bp) marker (DirectLoad™ Step Ladder (50 bp-3000 bp), Sigma). A futtatást 100 V állandó feszültség mellett 60 percig

végeztem, majd a géleket 20 percig SYBR Green festékoldatban festettem. A festékoldatot az előzőekhez hasonlóan készítettem. A megfestett gél szintén Kodak EDAS 290 kiértékelő rendszerrel UV fény alatt, KODAK 1D Image Analysis Software segítségével értékeltem ki.

## 5. KUTATÁSI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 5.1. DNS tisztasága és sokszorozhatósága

A kutatás során először gabonafélékből és kenyerekből végeztem el a DNS izolálását a Wizard extrakciós technika alkalmasságának bizonyítására. Wizard módszernél az enzimesen feltárt minta egy DNS-kötő gyantán ereszhető át, amelyről a DNS 75°C-os TE pufferrel lemosható.

Az izolált DNS tisztasága kulcsfontosságú szerepet tölt be a PCR technika hatékonyságában, de a DNS töredezettsége sem elhanyagolható tényező ebből a szempontból. Kiindulva ezekből a kritériumokból, a DNS-oldatok tisztaságának (inhibitormentességének) és töredezettségének vizsgálatára háromféle módszert alkalmaztam.

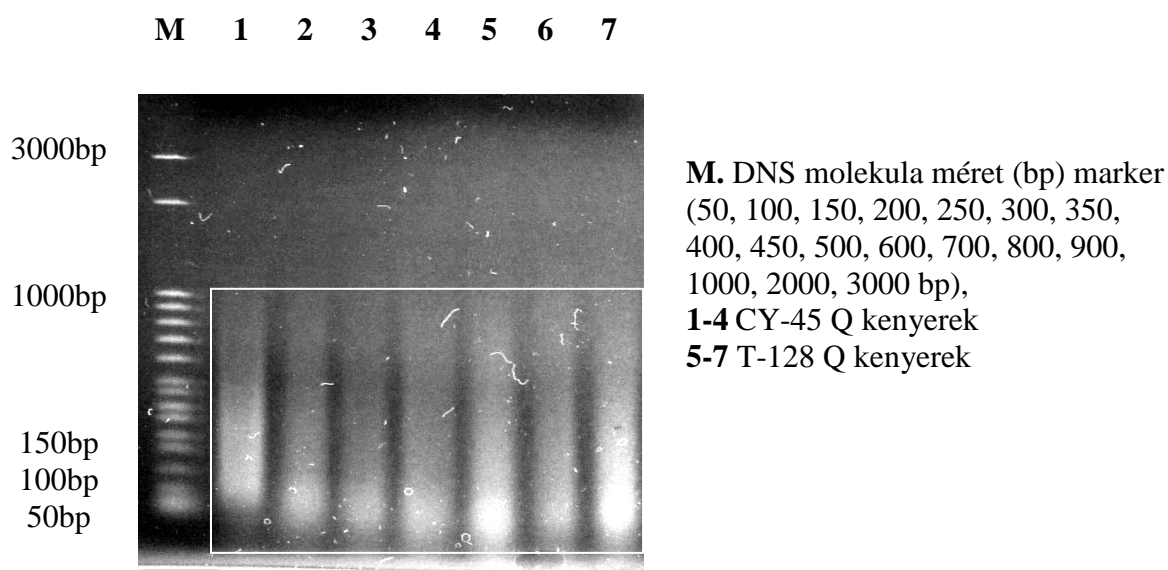
A módszer optimalizálása során megvizsgáltam, hogy a legnagyobb hőt elszenvedett mintákban, a kenyerekben lévő DNS-tartalomra milyen hatással volt a kenyérsütéshez alkalmazott magas kemence-hőmérséklet. A kenyerekből izolált DNS-t a fentiekben leírt körülményeket alkalmazva megfutattam 2%-os agaróz gélen és DNS molekulaméret marker segítségével ellenőriztem a DNS fragmentumok méreteit.

Az kinyert DNS oldatok tisztaságát az abszorbancia meghatározás módszerével is ellenőriztem, amely módszer alapja a fentiekben (4.4.2) meghatározott R érték meghatározása. Ez a módszer a DNS tisztasági fokmérője, de nem ad felvilágosítást annak töredezettségéről.

A harmadik eljárás már a polimeráz láncreakció segítségével alkalmazott növény-specifikus sokszorozás volt, amely egyaránt adott közvetett információt a DNS tisztaságáról (inhibitormentesség), illetve a töredezettségi fokáról. Ha az adott primer párral történt sokszorozás után a várt hosszúságú (400-700 bp) szakasz megjelent a gélen, akkor ebből következtethető, hogy a hőkezelés, ha elő is idézett bizonyos fokú töredezettséget a DNS-ben, az nem olyan mértékű, hogy a DNS ezekre a vizsgálatokra ne lenne még alkalmas.

#### 5.1.1. Hőkezelt minták DNS-ének töredezettség vizsgálata

A kísérleteim megkezdése előtt meg kellett győződnöm arról, hogy a legnagyobb hőnek kitett mintákra is alkalmazható a rendszer. A vizsgálataim arra irányultak, hogy mekkora a DNS töredezettségi foka, illetve, hogy a kísérletekben alkalmazott primer párok által sokszorozott végtermékekre reálisan számíthatok-e. A 260°C-on 25 percig sült kenyerek hőkezelése volt a legintenzívebb, ezért ezeken ellenőriztem a DNS degradálódást.



**4. ábra** Kenyerekből kinyert DNS futtatása 2%-os agaróz gélen

Az **4. ábrán** jól látható, hogy a degradálódott DNS annyira töredezett, hogy a fragmentumok többségének hossza az 50-150 bp tartományba esik. A bázispárok számának növekedésével fordítottan arányos a fragmentumok száma, vagyis a legkevesebb a hosszú DNS szakaszokból található a mintákban. Ezek közül a legnagyobbak is alig érik el az 1000 bp hosszúságot. Ez a tény nehézségeket okozhat a növény-specifikus kloroplasztisz primer pár esetében, hiszen ennek a primer párnak a végterméke fajtól függően 400 bp és 700 bp közé kell esnie és az előbbi következtetésből kiindulva ezekben a mintákban kevés az ilyen hosszúságú templát. Abban az esetben, ha a kloroplasztisz PCR sikeresen elvégezhető, az a hőkezelt minták esetében megnövelheti az esélyét a többi primer párral való sokszorozhatóság valószínűségének.

### **5.1.2. Abszorbancia értékek alapján meghatározott DNS tisztaság**

Mint azt már korábban részleteztem, a tisztított DNS-oldatok 260 nm-en és 280 nm-en mért abszorbancia értékeinek hányadosából számított R érték alapján megállapítható a minták fehérje, illetve RNS szennyezettsége. A következő táblázatok tartalmazzák a kísérletek során felhasznált összes minta kinyerhető DNS mennyiségét ( $\mu\text{g}/300 \text{ mg}$  vagy  $\mu\text{g}/200 \text{ mg}$ ) és R értékét (**11-16. táblázat**).

**11. táblázat** Búzaminták és tészták izolálható DNS oldatainak jellemzői

Minták	A mintából kinyerhető DNS mennyisége, µg/300 mg	R érték (A 260/280)
Búza „CY-45 Q”	76,1±1,2	1,73±0,02
Búza „T-128 Q”	80,3±1,2	1,76±0,01
Búza „CY-45 Grandstar”	56,4±1,4	1,70±0,01
Búza „T-128 Grandstar”	58,5±1,5	1,75±0,01
Búza „Izabella”	37,4±1,7	1,65±0,02
Búza „D-78”	48,2±1,6	1,70±0,01
„Izabella” száraztészta	26,9±2,1	1,58±0,04
„D-78” száraztészta	50,1±2,6	1,67±0,03
5 percig főzött „Izabella” száraztészta	11,1±3,1	1,65±0,04
10 percig főzött „Izabella” száraztészta	9,6±4,9	1,60±0,04
5 percig főzött „D-78” száraztészta	18,3±4,1	1,58±0,03
10 percig főzött „D-78” száraztészta	13,7±5,0	1,58±0,05

**12. táblázat** Búzával keresztreakáló és nem keresztreakáló gabonafélék, valamint más pszeudocereáliák izolálható DNS oldatainak jellemzői

Minták	A mintából kinyerhető DNS mennyisége, µg/300 mg	R érték (A 260/280)
Tritikalé „Kargo” normál	56,8±2,1	1,74±0,04
Tritikalé „Kargo” stresszelt	58,5±2,0	1,70±0,01
Tritikalé „EMBR 18” normál	95,3±1,7	1,79±0,01
Tritikalé „EMBR 18” stresszelt	84,7±1,6	1,74±0,02
Rozs „Matador”	71,8±1,7	1,74±0,02
Rozs „Gamet”	62,1±1,9	1,71±0,01
Rozs „GK Wibro”	43,5±2	1,70±0,01
Búza „ÖKO-10”	55,1±2,3	1,66±0,03
Búza „D-78”	64,4±2,5	1,74±0,01
Búza „GK Cipó”	78,3±1,6	1,75±0,01
Árpa „GK Rezi”	101,8±2,4	1,83±0,01
Árpa „STC I. 22-03”	85,8±2,1	1,77±0,01
Árpa „GK Árpád”	61,9±2,5	1,77±0,01
Rizs „Janka”	41,0±3,7	1,74±0,02
Rizs „Bioryza”	46,2±3,8	1,81±0,04
Rizs „Ábel”	48,7±4,2	1,80±0,01
Kukorica „Sze TC 269”	25,8±0,6	1,56±0,03
Kukorica „Ella SC”	34,3±0,6	1,60±0,01
Kukorica „Sze SC 352”	34,8±1,0	1,61±0,01
Zab „GK Iringó”	88,6±3,1	1,75±0,02
Zab „GK Impala”	107,3±2,8	1,80±0,01
Zab „GK Zalán”	140,3±3,2	1,88±0,01

Minták	A mintából kinyerhető DNS mennyisége, $\mu\text{g}/300 \text{ mg}$	R érték (A 260/280)
Hajdina „430 törzs”	31,1 $\pm$ 2,5	1,61 $\pm$ 0,03
Hajdina „P425 törzs”	65,1 $\pm$ 0,4	1,80 $\pm$ 0,01
Hajdina „P427 törzs”	57,4 $\pm$ 2,0	1,76 $\pm$ 0,02
Amaránt „Edit”	52,5 $\pm$ 1	1,61 $\pm$ 0,02
Amaránt „Róza”	44,6 $\pm$ 2,5	1,62 $\pm$ 0,02
Amaránt „Maros”	42,0 $\pm$ 1,1	1,62 $\pm$ 0,03

**13. táblázat** A PCR reakciók optimalálásához használt kenyérminták (transzgén és nem transzgén búzából) izolálható DNS oldatainak jellemzői

Minták	A mintából kinyerhető DNS mennyisége, $\mu\text{g}/200 \text{ mg}$	R érték (A 260/280)
1. CY-45 Q kenyér	17,3 $\pm$ 3	1,71 $\pm$ 0,02
2. CY-45 Q kenyér	18,8 $\pm$ 3,1	1,66 $\pm$ 0,02
3. CY-45 Q kenyér	18,0 $\pm$ 3,1	1,71 $\pm$ 0,01
4. CY-45 Q kenyér	15,9 $\pm$ 2,0	1,64 $\pm$ 0,01
1. T-128 Q kenyér	15,5 $\pm$ 3,6	1,55 $\pm$ 0,04
2. T-128 Q kenyér	15,1 $\pm$ 3,2	1,70 $\pm$ 0,01
3. T-128 Q kenyér	17,2 $\pm$ 3,6	1,64 $\pm$ 0,04

**14. táblázat** Szennyezés kísérlet nyersanyagaiból és félkész termékeiből izolálható DNS oldatok jellemzői

Minták	A mintából kinyerhető DNS mennyisége, $\mu\text{g}/200 \text{ mg}$	R érték (A 260/280)
RL	20,8 $\pm$ 3,8	1,88 $\pm$ 0,01
KK	7,3 $\pm$ 5,3	1,59 $\pm$ 0,01
BP	8,3 $\pm$ 5,1	1,75 $\pm$ 0,01
TP	11,9 $\pm$ 3,5	1,53 $\pm$ 0,04
É	20,2 $\pm$ 4,1	1,72 $\pm$ 0,01
Kenyérpor	18,3 $\pm$ 4,2	1,86 $\pm$ 0,02
Kenyértészta	8,1 $\pm$ 5,5	1,56 $\pm$ 0,06



**15. táblázat** Szennyezéses kísérlet kenyereiből izolálható DNS oldatok jellemzői

Minták	A mintából kinyerhető DNS mennyisége, $\mu\text{g}/300 \text{ mg}$	R érték (A 260/280)
A gluténmentes kenyér	16,3 $\pm$ 2,8	1,65 $\pm$ 0,01
B gluténmentes kenyér	17,9 $\pm$ 3,0	1,71 $\pm$ 0,04
A2 (tisztá+tisztá)	13,6 $\pm$ 2,5	1,62 $\pm$ 0,04
A3 (tisztá+szennyezett)	15,1 $\pm$ 2,4	1,64 $\pm$ 0,02
A4 (szennyezett+tisztá)	23,6 $\pm$ 3,0	1,67 $\pm$ 0,01
B2 (tisztá+tisztá)	22,0 $\pm$ 2,3	1,78 $\pm$ 0,02
B3 (tisztá+szennyezett)	21,1 $\pm$ 1,0	1,77 $\pm$ 0,02
B4 (szennyezett+tisztá)	18,3 $\pm$ 1,1	1,66 $\pm$ 0,01
B5 (szennyezett+szennyezett)	17,6 $\pm$ 1,0	1,72 $\pm$ 0,01
A5 (szennyezett+szennyezett)	21,4 $\pm$ 1,0	1,76 $\pm$ 0,04
Ü (üzemben szárítva)	19,0 $\pm$ 1,1	1,75 $\pm$ 0,01
S (silóban szárítva)	17,9 $\pm$ 1,1	1,73 $\pm$ 0,03
B1 rozskenyér	27,7 $\pm$ 2,0	1,84 $\pm$ 0,03
A1 búzakenyér	30,7 $\pm$ 2,5	1,85 $\pm$ 0,03

\***A sarzs** – a szennyezési kísérlet 1. napján készült kenyerek; itt minden egyes esetben búzalisztet használtam szennyezési faktorként,

\*\***B sarzs** – a szennyezési kísérlet 2. napján készült kenyerek; itt minden egyes esetben rozslisztet használtam szennyezési faktorként,

**16. táblázat** Sárgaborsó tésztaiból és lisztekből izolálható DNS oldatok jellemzői

Minták	A mintából kinyerhető DNS mennyisége, $\mu\text{g}/300 \text{ mg}$	R érték (A 260/280)
ST	60,2 $\pm$ 2,1	1,69 $\pm$ 0,02
SL	42,8 $\pm$ 2,1	1,68 $\pm$ 0,04
SSZ	32,2 $\pm$ 0,5	1,70 $\pm$ 0,01

Az általam vizsgált minták R értékei többnyire megfelelőek voltak a további vizsgálatok folytatásához. A gyakorlati tapasztalatom szerint, ha az R érték kissé a határérték alá esik, az még nem zavarja a polimeráz láncreakciót. Kísérleteim alapján, amit a DNS oldatok további tisztítása céljából végeztem, a további proteináz-K hozzáadása, illetve az emésztési idő növelése csak rontott az eredményeken. Valószínűnek tartom, hogy az egyes mintákban maradt proteináz-K okozta az alacsonyabb R értékeket. Irodalmi tapasztalatokból kiindulva, mivel esetenként a gabonafélék lisztjeinél, illetve más bonyolultabb összetételű mintáknál tapasztaltam a rosszabb eredményeket, az is előfordulhatott, hogy bizonyos szénhidrát, vagy egyéb biomolekula mátrixok (pl. proteináz

inhibitorok) akadályozták a teljes fehérjelebomlást. A további, sokszorozhatóságot bizonyító, kísérletek (B49855/A49317 kloroplasztisz primer párral való sokszorozhatóság) eredményessége után nem tartottam lényegesnek ennek a további optimalizálását.

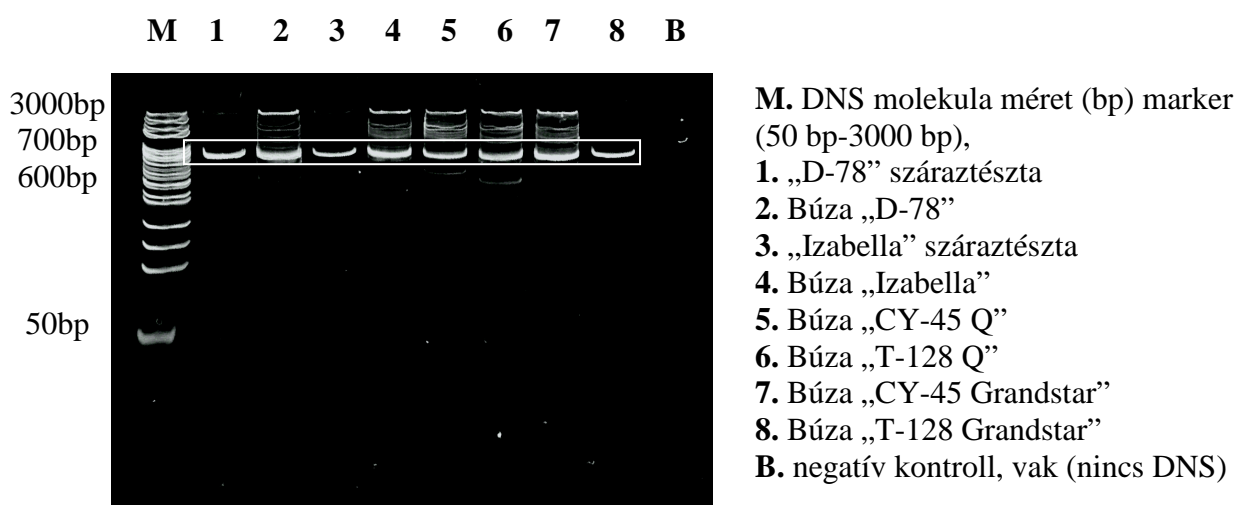
Az eredmények szerint a Wizard módszer alkalmasnak bizonyult megfelelő minőségű DNS-kinyerésre. E módszer alkalmazásával viszonylag kis mennyiségű, de tiszta DNS izolálható. Ennek alapján a Wizard nagy sikerrel alkalmazhatóvá válhat olyan minták (például hőkezelt élelmiszerek) estében is, ahol eleve kevesebb a DNS.

### 5.1.3. Növény-specifikus kloroplasztisz primer pár segítségével meghatározott DNS eredet és sokszorozhatóság

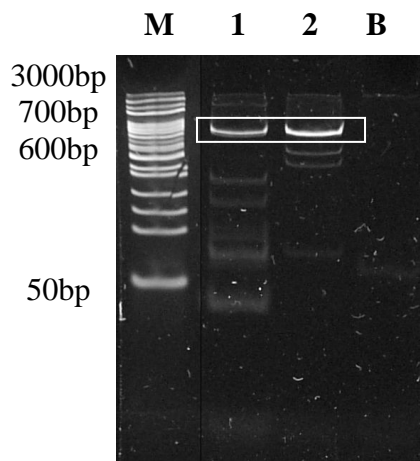
Az R érték megállapításán kívül a növény-specifikus primer párral való amplifikálás a minták sokszorozhatóságáról ad információt. A fajra specifikus DNS fragmentum amplifikálódása a minták PCR reakcióval kapcsolatos inhibitor-mentességét bizonyítja.

#### 5.1.3.1. Növény-specifikus módszer optimalizálása a minta-típusokra

A módszer optimalizálásához először a különböző mintatípusok között szelektáltam. Különböző búzafajtákat, illetve különböző környezeti hatásnak kitett azonos búzafajtákat vizsgáltam, hogy kizárjam a B49317/A49855 növény-specifikus kloroplasztisz primer pár szelektivitását az egyes búzafajtákra nézve. Vizsgáltam *T. aestivum* és *T. durum* búzából, transzgén és nem transzgén búzából, illetve növényvédőszeres és növényvédőszer mentes búzából származó liszteket. A hőkezelés hatásainak vizsgálatára száraz tésztákból és kenyerekből származó DNS-t sokszoroztam. Végül megvizsgáltam más, cöliákia szempontjából lényeges gabonaféléket és pszeudocereáliákat is a módszerrel.



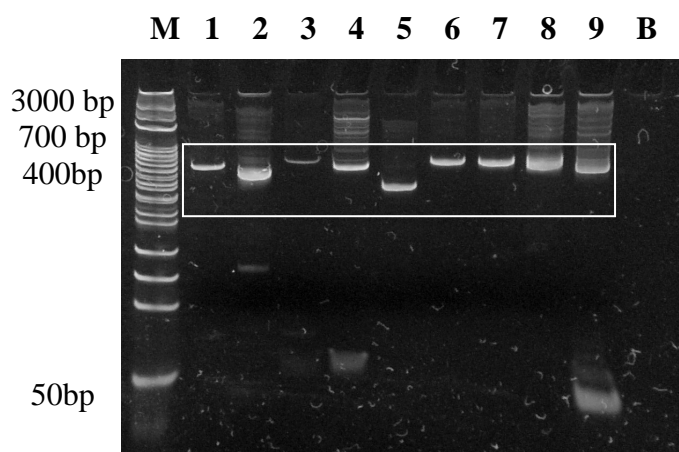
5. ábra Különböző búza fajták és száraz tészták vizsgálata növény-specifikus kloroplasztisz primer párral (B49317/A49855)



**M.** DNS molekula méret (bp) marker (50 bp-3000 bp),  
**1.-2.** CY-45 Q kenyér (25 ng/5 µl és 250 ng/5 µl DNS templát)  
**B.** negatív kontroll, vak (nincs DNS)

**6. ábra** Kenyerek vizsgálata növény-specifikus kloroplasztisz primer párral (B49317/A49855)

Ahogy az **5. és 6. ábrán** is jól látszik, a kloroplasztisz primer pár nem szelektív a különböző búza fajtákra és kimutatható vele a hőkezelt minták azonos DNS szakasza is. Minden minta esetében ugyanott kaptam jelet a gélen. Ezek a jelek 662 bp hosszúságú DNS szakaszoknak felelnek meg. Ezeknek a sávoknak a következetes megjelenése bizonyítja azt, hogy a mintáink inhibitormentesek, töredezettségük ellenére sokszorozhatóak, illetve, hogy a vizsgált környezeti hatások nem befolyásolják a kimutathatóságot. A primer pár faj-specifikusságát figyelembe véve elmondható, hogy ez a 662 bp hosszú DNS szakasz a Triticum fajra jellemző amplicon.



**M.** DNS molekula méret (bp) marker (50 bp-3000 bp),  
**1.** Rizs „Bioryza”  
**2.** Kukorica „Sze SC 352”  
**3.** Tritikalé „EMBR 18” normál  
**4.** Rozs „Gamet”  
**5.** Zab „GK Zalán”  
**6.** Búza „GK Cipó”  
**7.** Árpa „GK Árpád”  
**8.** Hajdina „P425 törzs”  
**9.** Amaránt „Maros”  
**B.** negatív kontroll, vak (nincs DNS)

**7. ábra** Kilencféle gabona és pszeudocereália vizsgálata növény-specifikus kloroplasztisz primer párral (B49317/A49855)

A **7. ábrán** látható kilencféle gabona és pszeudocereália mintára optimaltam a B49317/A49855 növény-specifikus kloroplasztisz primer párt. Itt egyértelműen kitűnik a primer fajspecifikus jellege, hiszen a 400-700 bp tartományon belül a különböző fajok más-más méretű (bp) jeleket adnak. Ez a tulajdonság a továbbiakban egy előszelekciót tehet lehetővé a cöliákia szempontjából ártalmas és nem ártalmas gabonafajok és pszeudocereália fajok vizsgálatánál. A mérés pontosítása érdekében a sokszorozott amplikonok méreteit nem csak a létra segítségével, hanem a KODAK 1D Image Analysis Software segítségével is megbecsültem több párhuzamos futtatást kiértékelve, hiszen ilyen kis felbontásnál a gélkép néha megtévesztő lehet.

Megállapítható ezáltal, hogy a búza, rozs, árpa és tritikálé a búza 662 bp hosszú amplikonját közelítve adtak jelet (tritikálé 662 bp, árpa 642 bp, rozs 667 bp). Ehhez a mérethez csak a rizs (mint nem keresztreakáló gabonaféle) amplikonja közelített a 614 bp hosszúságával (Taberlet et al., 1991), a többi keresztreakciót nem mutató gabonaféle és pszeudocereália kisebb amplikonjai (amaránt 600 bp, hajdina 600 bp, kukorica 532 bp) jól elkülönültek a többitől. Ez határozottan érvényes az eddig keresztreakálóknak hitt zab esetére, amelynek amplikonja alig éri el a 405 bp hosszúságot. Ez utalhat a genetikai különbségekre, illetve a különböző növényrendszertani eredetre.

A reakció optimalása során a Taberlet és munkatársai (1991) által leírtakhoz képest a PCR programban hajtottam végre néhány változtatást, annak érdekében, hogy a primer pár az adott laborkörülmények között megfelelően működni tudjon.

A PCR-programot a következőképpen változtattam a B49317/A49855 primer párnál:

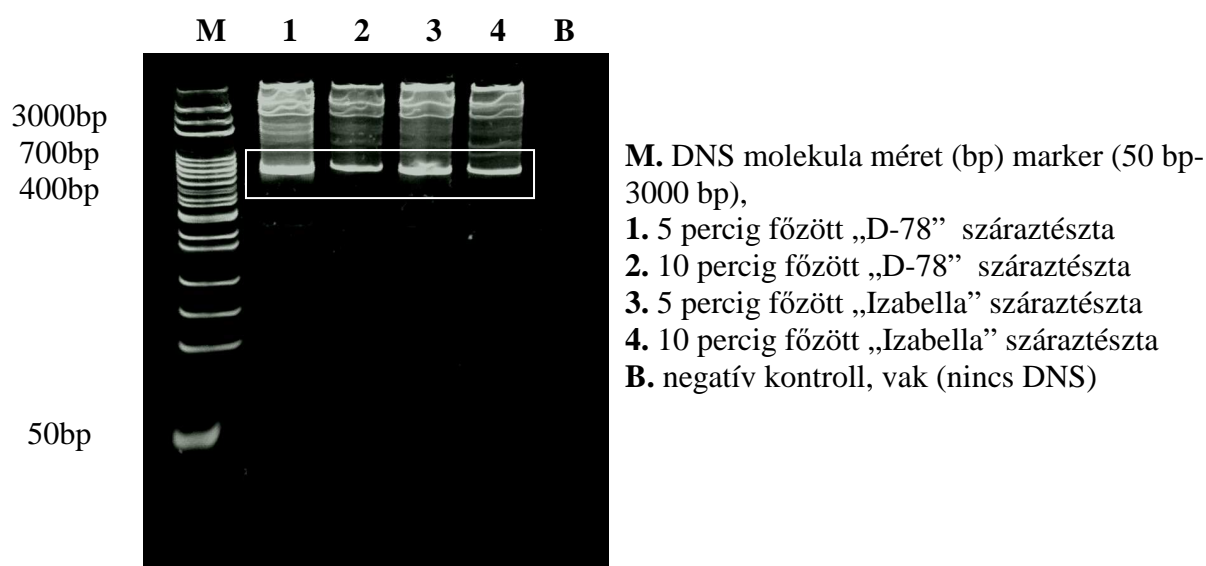
- A denaturáció hőmérsékletét 94°C-ról 96°C-ra emeltem, míg az idejét 1 percről 2 percre növeltem.
- A primer kapcsolódásának hőmérsékletét 50°C-ról 1 fokként optimalva egészen 59 °C-ig emeltem, amely végül optimálisnak bizonyult. Ezzel párhuzamosan viszont a primerek kapcsolódásának idejét 1 percről 40 másodpercre csökkentettem a specifikusabb termékek képződése érdekében.
- A komplementer szál szintézisének idejét 2 percről 40 másodpercre csökkentettem.
- A fenti változtatásokon kívül még a cikkben nem szereplő elődenaturációt (94°C; 2 min) és végső lánchosszabbítást (72°C; 3 min) is alkalmaztam a jobb hatékonyság és specifikusság elérése érdekében.

Az így kapott jól működő programot alkalmaztam a további kísérletek során a B49317/A49855 növény-specifikus kloroplasztisz primer pár esetében.

### 5.1.3.2. DNS-ek növényi eredetének és sokszorozhatóságának ellenőrzése növény-specifikus kloroplasztisz primer párral

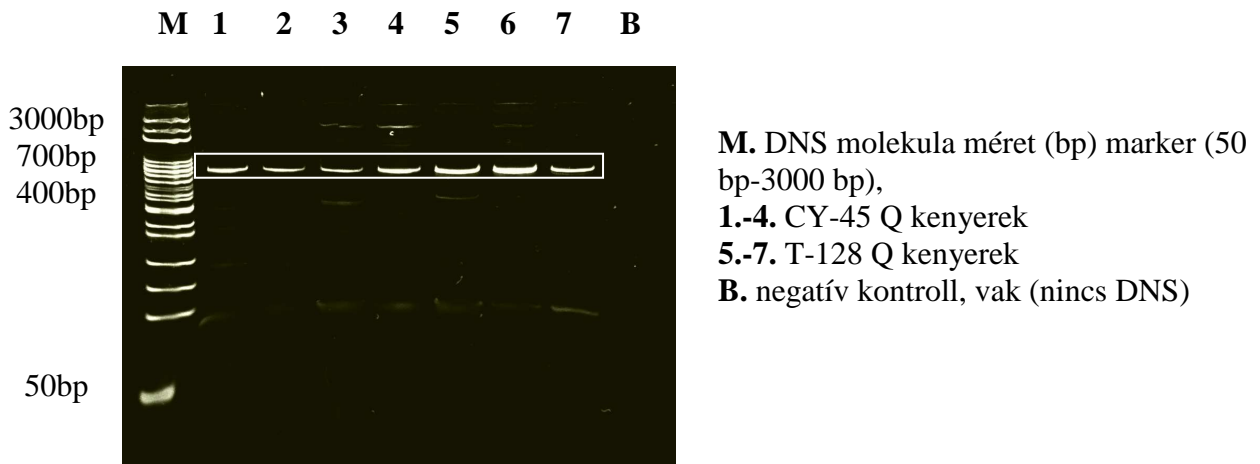
A technikailag optimált eljárással ellenőriztem a további mintáim megfelelő amplifikálhatóságát és ezáltal vizsgáltam eredetüket is.

Végeztem egy kísérletet annak felmérésére, hogy e félkész élelmiszerek, mint a száraztészták, további feldolgozása (főzés) során létrejön-e olyan szintű DNS törés, hogy az esetenként befolyásolja a további vizsgálatokat. A kétféle lisztből (durum és aestivum) készült tésztát 5 percig, majd 10 percig főztem 100°C-on, majd újra elvégeztem velük a kísérletet. Az **8. ábrán** látható az eredmény, miszerint a DNS további töredezése a főzés során nem volt olyan jelentős mértékű, hogy befolyásolja a kimutathatóságot. A DNS oldat mennyiségét a PCR reakció során azonban csökkenteni kell, hogy a jel kitisztuljon.



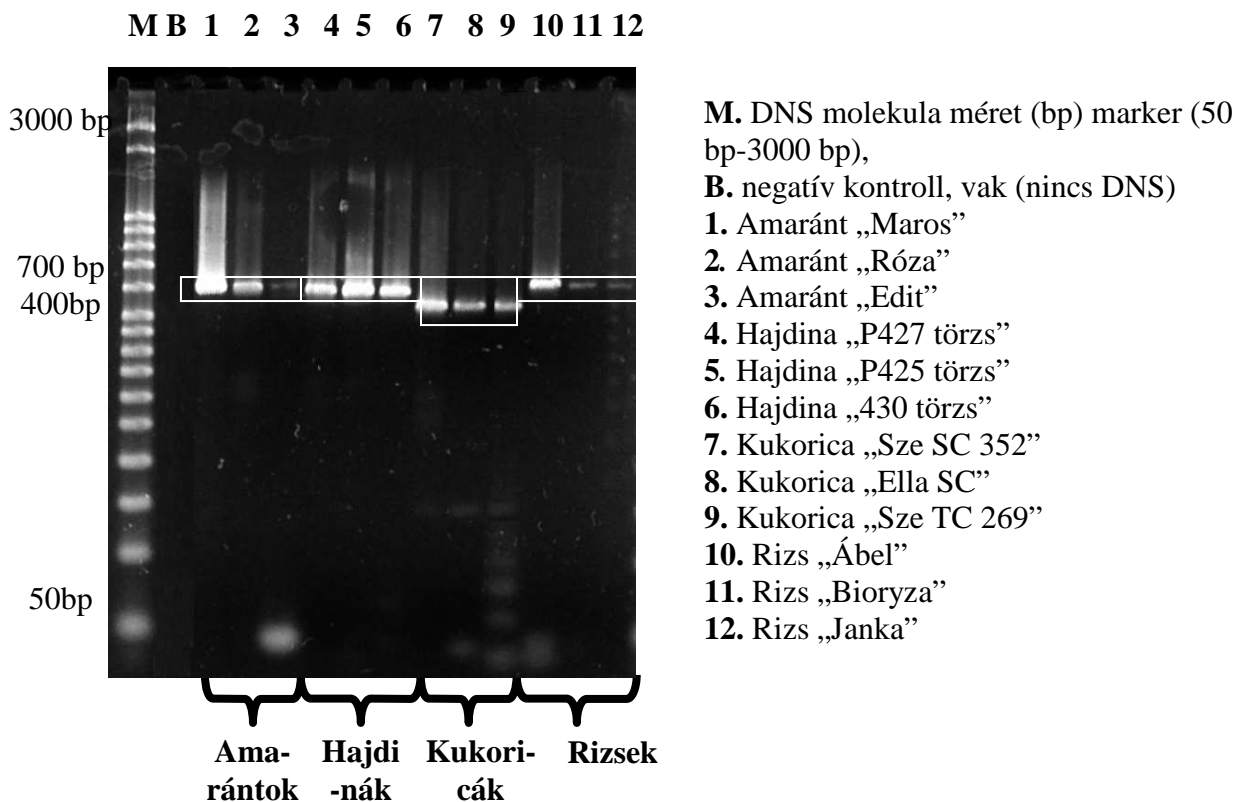
**8. ábra** 5 és 10 percig főtt tészták vizsgálata növény-specifikus kloroplasztisz primer párral (B49317/A49855)

A kenyér DNS-ek esetében fokozottan figyelni kellett sokszorozhatóságra és a PCR inhibitormentességre figyelembe véve a 250°C-os hőhatást és a Maillard-reakció során keletkező vegyületek esetleges befolyását a PCR reakcióra. A kenyérminták B49317/A49855 primer párral való sokszorozásának eredményét a **9. ábra** mutatja. Minden esetben megkaptam a 662 bp hosszúságú amplikont, tehát PCR-tisztának nevezhetőek a minták.

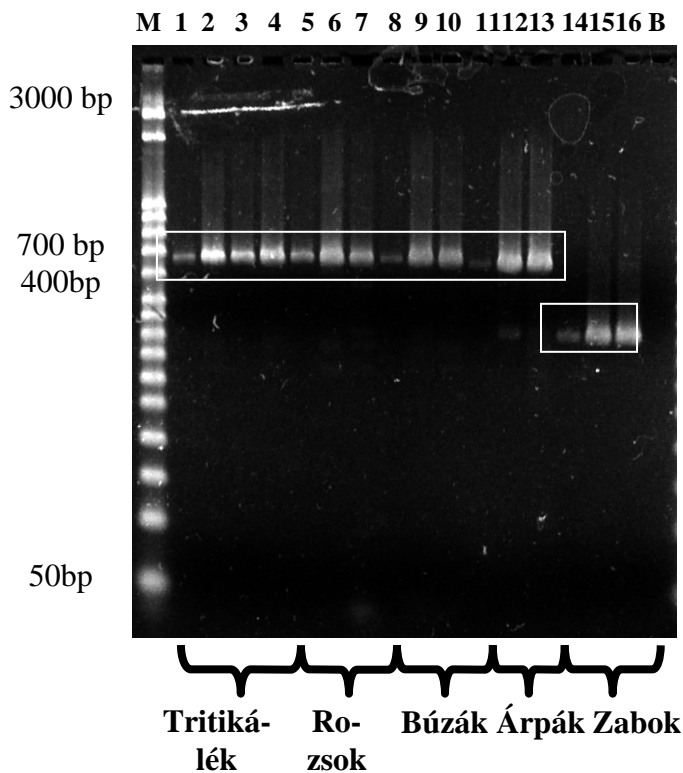


**9. ábra** Összes kenyérminta vizsgálata növény-specifikus kloroplasztisz primer párral (B49317/A49855)

Ahhoz, hogy a **7. ábra** alapján tett megállapításaimat igazolni tudjam és kizárjam a véletlent, a keresztreagáló és nem keresztreagáló gabonafélékből és a pszeudocereáliákból 3-3 fajtát amplifikáltam a növény-specifikus kloroplasztisz B49317/A49855 primer párral a kidolgozott program segítségével. Az eredmények a **10. és 11. ábrákon** láthatóak.



**10. ábra** Búzával nem keresztreagáló gabonák és pszeudocereáliák vizsgálata növény-specifikus kloroplasztisz primer párral (B49317/A49855)



M. DNS molekula méret (bp) marker (50 bp-3000 bp),

1. Tritikalé „Kargo” normál
2. Tritikalé „Kargo” stresszelt
3. Tritikalé „EMBR 18” normál
4. Tritikalé „EMBR 18” stresszelt
5. Rozs „Matador”
6. Rozs „Gamet”
7. Rozs „GK Wibro”
8. Búza „ÖKO-10”
9. Búza „D-78”
10. Búza „GK Cipó”
11. Árpa „GK Rezi”
12. Árpa „STC I. 22-03”
13. Árpa „GK Árpád”
14. Zab „GK Iringó”
15. Zab „GK Impala”
16. Zab „GK Zalán”

B. negatív kontroll, vak (nincs DNS)

**11. ábra** Búzával keresztreagáló gabonák vizsgálata növény-specifikus kloroplasztisz primer párral (B49317/A49855)

Elmondható, hogy a növény-specifikus kloroplasztisz (B49317/A49855) primer pár minden esetben kapcsolódni tudott az izolált DNS templátokhoz a PCR reakció során, és a keletkezett DNS szakaszok hossza az irodalmi forrásnak megfelelően fajtól függően 400 és 700 bázispár közé esett. Ez, a DNS PCR-rel való sokszorozhatóságán kívül, azt jelenti, hogy a kloroplasztisz DNS vonatkozásában a fajok közti genetikai különbségek és hasonlóságok megbecsülhetők a módszer segítségével (B49317/A49855 primer párt a növényi kloroplasztisz DNS egy nem kódoló szakaszára fejlesztették ki). Az általam vizsgált gabonák és pszeudocereáliák különböző fajai más-más hosszúságú amplikont eredményeztek, tehát a módszer alkalmas bizonyos mértékű előszelekcióra genetikai rokonság alapján. Ezt bizonyítja az is, hogy a keresztreagáló gabonák (búza, árpa, rozs és tritikálé) esetében majdnem azonos nagyságú (búza 662 bp, tritikálé 662 bp, árpa 642 bp, rozs 667 bp) jeleket kaptam. Ez újabb bizonyíték arra, hogy a keresztreagálók közelebb állnak genetikailag egymáshoz, mint egyéb más fajokhoz. A módszer pedig módot adhat kiszűrésükre bonyolultabb mátrixokból is. A kérdéses zab DNS-ének vizsgálata láthatólag sokkal kisebb amplikont eredményezett 405 bázispár magasságában, mint a bizonyítottan káros

prolamintartalmú gabonafélék. A géleken az is jól látható, hogy a búzával nem keresztreagáló gabonák és pszeudocereáliák jelei más régióban jelentek meg, mint a keresztreagáló fajok. A pszeudocereáliák (amarántok, hajdinák) 600 bázispárnál, a kukoricák 532 bázispárnál, a rizsek pedig az irodalmi adatoknak megfelelően 614 bázispárnál adtak jelet. Az adatokat minden esetben pontosítottam a KODAK 1D Image Analysis Software segítségével.

A további adaptált primer párok alkalmazása szempontjából elmondható, hogy a kísérlet során minden gabonaminta és hőkezelt minta esetében kaptam specifikus jelet, tehát megbizonyosodtam arról, hogy a DNS-oldatok alkalmasak további vizsgálatokra, hiszen a megfelelő hosszúságú templát DNS-ek jelen vannak és sokszorozhatóak.

## 5.2. Alkalmazott módszerek optimalítása

A DNS oldatok minőségének és sokszorozhatóságának ellenőrzése után, a glutén szennyezettség kimutatása céljából 3 féle primer pár alkalmazása mellett döntöttem. Az első a DNS eredetének meghatározására szolgáló búza specifikus TR01/TR02 primer pár, amelyet Allmann és munkatársai (1993) fejlesztettek ki szintén gluténmentes félkész termékek és élelmiszerek szennyezettségének tesztelésére. Ez az adaptált, 25-25 nukleotidból álló primer pár referenciaként szolgál majd a többi primer párral végzett vizsgálat esetében is. Tudni kell róla azonban, hogy nem glutén specifikus, hiszen egy 109 bp hosszú fragmentumot sokszoroz a búza riboszómális RNS génjének 25S és 18S lokusza között lévő intergenikus régió egy sűrűn ismétlődő szakaszán. Ennek előnye, hogy a szakasz konzervativitása miatt megbízhatóan detektál bármilyen búza maradványt, viszont a detektált nem allergént kódoló DNS szakasz még nem bizonyítéka annak, hogy allergén fehérje is előfordul a mintákban.

A második, a P1/P2 primer pár egy olyan mikroszatellit (SSR) primer pár, amely egy 150 bp hosszú DNS szakaszt sokszoroz az LMW glutenin gén mikroszatellit régiójában, az 1A lokuszon. Ezt a primert eddig molekuláris markerezésre használták (Törjék et al., 2001, 2002; Devos et al., 1995) és alkalmazásával a búzafajták közötti különbségekre próbáltak rávilágítani, de bebizonyosodott, hogy nem lehet fajták közötti különbségeket detektálni vele. Ezt az glutén specifikus primer párt először alkalmaztam gluténnel való szennyeződés kiszűrésére módszerfejlesztési céllal.

A harmadik, egy speciális kloroplasztisz DNS primer pár, szintén a *trnL* gén egy nem kódoló szakaszát, pontosabban intronját sokszorozza olyan speciális helyen, mely csak a búza, árpa és rozs

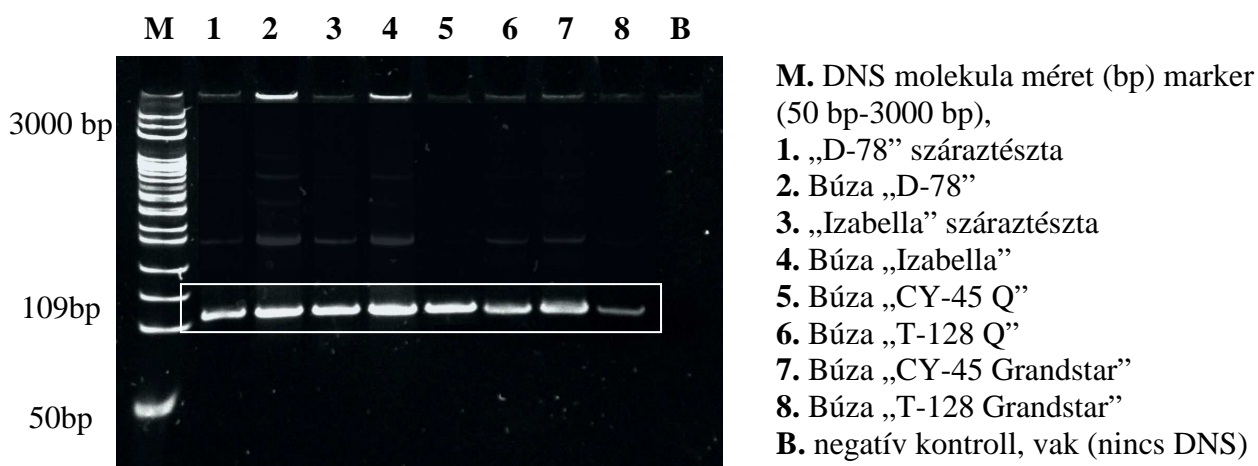


egymásnak megfelelő régiójában található, tehát alkalmassá teszi a módszert mindhárom gabonaféle kimutatására. A WBR11 és WBR13 primer pár a búza és a rozs esetében 201 bp, árpa esetében 196 bp hosszú szakaszt amplifikál (Dahinden et al., 2001). A módszer adaptálása célszerű volt, hiszen az eddigi módszerekhez képest itt úgy tervezték a primer párt, hogy az amplifikált DNS szakaszok 2 restrikciós endonukleáz hasítási helyeit tartalmazzák és ezáltal az amplikonokról további információkhoz jussunk. Ez a PCR-RFLP analízis visszajelzést ad a kísérlet pontosságáról és bizonyos részleges szekvencia információk révén a primerek pontos kötődéséről.

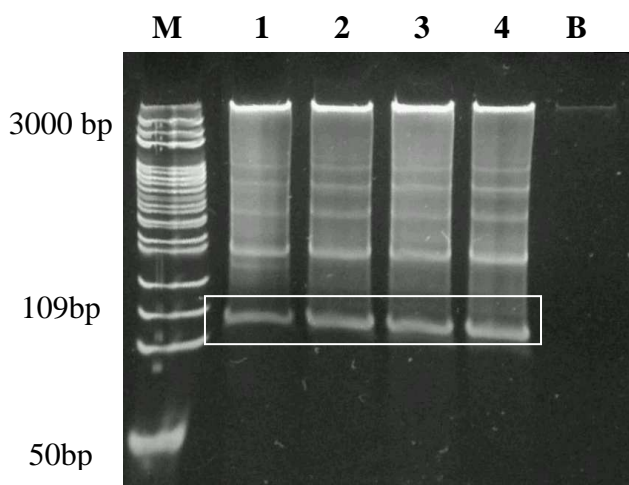
### 5.2.1. TRO1/TRO2 primer páron alapuló módszer optimalizálása

Az Allmann és munkatársai (1993) által kifejlesztett primer pár a hasonló élelmiszer vizsgálatok esetében egy meglehetősen elismert referencia primer, hiszen a búzaeredetű DNS részleteket nagy biztonsággal mutatja ki. Egy konzervatív, nem túl hosszú DNS szakasról lévén szó, minden búzafajta és, mint a kísérletekből is kiderül, hőkezelés esetében megfelelően használható.

Akárcsak a növény-specifikus kloroplasztisz primer pár esetében, itt is 3 szempont alapján választottam ki a mintákat az optimalizáláshoz. Ez a három szempont volt a fajták közötti különbség, a környezeti hatásokból adódó különbség és a hőkezelés okozta DNS roncsolódás. Minden esetben megvizsgáltam a primer pár működőképességét és olyan feltételek kialakítására törekedtem a PCR reakció során, hogy a módszer a továbbiakban az ilyen irányú szűrésre szoruló élelmiszeripari minták esetében működőképes legyen. A következő gélképeken látható, hogy a módszer minden esetben kimutatta a búza ezen DNS szakaszának jelenlétét a különböző körülmények közül származó DNS templátok esetében egyaránt, de bizonyos minták esetében a további optimalizálás is szükségessé vált (12-14. ábra).

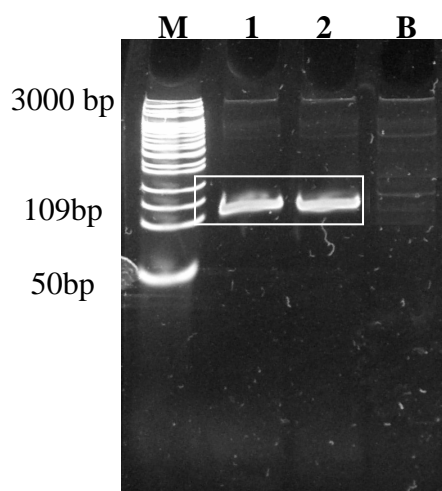


**12. ábra** Különböző búzafajták és száraztészták vizsgálata búzaspecifikus TR01/TR02 primer párral



**M.** DNS molekula méret (bp) marker (50 bp-3000 bp),  
**1.** 5 percig főzött „D-78” száraztészta (250 ng/5 µl DNS templát)  
**2.** 10 percig főzött „D-78” száraztészta (250 ng/5 µl DNS templát)  
**3.** 5 percig főzött „Izabella” száraztészta (250 ng/5 µl DNS templát)  
**4.** 10 percig főzött „Izabella” száraztészta (250 ng/5 µl DNS templát)  
**B.** negatív kontroll, vak (nincs DNS)

**13. ábra** 5 és 10 percig főzött tészták vizsgálata búzaspecifikus TR01/TR02 primer párral



**M.** DNS molekula méret (bp) marker (50 bp-3000 bp),  
**1.** CY-45 Q kenyér (25 ng/5 µl DNS templát)  
**2.** CY-45 Q kenyér (250 ng/5 µl DNS templát)  
**B.** negatív kontroll, vak (nincs DNS)

**14. ábra** Kenyerek vizsgálatának optimálása búzaspecifikus TR01/TR02 primer párral

Az optimálás során több helyen változtatnom kellett az irodalmi forrásban szereplő PCR termociklikus program beállításán ahhoz, hogy megfelelően működjön az erősebben hőkezelt minták esetében az adott laboratórium körülményei között is.

- Alkalmaztam elődenaturációt a cikkben leírt 30 perces 37°C-os előinkubálás helyett, kiszűrve ezzel a nagyon sok, nem specifikus termék képződését.
- A rövid denaturációs idő nagyon rövidnek bizonyult a teljes DNS mennyiség egyszálúsításához, ezért megnöveltem 1 s-ról 20 s-ra.

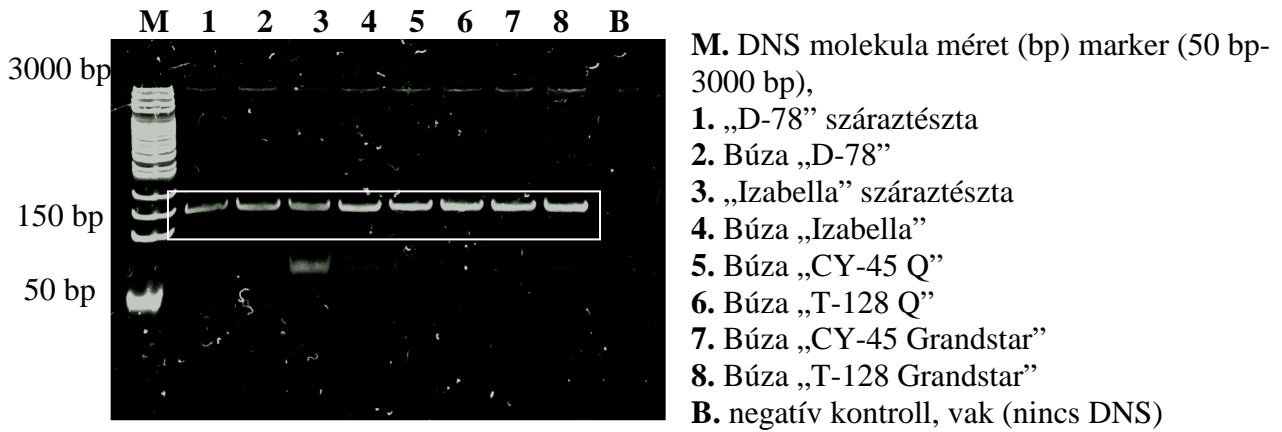
- 68°C-ról fokozatosan csökkentettem a primer kapcsolódási hőmérsékletet 65°C-ra, ami még nem volt nagyon alacsony a nem specifikus termékek képződéséhez, viszont elég alacsony volt ahhoz, hogy az erősen hőkezelt termékek esetében is (pl. kenyerek) megtalálja a primer a széttöredezett DNS szakaszok közül a megfelelőt.

A magas hőmérsékleten hőkezelt termékeknél a tapasztalat szerint jóval magasabb DNS koncentrációt kell alkalmazni, hogy a töredezettség ellenére biztosítva legyen a primer megfelelő kötődése. Ezt a **13.** és **14. ábra** mintáinál a PCR elegy összemérése során alkalmazott töményebb DNS oldat hozzámérésével értem el. A főzött tészták esetében azonban jól látható, hogy a magas templát koncentráció a várt amplikonok mellett még nem specifikus szakaszok sokszorozásához vezethet, tehát ezekben az esetekben indokolt a kisebb DNS koncentráció alkalmazása a PCR elegyben.

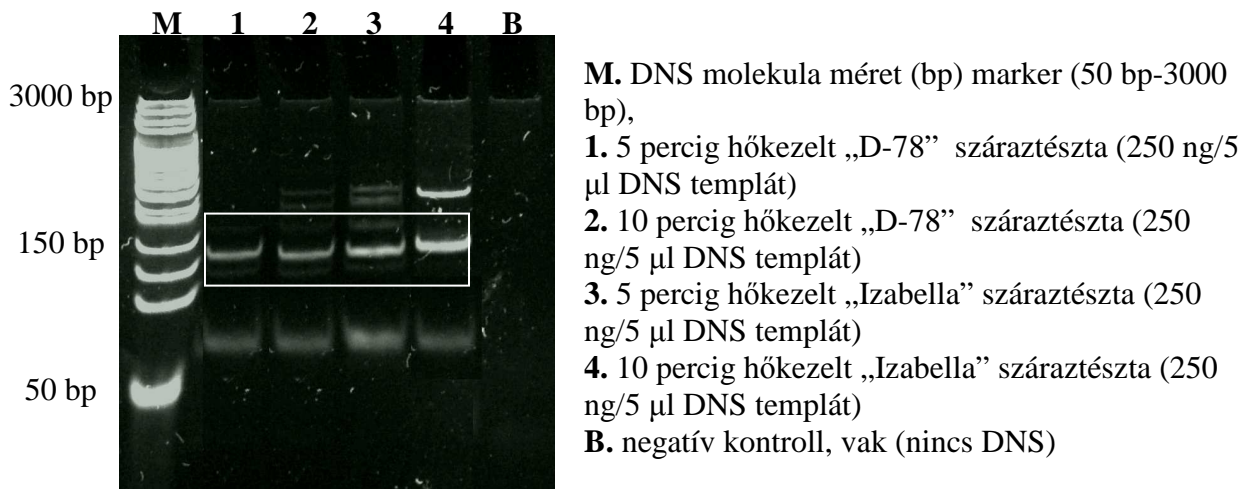
### **5.2.2. P1/P2 primer páron alapuló módszer optimalizálása**

Erről az LMW glutenin specifikus primer párról elmondható, hogy eredetileg molekuláris markerek (fajtára jellemző genetikai jegyek) keresésére tervezték (Devos et al., 1995), tehát pontosan ellenkező funkcióra szánták, mint amire én alkalmaztam. A Törjék és munkatársai (2001) bebizonyították azonban, hogy egy olyan mikroszatellit régióban sokszoroz, amely nem különbözik az egyes fajtáknál. A primer párnak ezt a tulajdonságát, és a glutén specifikus mivoltát figyelembe véve fejlesztettem a segítségével glutén detektálására alkalmas módszert.

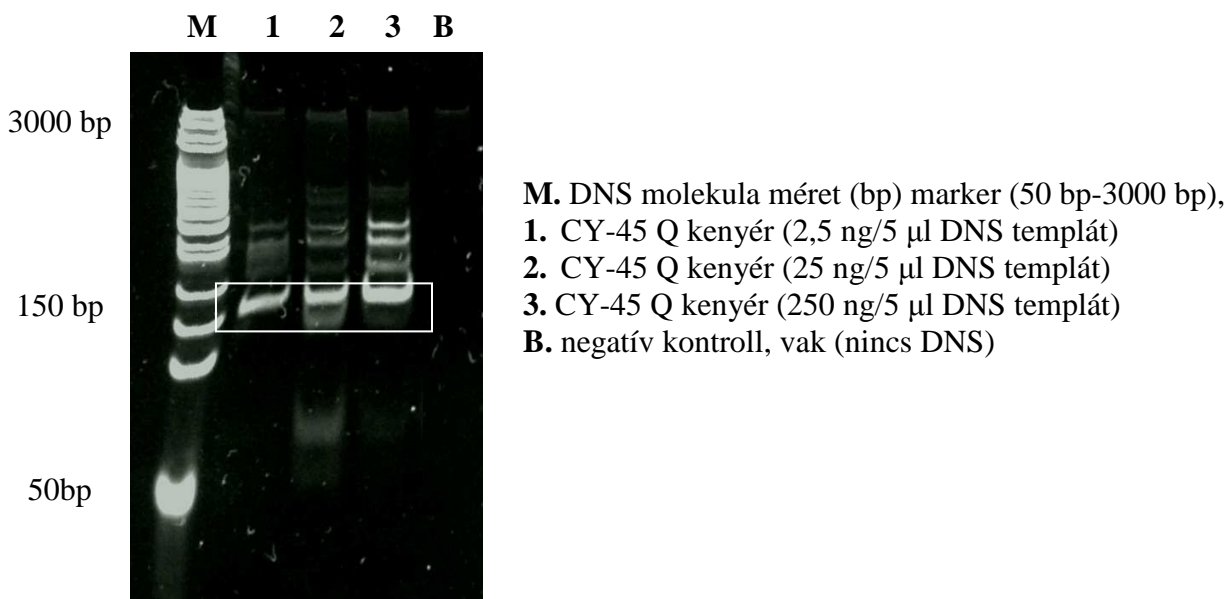
A primer minimális optimalizálás után minden megvizsgált esetben kiválóan és reprodukálhatóan működött. Nem kaptam különböző méretű PCR termékeket a különböző búzafajták esetében sem (**15. ábra**), igazolva ezzel Törjék és munkatársai állítását. Nem specifikus termék is ritkán amplifikálódott az optimalizációs eljárás során, aminek az oka általában a hőkezelt termékek esetében az előbb említett nagyobb DNS koncentráció volt (**16-17. ábra**). Az optimalizálás során a templát DNS koncentrációjának beállítása megtörtént. A koncentráció változtatásán kívül nem volt szükség egyéb optimalizációs lépésre, az irodalomban szereplő termociklikus program megfelelt a specifikus, 150 bp hosszú szakasz sokszorozásához.



**15. ábra** Különböző búzafajták és száraztészták vizsgálata gluténspecifikus P1/P2 primer párral



**16. ábra** 5 és 10 percig főzött tészták vizsgálata gluténspecifikus P1/P2 primer párral

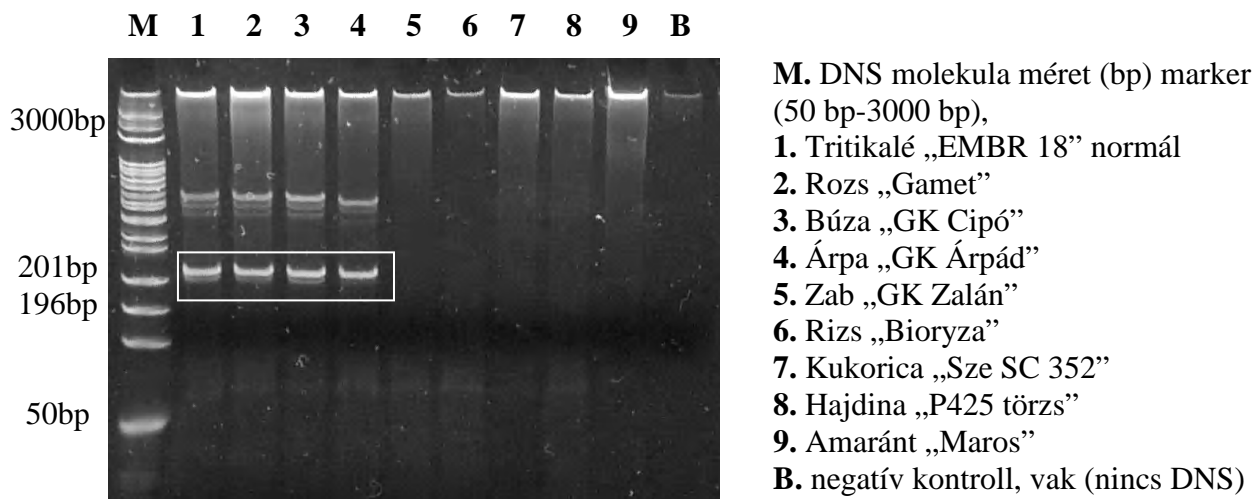


**17. ábra** Kenyerek vizsgálatának optimalálása gluténspecifikus P1/P2 primer párral

### 5.2.3. WBR11/WBR13 primer páron alapuló módszer optimalálása

Ezzel a primer párral búza, árpa és rozs DNS-maradványokat detektáltam a Dahinden és munkatársai (2001) által kifejlesztett PCR módszer alapján, majd az Olexová és munkatársai (2004), illetve a Kuchta (2004) RFLP-vizsgálattal továbbfejlesztett módszerét adaptáltam és optimaláltam a saját mintáimra. Ennek a primer párnak az esetében az optimalálásra használt minták kiválasztási szempontjait elsősorban a primernek az a speciális volta befolyásolta, mely szerint egyszerre detektál búzát, árpát és rozst. A primer párt első sorban a Magyarországon köztermesztésben lévő gabonafajok egyes fajtáira optimaláltam.

A primer párt úgy tervezték, hogy az egyes kutatók által elfogadott, azonban még mindig vitatott állítás szerint működjön, és a zabot, amely több esetben sem bizonyult toxikusnak a cöliákiások számára, ne mutassa ki a mintákból. Ezt a megkülönböztetést a módszer fejlesztői azoknak a lényeges genetikai eredetű különbségeknek tulajdonítják, amelyek fennállnak a 3 tiltott gabonaféle és a zab azonos funkciójú DNS részletei között.



**18. ábra** Kilencféle gabona és pszeudocereália vizsgálata búza-, árpa- és rozs-specifikus WBR11/WBR13 primer párral

Ahhoz, hogy a WBR11/WBR13 primer pár megfelelően működjön az adott laboratóriumi körülmények között, itt is el kellett térnem kis mértékben a Dahinden és munkatársai (2001) által leírt termociklustól.

A PCR-programot a WBR11/WBR13 primer pár esetében a következő pontokban változtattam meg:

- A ciklusszámot két lépcsőben 45-ről 35 ciklusra csökkentettem, hogy elkerüljem itt is a nem specifikus termékek képződését.
- A primer pár kapcsolódásának hőmérsékletét 59°C-ról 60°C-ra emeltem a specifikusabb termékek sokszorozódása érdekében.

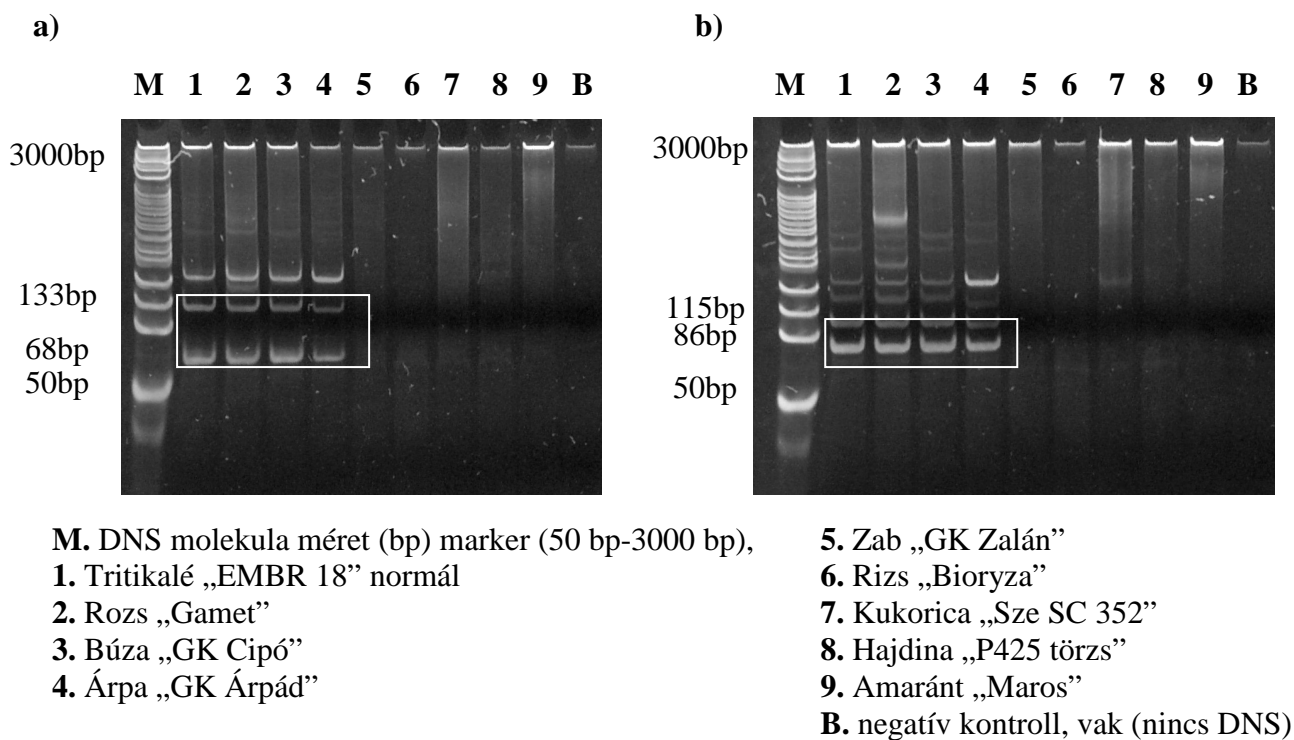
A WBR11/ WBR13 primer páron alapuló módszert a Magyarországon köztermesztésbe vont gabonafélékre adaptáltam, hogy a rendszer alkalmassá válhasson hazánkban a fehérje módszerek mellett kiegészítő, illetve megerősítő vizsgálatokra. A WBR11/ WBR13 primer párral amplifikált DNS szakaszoknak búza és rozs esetén 201 bp-nál, árpánál pedig 196 bp-nál kellett jelet adniuk a futtatás után. Mint ahogy a gélképen (**18. ábra**) jól látszik, a várt jeleket megfelelő helyeken kaptam. Minden mintánál kaptam 500 bp mérettartományba eső nem-specifikus PCR-termékeket, amelyeket további optimalizálással legtöbb esetben sikerült eltüntetnem. A **18. ábrán** jól látható, hogy

a módszer a három alapvetően tiltott gabonafélén kívül a rozsból és búzából nemesített, Magyarországon sűrűn előforduló tritikálé detektálására is alkalmas. Tritikálé a búza és a rozs keresztezéséből származó növény, genetikai állományuk is nagyon hasonló és cöliákiások számára ugyanúgy tiltott gabonaféle, mint a búza, a rozs és az árpa, így esetében a kapott amplikon is indokolt.

Az allergén-szempontról sokat vitatott zab az irodalmi adatokat megerősítve nem adott jelet ennél a kísérletnél, tehát negatív mintaként kezelhető.

### 5.2.3.1. PCR-RFLP vizsgálat optimalizálása

Az PCR-RFLP restrikciós enzim hasítást megerősítés céljából, az irodalmi leírás szerint adaptáltam, hogy elkerüljem a fals-pozitív eredményeket. Az enzim hasítás lényege az, hogy a PCR reakció során a WBR11/WBR13 primer pár által amplifikált DNS szakaszokat a kétféle restrikciós enzim ismert hasítási helyen elhasítja. Ha az emésztés után mindkét esetben a megfelelő régióban kapunk jelet, akkor bebizonyosodik, hogy a megfelelő szekvenciát amplifikálta a primer. A hasítások létrejöttével részleges szekvencia információkhoz jutunk, így alátámasztva a kontaminációt okozó gabonaféle DNS-ének jelenlétét.



**19. ábra** Kilencféle gabona és pszeudocereália WBR11 / WBR13 primer párral amplifikált PCR-terméke *AluI* (a) és *BsmAI* (b) enzimmal emésztve

Az *AluI* esetében csak akkor pozitív a minta, ha az eredeti 201 bp (illetve árpa esetében 196 bp) hosszú szakaszt a restriktív enzim két részre hasította, egy 68 és egy 133 bázispár (illetve árpa esetében 68 és 128 bázispár) hosszú szakaszra. Ahogy ezt a **19. a) ábra** is bizonyítja, kísérleteim igazolták ezeket az állításokat a búza, árpa, rozs és tritikálé esetében is.

A fenti ábrán két jel helyett három látható, a harmadik jel 201 és 196 bázispár magasságban található, amely azt bizonyítja, hogy az enzim nem tudta lebontani az oldatban lévő összes PCR terméket és így a kiindulási DNS fragmentum is látszik a gélen. Az optimálás során az emésztési idő növelésével halványodott a jel, de nem minden esetben sikerült véglegesen eltüntetni.

A *BsmAI* enzim esetében pozitív jelet akkor kaptam, amikor az eredeti 201 bp (árpa esetében 196 bp) hosszú szakaszt a restriktív enzim két részre hasította, melynek egyik fele 86 bp a másik pedig 115 bp (árpa esetében 86 és 110 bp) magasságban jelent meg. Kísérleteim igazolták ezt búza, árpa, rozs és még tritikálé esetében is (**19. b) ábra**). Ebben az esetben is fennáll, hogy az enzim nem tudta lebontani az oldatban lévő összes PCR terméket és így a kiindulási DNS fragmentum is látszik a gélen. Az optimálást ebben az esetben is elvégeztem, így az emésztési idő növelésével itt is halványodott a jel, de itt sem sikerült minden esetben eltüntetni azt.

A *BsmAI* enzim hasítási helye egy, a genetikai állományokban sűrűn előforduló részletnél van. Azoknál a mintáknál, ahol nem sikerült teljesen eltüntetni a WBR11/13 primer által amplifikált, korábban már említett, kb. 500 bp hosszú nem specifikus terméket, ott ez az enzim ezt a terméket tovább hasította több (4-5) kisebb részletre. Ezeket a maradvány termékeket azokban az esetekben sikerült véglegesen eltüntetni, amelyeknél a fent említett optimálási eljárás segítette az 500 bp hosszú szakaszt eltüntetni.

### **5.3. A primer párok alkalmazhatósága specifikus DNS szekvenciák kimutatására és megkülönböztetésére**

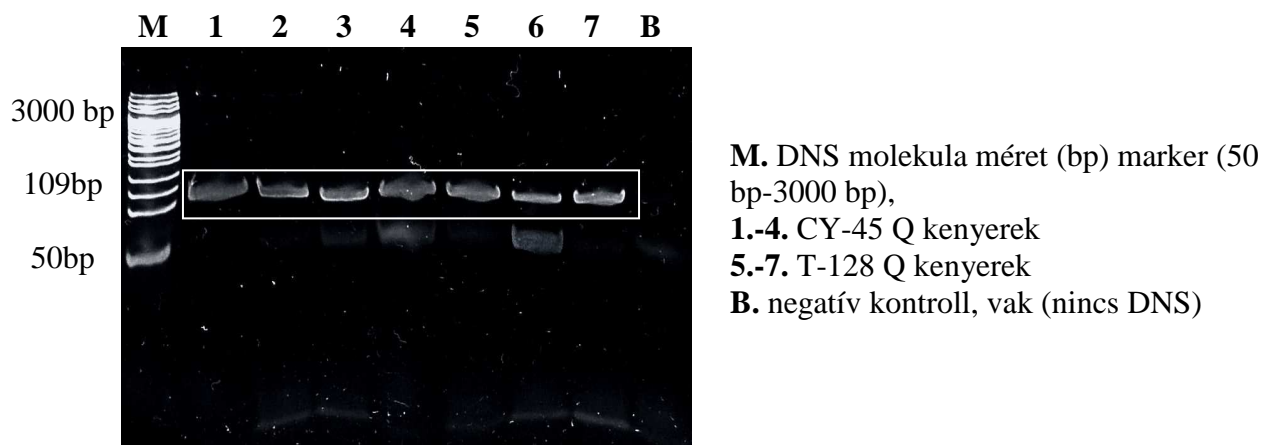
Az adaptált és fejlesztett módszerek optimálása után került sor a további minták vizsgálatára. A primer párok működéséhez szükséges, előző fejezetekben ismertetett optimális feltételek megteremtése után a hőkezelt minták, a keresztregáló és nem keresztregáló gabonák, a pszeudocereáliák, illetve az ipari kísérleti minták és a további kísérleti termékek vizsgálatára került sor. A minták tesztelésére az eddig ismertetett módszereket alkalmaztam.

#### **5.3.1. TR01/TR02 primer párral végzett kimutatás eredményei**

A TR01/TR02 primer pár működéséhez szükséges optimális feltételek megteremtése után először a búzakenyér minták vizsgálatára került sor, melyek között volt hagyományos búzaliszt



alapanyagból és génkezelt búzából származó liszt alapanyagból készült kenyér egyaránt (**20. ábra**). A mintaelőkészítést itt is a teljes kenyerek szeletelése, szárítása és darálása (homogenizálása) jelentette.



**20. ábra** Összes kenyérminta vizsgálata búzaspecifikus TR01/TR02 primer párral

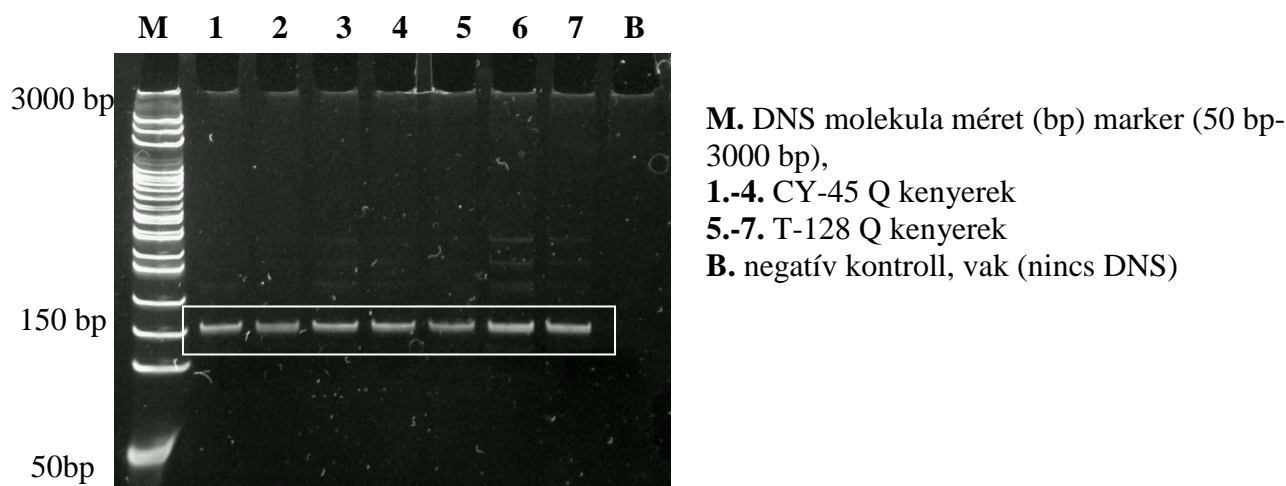
A hőkezelés (kemencében történt sütés) ellenére az ábrán mindkét féle lisztből készült kenyér esetében tiszta specifikus jeleket kaptunk 109 bp magasságban. Az ábra bizonyítja, hogy a primer nem tesz különbséget a hagyományos és az adott, genetikailag módosított gabona fajták között sem. Ezen kívül az erősen hőkezelt minták esetében is megfelelő jeleket kaptunk. Néhány minta esetében előfordult „primer dimer” képződés, amelynek oka lehet a mintákban a relatív nagyobb primer koncentráció a még ép templát mennyiségéhez képest. Azok a primer párok, amelyek már nem találtak több megfelelő hosszúságú, specifikus DNS szakaszt, összekapcsolódtak egymással.

Vizsgáltam a módszerrel a keresztreagáló és nem keresztreagáló gabonaféléket (rozs, árpa, zab, tritikálé, rizs, kukorica) és pszeudocereáliákat is (hajdina, amaránt), de, mint az várható volt egy ilyen konzervatív búza DNS szakaszra tervezett primer esetében, nem kaptam sem specifikus, sem rossz primer bekötődést bizonyító jelet. Ezekben az esetekben a primer pár nem talált templátot, ezért nem tudott amplikonokat létrehozni.

Ezzel a primer párral csak búzaeredetű DNS detektálható nagy biztonsággal.

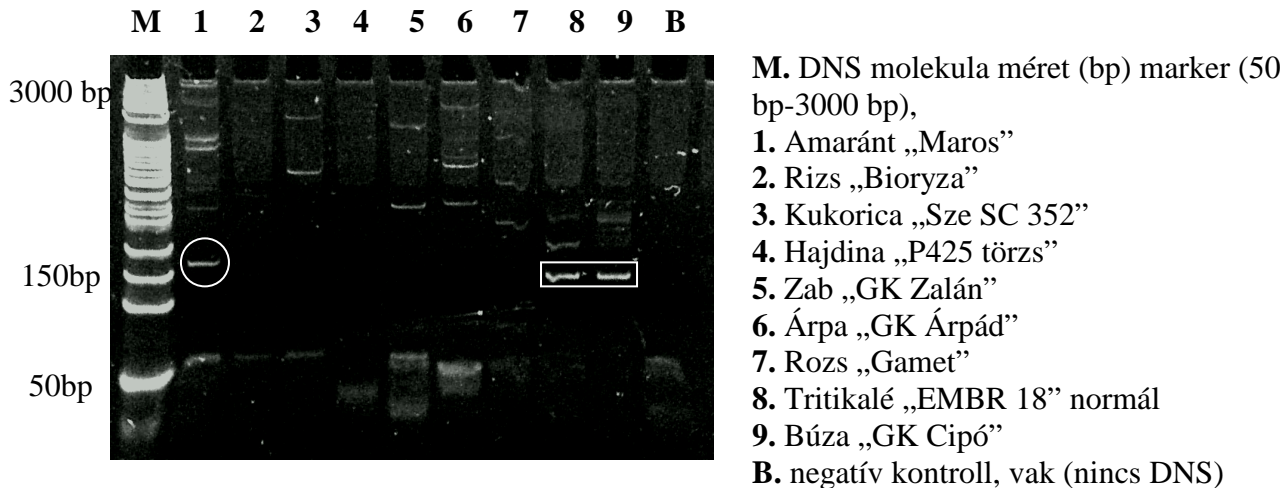
### 5.3.2. P1/P2 primer párral végzett kimutatás eredményei

A mikroszatellit primer pár esetében ugyanúgy, mint a búza specifikus primer párnál, vizsgáltam az erősen hőkezelt kenyereket és a különböző keresztreagáló gabonaféléket és pszeudocereáliákat.



**21. ábra** Összes kenyérminta vizsgálata gluténspecifikus P1/P2 primer párral

A **21. ábra** mutatja, hogy a 150 bp hosszúságú szakaszt minden esetben amplifikálta a primer, függetlenül a hőkezelés magas fokától és a búza fajtájától (hagyományos és genetikailag módosított). Ezt a primert még nem használták hőkezelt élelmiszer minták tesztelésére és a vártnál jobb eredmények alapján arra következtethetünk, hogy ez a módszer alkalmassá válhat a búza LMW-glutenin specifikus részletének rutinszerű kimutatására.



**22. ábra** Kilencféle gabona és pszeudocereália vizsgálata gluténspecifikus P1/P2 primer párral

Habár a P1/P2 primer pár LMW-glutenin specifikus, elvégeztem a tesztet más keresztreagáló gabonafélékre, nem keresztreagáló gabonafélékre és pszeudocereáliákra egyaránt. Az eredmény szerint (**22. ábra**) a legtöbb búzával keresztreagáló gabonaféle (rozs, árpa) nem adott jelet, illetve nem specifikus jelet adott annak ellenére, hogy mindegyik ugyanúgy ártalmas a cöliákiásokra nézve, mint a búza. Specifikus jelet (150 bp) adott viszont a tritikálé, hiszen mint korábban szó volt róla, a nemesítése következményeként tartalmazza a búza génállományának nagy részét.

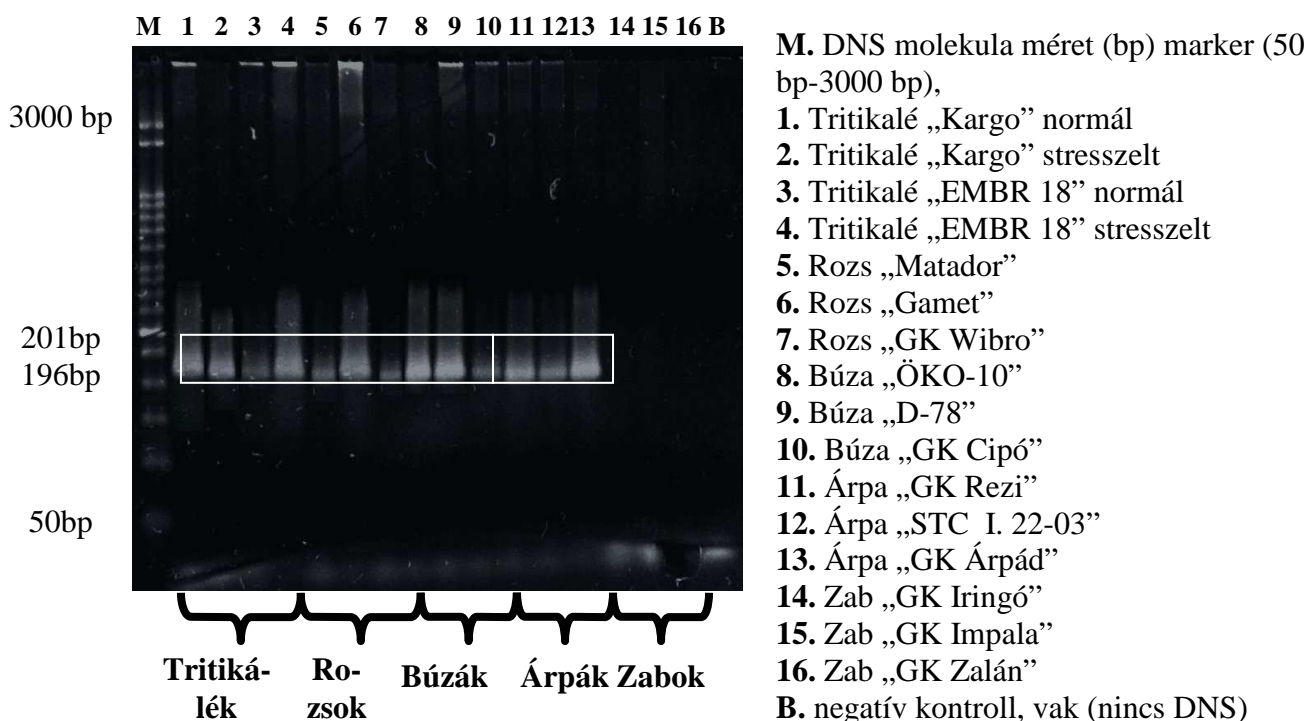
A kísérlet során kaptam még egy megtévesztő jelet az amaránt esetében, mely ugyan nem teljesen specifikus, viszont a körülbelül 180 bp hosszúságú szakasz (KODAK 1D Image Analysis Software segítségével megbecsülve) egy kevésbé jó felbontású gélelektroforézis futtatás során megtévesztő lehet. Ezért az ezzel a módszerrel végzett vizsgálatok során az amaránt alkalmazása negatív kontrollként kerülendő.

Azt hangsúlyozni kell azonban, hogy a keletkezett DNS szakasz hosszúságáról és szekvenciájáról nincsen pontos információ, így azt sem lehet megmondani, hogy az adott amplifikált szakasz a genom mely részéből származik. Semmiképpen nem lehet viszont azt a következtetést levonni egy nem specifikus szakasz alapján, hogy az amaránt tartalmazna allergén részleteket (például: LMW-glutenint).

Az általam kifejlesztett módszer csak búza és tritikalé kontamináció kimutatására alkalmazható nagyon jó hatékonysággal.

### 5.3.3. WBR11/WBR13 primer párral végzett kimutatás eredményei

Az előző fejezetekben már ismertetett WBR11/WBR13 primer pár optimálása után, sor került a különböző gabonafajok 3-3 fajtájának egyidejű amplifikálására ezen primer párral.

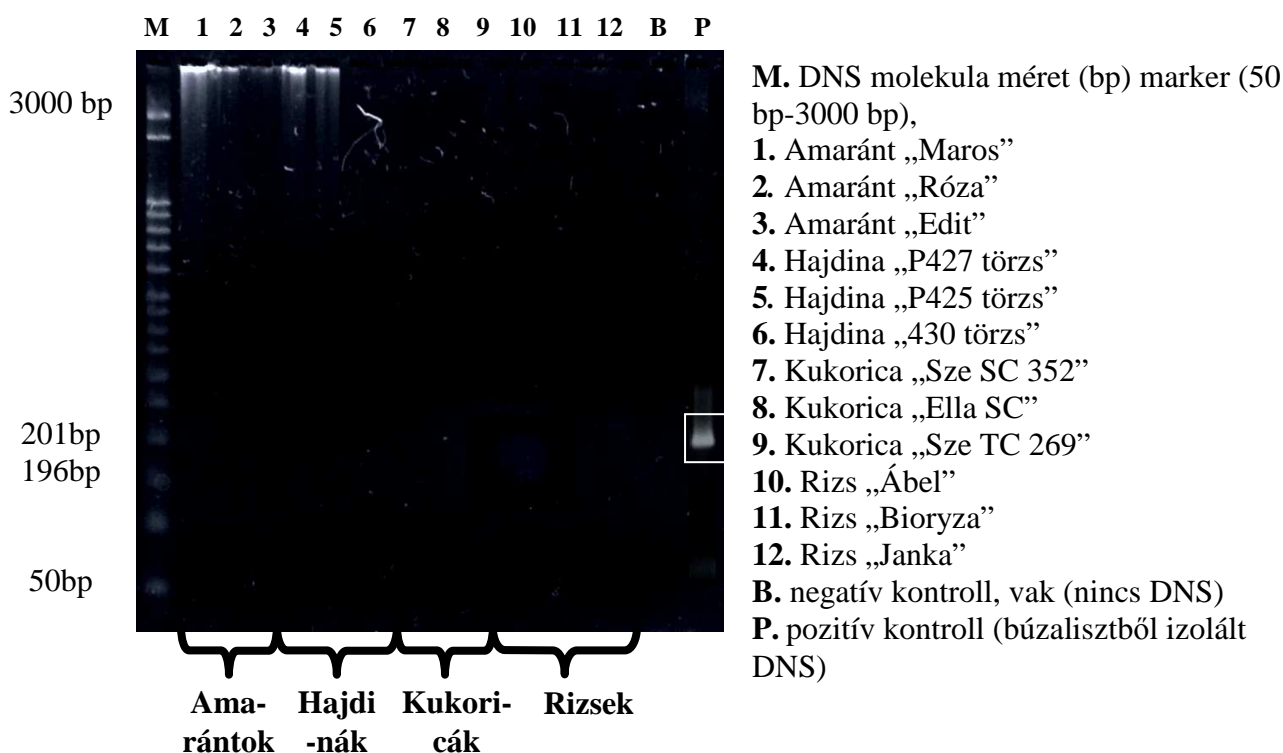


**23. ábra** Búzával keresztregáló gabonák vizsgálata búza-, árpa- és rozs-specifikus WBR11/WBR13 primer párral

A **23. ábrán** a búzával keresztreagáló gabonafélék (árpa, rozs, tritikálé), illetve a keresztreakció szempontjából kérdéses gabonaféle (zab) vizsgálatáról készült felvétel látszik, ahol kétséget kizáróan kitűnik, hogy a zab egyáltalán nem tartalmazza azt a genetikai szekvenciát, mint az egyértelműen keresztreagáló gabonák.

Ahogy a **23. ábrán** jól látható, a tritikáléknál, rozsoknál és búzáknál a 201 bázispár hosszúságú DNS-szakaszok jelentek meg, az árpa mintáknál a fragmentumok kicsivel lejjebb, 196 bázispárnál adtak jelet. Ez a különbség főleg a 10-es és 11-es sorszámú minták összehasonlításánál látható, de 5 bázispárnyi különbség ennél a felbontásnál, a gélelektroforézis hibaszázalékát is figyelembe véve alapvetően nem látható.

A módszerrel az összes tritikálé fajta glutén specifikus jellel detektálható, így kibővítve ezzel a vizsgálható cöliákiát okozó gabonafélék számát és így a primer pár funkcióját.

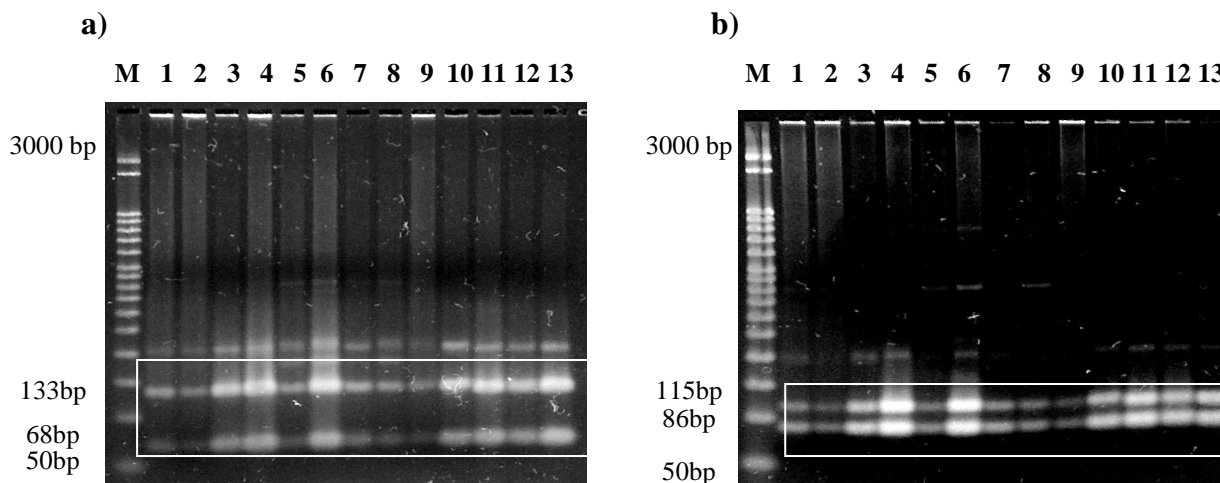


**24. ábra** Búzával nem keresztreagáló gabonák és pszeudocereáliák vizsgálata búza-, árpa- és rozs-specifikus WBR11/WBR13 primer párral

A búzával nem keresztreagáló gabona minták vizsgálata során a WBR11/WBR13 primer pár alkalmazásával a pozitív kontroll kivételével egyetlen mintánál sem kaptam jelet a gélen (**24. ábra**). Mindegyik amarántból, hajdinából, kukoricából és rizsből izolált DNS negatívnak bizonyult, tehát nem található meg bennük a búzára, rozsra, árpára és tritikáléra jellemző DNS szakasz. Így ezzel a módszerrel jól elválaszthatók a keresztreagáló mintáktól ezek a gabonafélék és pszeudocereáliák.

### 5.3.3.1. PCR-RFLP vizsgálat eredményei

A **23. ábrán** látható, pozitív jeleket adó minták DNS-eit PCR-RFLP technikát alkalmazva *AluI* és *BsmAI* restriktációs endonukleázokkal emésztettem. A restriktációs hasítás után kapott jelek a **25. ábrán** láthatók.



- |   |                                |
|---|--------------------------------|
| <b>M.</b> DNS molekula méret (bp) marker (50 bp-3000 bp), | <b>7.</b> Rozs „GK Wibro”      |
| <b>1.</b> Tritikalé „Kargo” normál                        | <b>8.</b> Búza „ÖKO-10”        |
| <b>2.</b> Tritikalé „Kargo” stresszelt                    | <b>9.</b> Búza „D-78”          |
| <b>3.</b> Tritikalé „EMBR 18” normál                      | <b>10.</b> Búza „GK Cipó”      |
| <b>4.</b> Tritikalé „EMBR 18” stresszelt                  | <b>11.</b> Árpa „GK Rezi”      |
| <b>5.</b> Rozs „Matador”                                  | <b>12.</b> Árpa „STC I. 22-03” |
| <b>6.</b> Rozs „Gamet”                                    | <b>13.</b> Árpa „GK Árpád”     |

**25. ábra** Búzával keresztreagáló gabonák WBR11/WBR13 primer párral amplifikált PCR-terméke *AluI* (a) és *BsmAI* (b) enzimmel emésztve

Az **23. ábrán** jelet eredményező tizenhárom minta DNS amplikonjain alkalmaztam az enzim emésztést. Az *AluI* esetén 133 bázispár és 68 bázispár hosszúságú DNS-fragmentumok keletkeztek, melyek megerősítették a pozitív eredményeimet (**25. a) ábra**). Sok esetben, mint azt az optimálás során is láttuk, 201 bázispár magasságban kaptam egy harmadik jelet, mely valószínűleg azért keletkezett, mert az enzim nem tudta az összes PCR terméket feldolgozni az oldatból. Ez a fölösleges jel akkor sem tűnt el egyértelműen, amikor az emésztési időt és az enzim koncentrációt jelentősen megnöveltem. Valószínűleg azért nem, mert az enzim idő előtt inaktiválódott a rendszerben.

A *BsmAI* enzimmel való emésztés után minden minta esetében igazolódott, hogy a WBR11/WBR13 primer pár a megfelelő DNS szakaszt sokszorozta. Ott kaptam jelet mind a 13 pozitív minta esetében, ahol az irodalom szerint várható volt, vagyis a 115 bázispár és a 86 bázispár magasságban. Az eredmény a **25. b) ábrán** jól látszik.

Így mindkét enzim eredményeit összevetve sikerült igazolnom a **23. ábrán** látható eredményeim hitelességét.

## **5.4. Gyakorlati alkalmazások**

Az eddigi sikeres vizsgálatok után következett a módszerek gyakorlati alkalmazhatóságának igazolása. Gyakorlati alkalmazásnak tekinthető például egy technológiai gyártósor kritikus kontroll pontjainak megállapítása a módszerek segítségével a jó gyártási gyakorlat kialakítása céljából, vagy egy bevezetés alatt álló, illetve már bevezetett gluténmentes termék gluténnal való szennyezettségének ellenőrzése.

A következőkben egy gluténmentes kenyeret gyártó sütőipari üzem ellenőrzését, valamint a gyártósor mesterségesen megtervezett és végrehajtott szennyezését végeztem el, majd az így vett minták gluténmentességét ellenőriztem abból a célból, hogy a technológia kritikus pontjai pontosabban definiálhatóak legyenek.

Másrészről gyakorlati alkalmazásnak tekinthető egy cöliákiás fogyasztóknak szánt, kifejlesztés alatt álló száraztészta gluténmentességének ellenőrzése is. Ennek a tésztának az alapanyaga sárgaborsó liszt, amelyet a lisztérzékenységekben szenvedő betegek is fogyaszthatnak. Ennek a terméknek az előzetes, gluténmentességre vonatkozó szűrését végeztem el a kifejlesztett és az adaptált módszerekkel.

### **5.4.1. Gluténmentes sütőipari technológia kritikus kontroll pontjainak meghatározása**

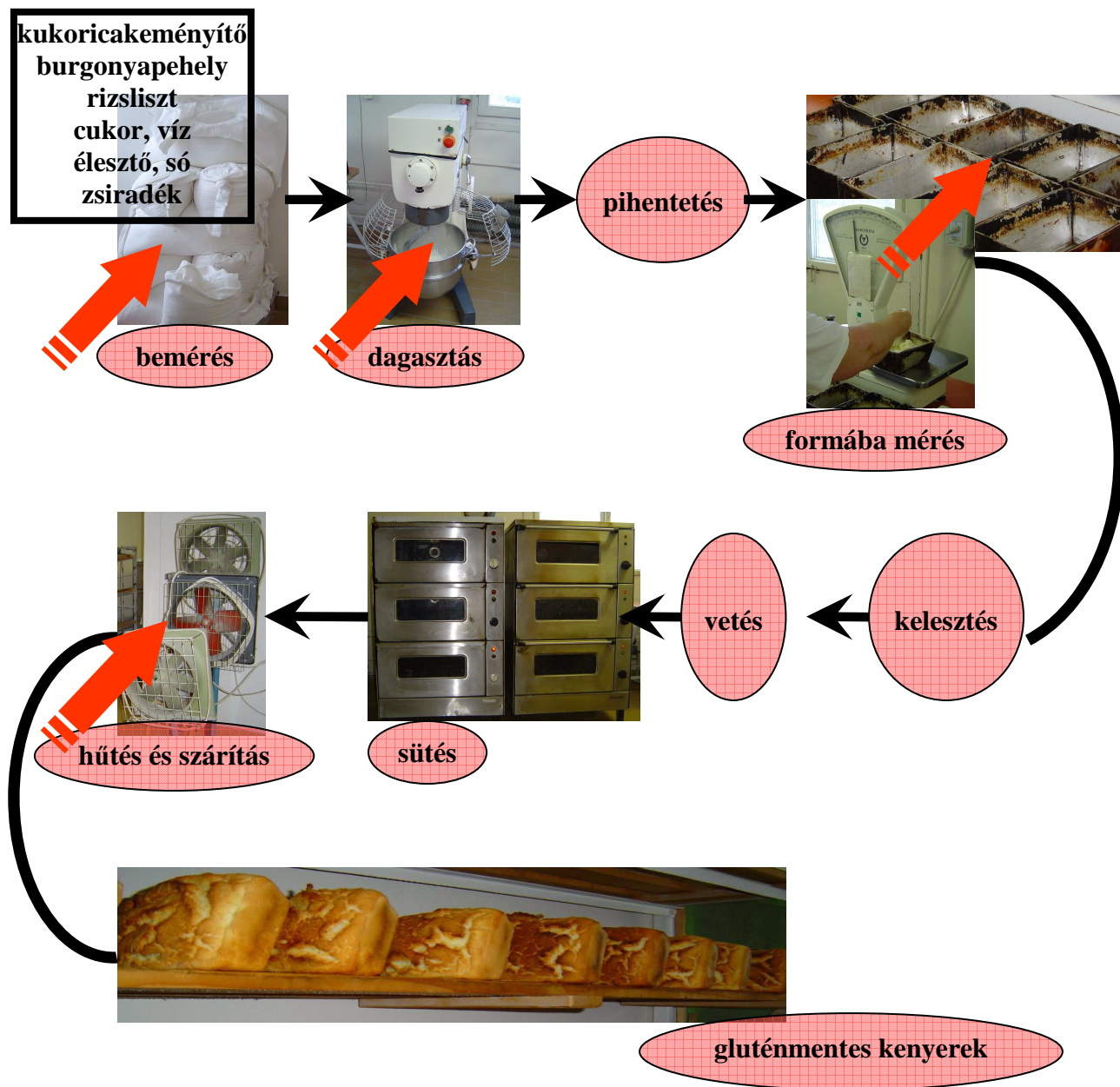
A Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt. (2006-ban felszámolták) egyik speciális terméke a gluténmentes kenyér volt, amelyet széles körben értékesített a speciális diétát igénylő, cöliákiában szenvedő betegek körében. Ezt a terméket az üzem teljesen elkülönítve gyártotta (üzemtől elszeparált épület, külön nyersanyag-raktárhelyiség, független személyzet, külön mosogatóhelyiség) nagyon komoly egészségügyi előírásoknak és szabályoknak megfelelően engedélyezett technológia alapján (**26. ábra**).



**26. ábra** Gluténmentes kenyér csomagolásán feltüntetett adatok

A technológia lényege kukoricakeményítóből, burgonyapehelyből és rizslisztből (a pontos receptúrát, illetve arányokat a cég nem bocsátotta rendelkezésünkre) dagasztással olyan állagú és szerkezetű tészta létrehozása, amely sütés során ízben, állományban és látványban is élvezhető kenyeret eredményez (**27. ábra**). A glutén szerkezetjavító hatásának hiánya miatt ez a tészta nem hasonlít a hagyományos dagasztott kenyértésztához, hanem annál jóval hígabb, folyósabb állagú. Emiatt a technológia is eltér a hagyományostól, még hozzá annyiban, hogy itt fém kenyérformákban öntve vetik a kemencékbe a kenyértésztát. A sütés alatt a formákban megemelkedik és kenyérformájúvá alakul a tészta. A másik eltérés a hagyományos technológiáktól az, hogy ez a fajta kenyér sütés után is nagyon magas nedvességtartalommal rendelkezik, így, hogy a gyors romlást és penészedést elkerüljék, csomagolás előtt 24 órán keresztül szárítják egy erre a célra kialakított, szeparált helyiségben.

A Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt. engedélyezte számomra, hogy egy kivételes kísérletsorozatot hajtsak végre az üzemen belül. Először a technológiai folyamat különböző pontjairól mintákat vettem, hogy az esetleges, kísérlettől független szennyeződések kimutathatóak legyenek. Ezek után elvégeztem egy mesterséges kontaminációs kísérletet is, amelynek során vizsgáltam, hogy ha hiba történik (jelen esetben, ha véletlenszerűen minimális glutén kerül a rendszerbe), akkor az utólagosan a termékből milyen hatásfokkal mutatható ki.



27. ábra Gluténmentes kenyér gyártásának technológiai folyamatábrája



#### **5.4.1.1. Kísérleti beállítások és a mintavételezés módszere**

Első lépésként fel kellett mérnem, hogy melyek a technológia veszélyeztetett fázisai, amelyeknél nagy valószínűséggel szennyeződés folytán glutén kerülhet a rendszerbe. A technológiai lépéseket megvizsgálva négy ilyen pontot találtam a technológiában, ahol külső (technológián kívüli) tényezők játszanak szerepet, és ahol glutén-kontamináció előfordulhat (**27. ábrán** piros nyilakkal jelölve).

A 4 ilyen pont közül az első a nyersanyag forgalom, hiszen a nyersanyagok eredete ugyan papírral igazolt, de mint tudjuk, ez még önmagában hordozhatja a szennyeződés lehetőségét, ezen kívül a szállítás, pakolás során is bekövetkezhet a kontaminálódás. A nyersanyag raktárból mintákat vettem, mint ahogy abból a fent említett nyersanyagokból megfelelő arányban összeállított lisztkeverékből is, amelyet otthoni kenyérsütés céljából forgalmaznak a betegek részére, mint félkész terméket. Ennél a pontnál nem történt mesterséges kontamináció, tehát az esetleg jelen lévő gabonanyomok eleve szennyezett nyersanyagot feltételeznek.

A második és a harmadik ilyen veszélyeztetett pont a dagasztó tál és a sütőformák tisztítása volt, amelynek helytelensége szintén okozhat szennyeződést. A mintavétel elsőként a dagasztótálban lévő nyers tésztából, majd a sütőformában készült kenyérből történt mesterséges szennyezés nélkül. A mesterséges szennyezési kísérlet után a kész termékből (kenyér) vettem mintát, miután az edényzeteket különböző variációban a kísérlet első napja során búzával, majd a kísérlet második napja során rozssal szennyeztem. A mesterséges kontamináció variációi a dagasztó tál és a sütőforma szempontjából a **28. ábrán** látható.



**28. ábra** Kontaminációs kísérlet során a dagasztó és sütőformák szennyezési kombinációinak sémája

A kenyerek a fent látható szennyezési séma alapján készültek egymás utáni két kísérletsorozatban (különböző napokon, technológiai sor teljes tisztítása után), ahol ugyanezen séma szerint egyszer a búzaliszt, majd a rozsliszt volt kontaminációs faktor. A szennyezést technikailag úgy kiviteleztem, hogy az leginkább imitáljon egy valóságos technológia hibát, mulasztást. A dagasztó tál szennyezése úgy történt, hogy benne búzakenyér, illetve rozskenyér dagasztása történt, amely után nem alkalmaztam a szokásos tisztítási eljárást, csak egy felületes kiürítést és törlést. A benne maradt szennyeződéssel (nem volt megállapítható a pontos mennyisége!) együtt dagasztottam az így már valószínűleg szennyezett kenyértésztát. A sütőformák szennyezése hasonló módon történt, mégpedig úgy, hogy bennük búzakenyeret, illetve rozskenyeret sütöttem, majd az újrahasznosításuk előtt nem történt meg az alapos tisztításuk, csak az előbb említett kiürítés és törlés. Ebben az esetben sem volt megállapítható a glutén szennyeződés pontos mennyisége, hiszen egy technológiai hibát imitáltam a kísérlet során.

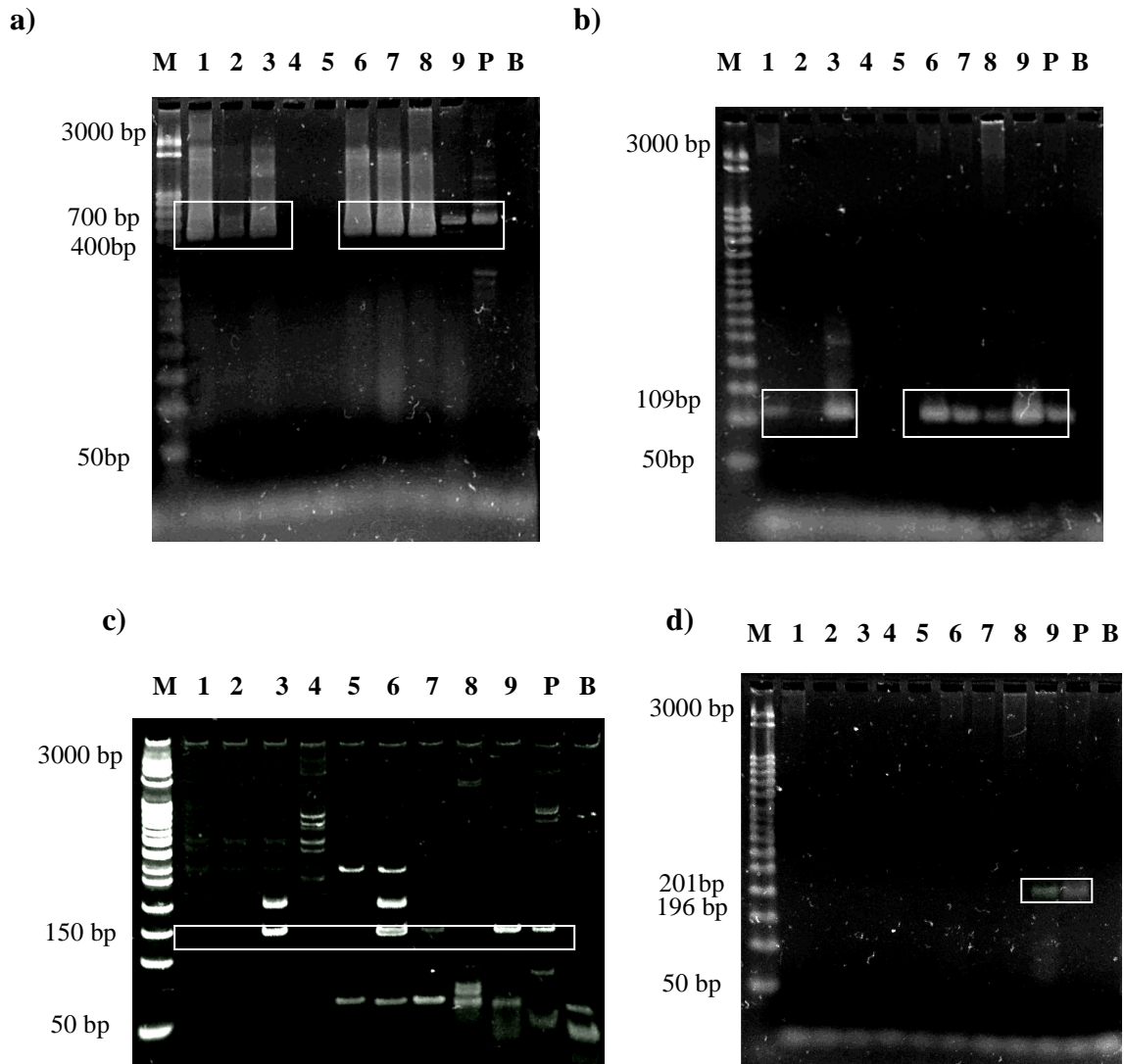
A negyedik kritikus pontot a kenyerek szárítása jelentette, hiszen a nem megfelelő térben való szárítás okozhat szennyeződést, amit a szárítási idő hossza csak fokozhat. Ebből kiindulva vettem mintát az erre a funkcióra szánt helyiségben szárított (mesterségesen nem szennyezett!)

kenyerekből, továbbá mesterségesen szintén nem szennyezett kenyereken modelleztem a szárítási körülmények változtatásával a szárítás okozta szennyeződés kimutathatóságát. Ez gyakorlatban annyit jelentett, hogy gluténmentes kenyerek szárítására két jóval „szennyezettebb” helyiséget választottam, nevezetesen a normál (búza és rozs) kenyereket gyártó üzemi helyiséget, illetve a pékség általános tárolóját (silóját).

Azoknál a mintáknál, ahol kész kenyereket vizsgáltam, általánosan elmondható, hogy a mintavételt a teljes kenyerek darabolása, szárítása, darálása és homogenizálása jelentette. Az eredményeket a következő fejezetek tartalmazzák.

### 5.4.1.2. Sütőipari mintákból származó DNS sokszorozása során kapott eredmények

A következő ábrákon a kísérletek során vett nyersanyag minták vizsgálatának eredményei láthatók.



**M.** DNS molekula méret (bp) marker  
(50 bp-3000 bp),  
**1.** Rizsliszt  
**2.** Kukoricakeményítő  
**3.** Burgonyapehely  
**4.** Tojáspor  
**5.** Élesztő

**6.** Kenyérpor  
**7.** Kenyértészta  
**8.** A gluténmentes kenyér  
**9.** A1 búzakenyér (pozitív kontroll)  
**P.** pozitív kontroll (búzalisztból izolált DNS)  
**B.** negatív kontroll, vak (nincs DNS)

**29. ábra** Ipari kísérlet során vett nyersanyag és félkész termék minták vizsgálata növény-specifikus kloroplasztisz primer párral (B49317/A49855) (a), búzaspecifikus TR01/TR02 primer párral (b), gluténspecifikus P1/P2 primer párral (c) és búza-, árpa- és rozs-specifikus WBR11 / WBR13 primer párral (d)

A növény-specifikus primer párral végzett amplifikálás során kiderült egyrészt, hogy a nyersanyagok nagy részének DNS-e PCR-rel sokszorozható, másrészt, hogy a 2 nem növényi eredetű nyersanyag (tojáspor és élesztő) nem kontaminálódott növényi eredetű szennyezővel, így ártalmatlan gabonafélékből származó DNS-t sem tartalmazott (**29. a) ábra**).

A nyersanyagok búza-specifikus PCR-rel való vizsgálata meglepő eredményt hozott. A **29. b) ábra** alapján az összes nyersanyag, kivéve az élesztőt és tojásport, eredendően búzával szennyezett volt. A legintenzívebb specifikus jelet a burgonyapehelyből származó DNS-amplikonja adta. Ebben az esetben az esetleges véletlenszerű keresztreakciót a primerrel az NCBI internetes adatbázis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) burgonyára vonatkozó egyik szekvenciariészlete (accession number: X65489) alapján kizártam. Ennél kicsivel kevesebb búzaeredetű DNS-t tartalmazott a rizsliszt, de nyomokban a kukoricakeményítő is tartalmazta a búza-specifikus szekvenciát (az előző kísérletek alapján itt is kizárható a rizs DNS és kukorica DNS véletlenszerű keresztreakciója). Ez alapjaiban módosította az ipari kontaminációs kísérletből levonható következtetéseket.

A glutenin-részletre specifikus primer az allergént kódoló DNS-templátot a nyersanyagok közül csak a burgonyapehelyben találta meg. Ebből kifolyólag ez a részlet következetesen megjelent a burgonyapehelyt tartalmazó félkész termékben (kenyérpor) és halványabban a dagasztóból vett tészta-ban. Viszont meglepő módon a kész termékben (gluténmentes kenyér) már nem volt detektálható (**29. c) ábra**). Ennek oka lehet az egyre magasabb technológiai feldolgozottsági szint elérésével a DNS – ezzel együtt a templát – további töredezése, degradálódása, illetve a DNS-kivonásnál fontos szerepet játszó mátrix-hatás, amelynek következménye lehet a hozzáférhető specifikus DNS-korlátozott mennyisége.

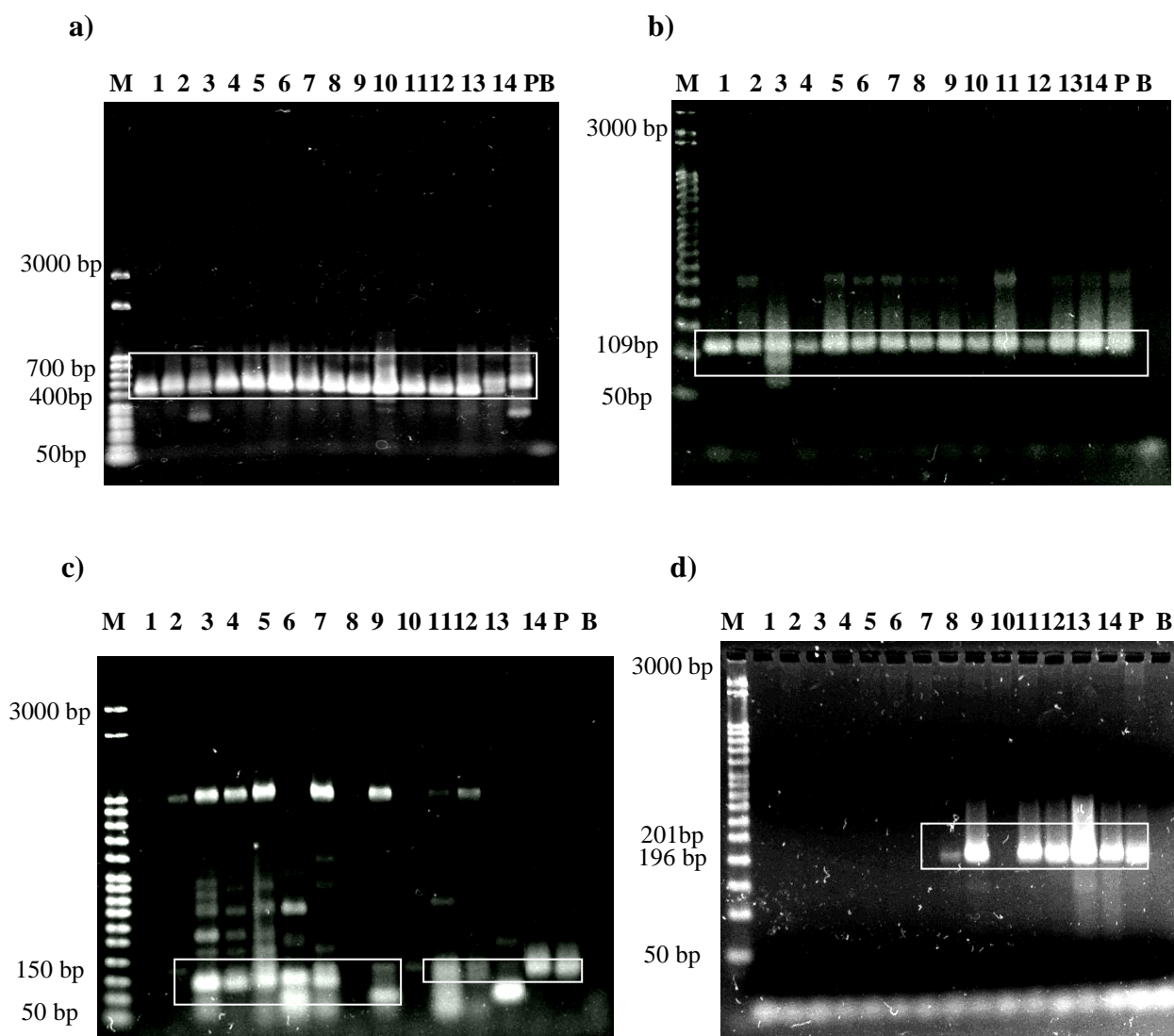
A búza-specifikus és glutén-specifikus primer-párokkal végzett nyersanyag-tesztelési kísérletek eredményei alapján nem állapíthatók meg egyértelműen a technológia kritikus pontjai a mesterséges kontaminációs kísérlet vizsgálata folyamán, hiszen nem lehet pontosan megmondani, hogy az esetleges pozitív minta az eredetileg szennyezett nyersanyag, vagy a mesterséges szennyezés következménye-e. Arra viszont mindenképpen alkalmasak, hogy vizsgálható legyen általuk a hőkezelés hatásait követő glutén-szennyezés a kenyerekben.

A Codex Alimentarius által is javasolt DNS-alapú módszer, mely búza, rozs és árpa detektálására alkalmas, nem érzékelt a nyersanyag-mintákban az előbbi gabonafélékből származó specifikus DNS-részletet. A **29. d) ábrán** jól látszik, hogy a nyersanyagok esetében nem kaptunk jelet. Ezzel a módszerrel, az eredmény ellenére nem bizonyított, hogy a mintákban nincs búza, rozs vagy árpa eredetű DNS, hiszen az előző primer-párokkal pozitív eredményt kaptam. Ennek ellenére ez a primer-pár alkalmas a kontaminációs kísérlet során vett kenyérminták vizsgálati eredményei

alapján a technológia kritikus pontjainak megállapítására, hiszen ha a kenyérminták pozitívak lesznek, azt nem a nyersanyag szennyezettsége, hanem a mesterséges kontamináció okozta.

A nyersanyagok vizsgálata után a kontaminációs kísérlet során vett kész kenyér minták vizsgálatára került sor. Feltételezhető volt azonban, hogy a szennyezett alapanyagok hatása a búzaspecifikus és gluténspecifikus primer párokkal való késztermék vizsgálatoknál zavaró lehet. A búza-, árpa- és rozs-specifikus primer párral végzett eddigi mérésekből viszont arra lehetett következtetni, hogy kísérlet konzekvenciájaként a technológia kritikus pontjaira nézve fontos következtetéseket lehet majd levonni.

Először, mint az eddigi kísérleteknél is, az izolált DNS minták sokszorozhatóságát ellenőriztem növény-specifikus primer párral. Ennek a mérésnek az eredményei láthatók a **30. a) ábrán**. Az ábra feliratozásában pontosan definiáltam a minták eredetét, illetve, hogy milyen edényzetet és sütőformát használtam a készítésüknél.



**M.** DNS molekula méret (bp) marker (50 bp-3000 bp),

- 1.** A gluténmentes kenyér
- 2.** B gluténmentes kenyér
- 3.** A2 (tisztá+tisztá)
- 4.** A3 (tisztá+szennyezett)
- 5.** A4 (szennyezett+tisztá)
- 6.** B2 (tisztá+tisztá)
- 7.** B3 (tisztá+szennyezett)
- 8.** B4 (szennyezett+tisztá)

**9.** B5 (szennyezett+szennyezett)

**10.** A5 (szennyezett+szennyezett)

**11.** Ü (üzemben szárítva)

**12.** S (silóban szárítva)

**13.** B1 rozskenyér

**14.** A1 búzakenyér

**P.** pozitív kontroll (búzalisztból izolált DNS)

**B.** negatív kontroll, vak (nincs DNS)

**30. ábra** Kontaminációs ipari kísérlet során vett kenyérminták vizsgálata növény-specifikus kloroplasztisz primer párral (B49317/A49855) (a), búzaspecifikus TR01/TR02 primer párral (b), gluténspecifikus P1/P2 primer párral (c) és búza-, árpa- és rozs-specifikus WBR11/WBR13 primer párral (d)

Ezen az ábrán jól látszik, hogy az üzemben vett 14 kenyér minta mindegyikét tovább vizsgálhattam a többi primer párral, hiszen mindegyik PCR szempontjából tisztának, amplifikálhatónak bizonyult és kaptam jelet a 400 és a 700 bp közötti mérettartományban.

A **30. b) ábra** szerint a búzaspecifikus primer párral kapott eredmények azt mutatják, hogy a búza eredetű konzervatív részlet mindegyik mintában megtalálható volt. Ez köszönhető egyrészt annak, hogy a nyersanyagok már eleve szennyezettek voltak (**29. b) ábra**), másrészt ezt csak fokozta, hogy a mintákat ténylegesen szennyeztem a technológiai kísérlet során. Ha csak a technológia okozta volna a kimutatható búza eredetű szennyeződést, akkor az 1, 2, 3, illetve 6 mintáknak mindenképpen negatívnak kellett volna lenniük. Ezen kívül pedig a rozssal szennyezett mintákat (7, 8, 9, 13 minta) sem kellett volna érzékelnie a búza specifikus primer párnak. Tehát, ahogy az eddigi eredmények alapján várható volt, a nyersanyag-szennyeződések hőkezelés után is kimutathatók maradtak a kenyérmintákból ezzel a módszerrel.

A gluteninspecifikus P1/P2 primer pár a kenyerek vizsgálatakor nem adott következetes eredményt (**30. c) ábra**). Ez lehet az eleve szennyezett nyersanyagok miatt, illetve amiatt is, hogy a nyersanyagok vizsgálatánál ez a primer pár csak a burgonyapehelyben talált rá az LMW glutenin génrészlet adott szakaszára. A másik lehetséges ok lehet az, ami miatt a primer következetlenül működik, hogy az eleve a nyersanyagban szennyeződésként előforduló minimális mennyiségű DNS a hőkezelés során tovább töredezik, illetve nagyon szétszóródik a mintában. Ez a nem homogén idegen DNS okozhatja a kenyerekben, hogy a végeredmény a mintából kivett 300 mg DNS izoláláshoz használt mennyiségtől nagymértékben függ (még akkor is, ha a minták homogenizálása előzőleg darálással és keveréssel megtörtént).

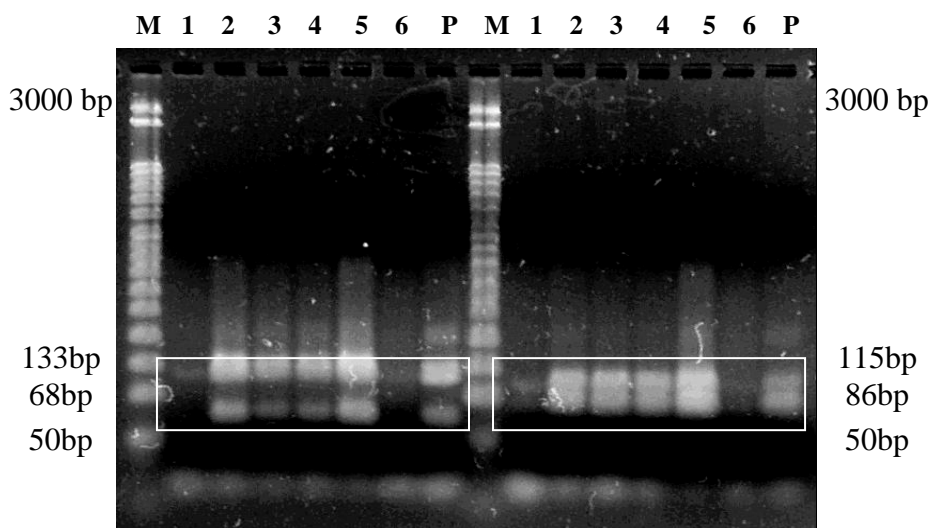
Ebből arra a következtetésre jutottam, hogy ilyen magas hőmérsékleten történő hőkezelés okozta specifikus DNS darabok előfordulásának csökkenése csökkenti annak az esélyét is, hogy a primer rátaláljon a megfelelő templátjára. Ez bizonytalanná teszi a csak nyomokban előforduló szennyező búza DNS kimutathatóságát ezzel a módszerrel. Hőkezelt minták esetében a módszer csak a két másik (búzaspecifikus és búza-, rozs-, árpa-specifikus) módszerrel párhuzamosan és összevetve adhat megbízható eredményt.

A WBR11/WBR13 primer párral végzett kísérlet eredménye (**30. d) ábra**) szerint a sütés előtt szennyezett kenyerek esetében csak néhány elhanyagolható esetben (8, 9 minta) érzékelt a rendszer a végterméknél, hogy történt mesterséges szennyezés. Ezekkel kapcsolatban pedig levonhatjuk azt a következtetést, hogy a rozssal való szennyeződés jobban kimutatható volt, mint búzával. A búza DNS specifikus részlete sütés után nem volt detektálható (pl. 4, 5, 10 minta). Értelemszerűen azonban, mikor maga a teljes kenyér búzalisztból és rozslisztból készült (13, 14 minta), sütés után is kimutatható volt a megfelelő DNS szakasz jelenléte.



A kísérlet bebizonyította azt is, hogy az utólagosan a kenyérrre kerülő DNS szennyeződés minden további nélkül kimutatható a mintából még akkor is, ha kicsi a mennyisége (11, 12 minta). Elmondható még, hogy az edényzet (dagasztótál és sütőforma) szennyezettsége általában nem mutatható ki a késztermékből ezzel a módszerrel.

Az így pozitívnak bizonyult minták sokszorozott PCR amplikonjait a módszerkidolgozás alapján tovább vizsgáltam PCR-RFLP módszerrel. A restrikciós enzimes hasítás *AluI* (133 bp és 68 bp) és *BsmAI* (115 bp és 86 bp) enzimmel történt, az eredmények a **31. ábrán** láthatók.



**M.** DNS molekula méret (bp) marker (50 bp-3000 bp),

**1. B4** (szennyezett+tiszta)

**2. B5** (szennyezett+szennyezett)

**3. Ü** (üzemben szárítva)

**4. S** (silóban szárítva)

**5. B1** rozskenyér

**6. A1** búzakenyér

**P.** pozitív kontroll (búzalisztból izolált DNS)

**31. ábra** Kontaminációs ipari kísérlet során vett kenyérminták WBR11/WBR13 primer párral amplifikált PCR-terméke *AluI* (133bp és 68bp) és *BsmAI* (115bp és 86bp) enzimmel emésztve

A restrikciós enzimmel történt emésztés során minden amplikon esetében megkaptam a várt emésztett DNS szakaszokat, ami bizonyossá tette, hogy a megfelelő templátot sokszorozta a polimeráz enzim a PCR reakció során. Két esetben kissé halványabban kivehető a megfelelő 2 szakasz (1, 6 minta), de ebben a két esetben is megfelelő a méret. Az 1-es minta esetében eleve kevés volt a PCR termék, amit emésztenie kellett az enzimnek, a 6-os minta esetében feltételezhetően valamilyen enzim-inhibitor játszott szerepet az emésztés során.

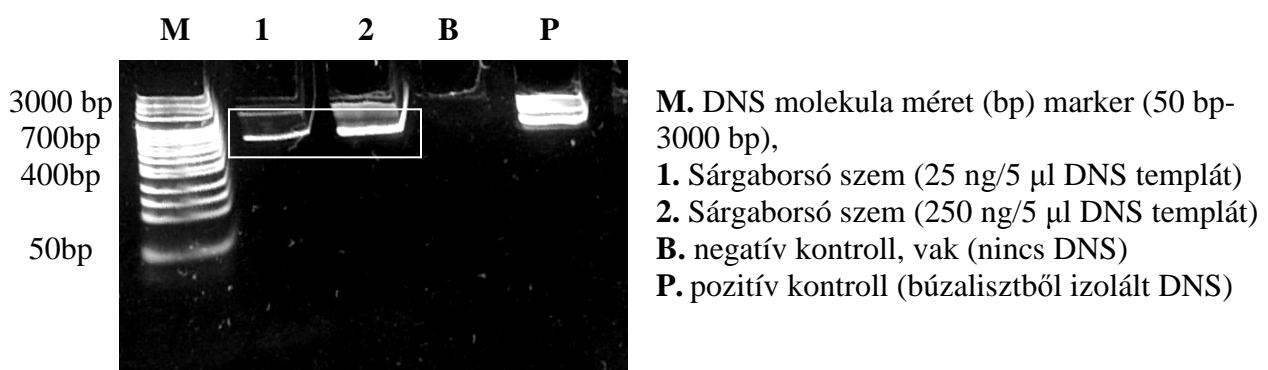
A kontaminációs kísérlet eredményeiről elmondható, hogy információt adtak a nyersanyagok szennyezettségéről, a szennyeződés végtermékből való kimutathatóságáról és ezáltal felhívták a figyelmet a kiindulási anyagok rendszeres ellenőrzésének szükségességére. A technológia legkritikusabb pontjának, az eredmények alapján a gluténmentes kenyerek szárítása nevezhető, hiszen az utólagos szennyezés során intakt DNS, és ezáltal esetleg gabonafehérje kerülhet a termékre, mely nagy veszélyt jelet a cöliákiában szenvedő betegekre nézve.

A KÉKI Biológia Osztályán az ugyanezekkel a mintákkal végzett immunológiai vizsgálat negatív eredményt hozott, tehát a DNS alapú mérések élelmiszervizsgálatok esetében mindenképpen indokoltak az eredmények pontosítása érdekében.

#### 5.4.2. Gluténmentes sárgaborsóból készített tészta vizsgálata

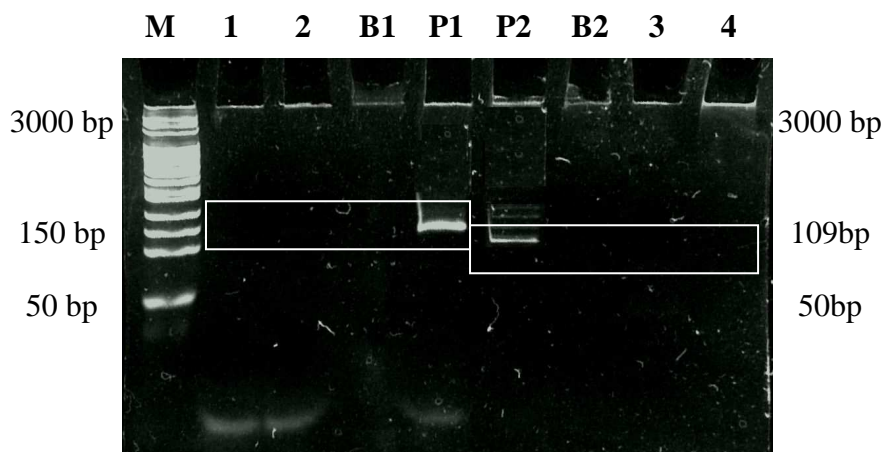
Az ipari kontaminációs kísérleten kívül elvégeztem egy gluténmentes diétába illeszthető termék, egy sárgaborsóból készült tészta előzetes DNS alapú szűrését. Ez a termék a piacon még nem található meg, hiszen kifejlesztés alatt áll. A mérés során vizsgáltam azt, hogy ez a sárgaborsó alapanyagból készült termék vizsgálható-e az általam kifejlesztett módszerekkel és, hogy a nyersanyag vizsgálata, illetve a sárgaborsó tészta technológiai kivitelezése utáni vizsgálat milyen változásokat mutat ki. Ismeretlen minta lévén több párhuzamos sokszorozást végeztem különböző koncentrációjú DNS templát jelenlétében.

Első lépésként a nyersanyag, vagyis a sárgaborsó vizsgálatát végeztem el. A szemes sárgaborsót laboratóriumi, ellenőrzött körülmények között hántoltam, daráltam és homogénizáltam.



**32. ábra** Szemes sárgaborsó DNS vizsgálata növény-specifikus kloroplasztisz primer párral (B49317/A49855)

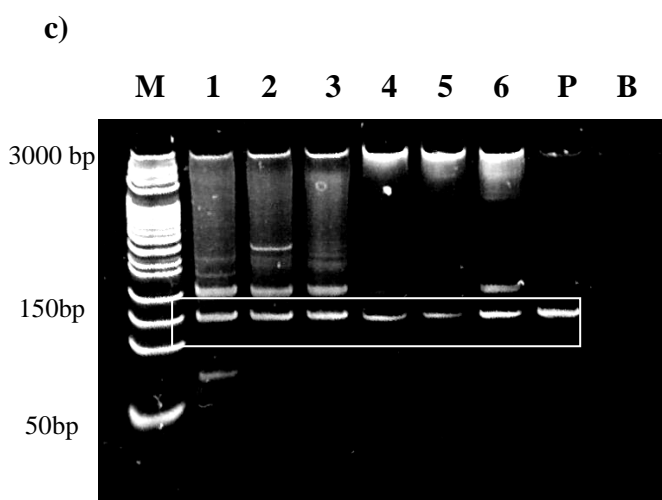
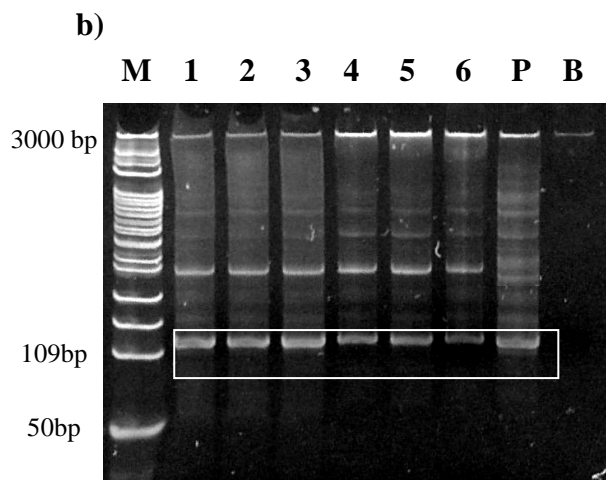
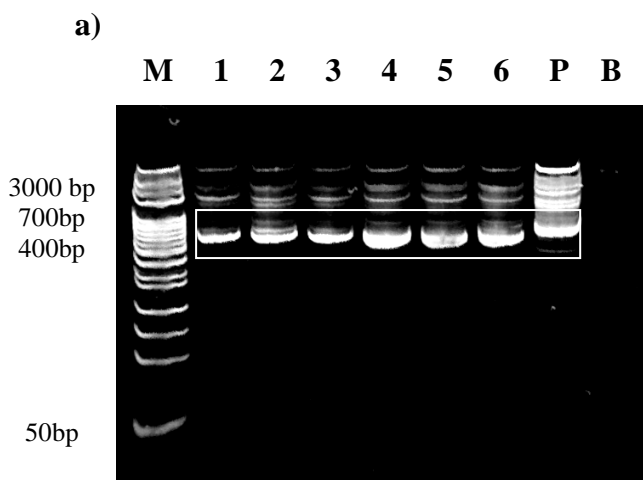
A növény specifikus primer párral körülbelül 500 bp magasságban adott jelet a sárgaborsó. Ez bizonyította a DNS növényi eredetét (gélkép szerint nem volt jel más mérettartományban 400 és 700 bp között, tehát elvileg más növényi eredetű DNS-el nem szennyezett a minta) és sokszorozhatóságát (**32. ábra**).



- M.** DNS molekula méret (bp) marker (50 bp-3000 bp),  
**1.** Sárgaborsó szem (25 ng/5 µl DNS templát) (P1/P2 primer párral)  
**2.** Sárgaborsó szem (250 ng/5 µl DNS templát) (P1/P2 primer párral)  
**B1.** negatív kontroll, vak (nincs DNS) (P1/P2 primer párral)  
**P1.** pozitív kontroll (búzalisztból izolált DNS) (P1/P2 primer párral)  
**P2.** pozitív kontroll (búzalisztból izolált DNS) (TR01/TR02 primer párral)  
**B2.** negatív kontroll, vak (nincs DNS) (TR01/TR02 primer párral)  
**3.** Sárgaborsó szem (25 ng/5 µl DNS templát) (TR01/TR02 primer párral)  
**4.** Sárgaborsó szem (250 ng/5 µl DNS templát) (TR01/TR02 primer párral)

**33. ábra** Szemes sárgaborsó DNS vizsgálata gluténspecifikus P1/P2 primer párral és búzaspecifikus TR01/TR02 primer párral

A búzaspecifikus (TR01/TR02) és a glutenin specifikus (P1/P2) vizsgálat is negatív eredményt hozott a tiszta sárgaborsó esetében (**33. ábra**), tehát elmondható, hogy a sárgaborsó génállományában nem található ugyanilyen hosszúságú DNS szakasz, amelyet a primer amplifikálni képes, tehát negatív kontrollnak is tekinthető. A vizsgálat azt is bizonyította, hogy a borsóminták búzával nem szennyezettek.



**M.** DNS molekula méret (bp) marker (50 bp-3000 bp),

**1.** Sárgaborsó tészta (2,5 ng/5 µl DNS templát)

**2.** Sárgaborsó tészta (25 ng/5 µl DNS templát)

**3.** Sárgaborsó tészta (250 ng/5 µl DNS templát)

**4.** Sárgaborsó liszt (2,5 ng/5 µl DNS templát)

**5.** Sárgaborsó liszt (25 ng/5 µl DNS templát)

**6.** Sárgaborsó liszt (250 ng/5 µl DNS templát)

**P.** pozitív kontroll (búzalisztből izolált DNS)

**B.** negatív kontroll, vak (nincs DNS)

**34. ábra** Sárgaborsó tészta és sárgaborsó liszt DNS vizsgálata növény-specifikus kloroplasztisz primer párral (B49317/A49855) **(a)**, búzaspecifikus TR01/TR02 primer párral **(b)** és gluténspecifikus P1/P2 primer párral **(c)**

A **34. a) ábrán** már a gyártó által küldött minták, a malomban őrölt, kereskedelemben kapható sárgaborsó liszt és a kész száraztészta DNS-ének sokszorozhatóságára irányuló vizsgálatot láthatjuk. A minta ismeretlensége miatt több párhuzamos vizsgálatot végeztem változó töménységű templát DNS jelenlétében. A körülbelül 500 bp hosszú, sárgaborsóra jellemző méretű jel itt is látható, akárcsak a nyersanyag esetében, illetve itt is elmondható a DNS izolátumokról, hogy alkalmasak a további PCR vizsgálatokra.

A búza specifikus primer párral annak ellenére, hogy negatív eredmény volt várható, a minták búzára pozitívnak bizonyultak, hiszen a primer minden esetben amplifikálta a 109 bp hosszú specifikus DNS szakaszt **(34. b) ábra)**. A reakció még egy nem specifikus 290 bp hosszúságú terméket is eredményezett.

A **34. c) ábra** szerint a glutenin specifikus részlet is megjelent a gélképen, ami megerősítette a búzaspecifikus primer párral kapott eredményt. Mivel ez a két primer pár specifikusan működik, így mindenképpen szennyeződésre következtettem.

Abból kiindulva, hogy nem csak a tészta esetében, hanem az alapanyagaként szolgáló liszt esetében is pozitívak voltak a minták, arra lehetett következtetni, hogy már a nyersanyag előkészítés során szennyeződés történt. Ilyen kontaminációs rizikóval járó pont lehetett a liszt készítése, vagyis a malomban történt őrlés, vagy a lisztnek a kereskedelmi lánc folyamán bekövetkezett esetleges szennyeződése.

## 6. ÖSSZEGZÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteim során mind a B49317/A49855 növény-specifikus kloroplasztisz primer párt, a búzaspecifikus TR01/TR02 primer párt, az LMW-glutenin specifikus P1/P2 mikroszatellit primer párt, mind pedig a búza-, árpa-, rozs-specifikus WBR11/WBR13 primer párt sikeresen adaptáltam és optimáltam. A segítségükkel működő PCR technikák párhuzamos vagy egyedi alkalmazása javasolható élelmiszer minták vizsgálatára, természetesen kiegészítve ezzel az immunanalitikai alapú technikákat. A módszerek mindegyikét a Magyarországon köztermesztésbe vont gabonafélékre (búza, rozs, árpa, zab, tritikálé, kukorica, rizs) és pszeudocereáliákra (hajdina, amaránt), hőkezelt termékekre (száraztészta, főtt tészta, kenyerek), technológiai nyomonkövetésre (gluténmentes kenyérgyártás), illetve kontamináció kiszűrésére (gluténmentes sárgaborsó tészta) optimáltam, lehetővé téve ezzel az eljárások rutinszerű alkalmazhatóságát az alábbiak szerint (**17. és 18. táblázat**).

**17. táblázat** Az összes minta B49317/A49855 primer párral, TR01/TR02 primer párral, P1/P2 primer párral nyert eredményei\*

Minták	B49317/A49855 növény-specifikus kloroplasztisz primer pár alkalmazásával nyert		TR01/TR02 búza specifikus primer pár alkalmazásával nyert		P1/P2 glutén specifikus primer pár alkalmazásával nyert	
	PCR termék	PCR termék mérete	PCR termék	PCR termék mérete	PCR termék	PCR termék mérete
Búza „CY-45 Q”	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
Búza „T-128 Q”	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
Búza „CY-45 Grandstar”	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
Búza „T-128 Grandstar”	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
Búza „Izabella”	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
Búza „D-78”	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
„Izabella” száraztészta	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
„D-78” száraztészta	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
5 percig hőkezelt „Izabella” száraztészta	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
10 percig hőkezelt „Izabella” száraztészta	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
5 percig hőkezelt „D-78” száraztészta	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
10 percig hőkezelt „D-78” száraztészta	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp

Minták	B49317/A49855 növény-specifikus kloroplasztisz primer pár alkalmazásával nyert		TR01/TR02 búza specifikus primer pár alkalmazásával nyert		P1/P2 glutén specifikus primer pár alkalmazásával nyert	
	PCR ter- mék	PCR ter- mék mérete	PCR ter- mék	PCR ter- mék mé- rete	PCR ter- mék	PCR ter- mék mé- rete
CY-45 Q kenyerek	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
T-128 Q kenyerek	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
Búza „ÖKO-10”	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
Búza „D-78”	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
Búza „GK Cipó”	+	662 bp	+	109 bp	+	150 bp
Árpa „STC I. 22-03”	+	642 bp	-	-	-	-
Árpa „GK Rezi”	+	642 bp	-	-	-	-
Árpa „GK Árpád”	+	642 bp	-	-	-	-
Rozs „GK Wibro”	+	667 bp	-	-	-	-
Rozs „Matador”	+	667 bp	-	-	-	-
Rozs „Gamet”	+	667 bp	-	-	-	-
Tritikalé „Kargo” normál	+	662 bp	-	-	+	150 bp
Tritikalé „Kargo” stresszelt	+	662 bp	-	-	+	150 bp
Tritikalé „EMBR 18” normál	+	662 bp	-	-	+	150 bp
Tritikalé „EMBR 18” stresszelt	+	662 bp	-	-	+	150 bp
Rizs „Janka”	+	614 bp	-	-	-	-
Rizs „Bioryza”	+	614 bp	-	-	-	-
Rizs „Ábel”	+	614 bp	-	-	-	-
Kukorica „Sze TC 269”	+	532 bp	-	-	-	-
Kukorica „Ella SC”	+	532 bp	-	-	-	-
Kukorica „Sze SC 352”	+	532 bp	-	-	-	-
Amaránt „Róza”	+	600 bp	-	-	-	-
Amaránt „Maros”	+	600 bp	-	-	-	-
Amaránt „Edit”	+	600 bp	-	-	-	-
Hajdina „430 törzs”	+	600 bp	-	-	-	-
Hajdina „P425 törzs”	+	600 bp	-	-	-	-
Hajdina „P427 törzs”	+	600 bp	-	-	-	-
Zab „GK Zalán”	+	405 bp	-	-	-	-
Zab „GK Iringó”	+	405 bp	-	-	-	-
Zab „GK Impala”	+	405 bp	-	-	-	-
Rizsliszt	+	614 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
Kukoricakeményítő	+	532 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
Burgonyapehely	+	650 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	+	150 bp <sup>1</sup>
Tojáspor	-	-	-	-	-	-
Élesztő	-	-	-	-	-	-
Előre bekevert kenyérpor	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	+	150 bp <sup>1</sup>

Minták	B49317/A49855 növény-specifikus kloroplasztisz primer pár alkalmazásával nyert		TR01/TR02 búza specifikus primer pár alkalmazásával nyert		P1/P2 glutén specifikus primer pár alkalmazásával nyert	
	PCR ter- mék	PCR ter- mék mérete	PCR ter- mék	PCR ter- mék mé- rete	PCR ter- mék	PCR ter- mék mé- rete
Nyers kenyértészta	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	+	150 bp <sup>1</sup>
A gluténmentes kenyér	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
B gluténmentes kenyér	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
A2 (tisztá+tiszta)	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
A3 (tisztá+szennyezett)	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
A4 (szennyezett+tiszta)	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
B2 (tisztá+tiszta)	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
B3 (tisztá+szennyezett)	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
B4 (szennyezett+tiszta)	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
B5 (szennyezett+szennyezett)	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
A5 (szennyezett+szennyezett)	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
Ü (üzemben szárítva)	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
S (silóban szárítva)	+	620 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
B1 rozskenyér	+	667 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	-	-
A1 búzakenyér	+	662 bp	+	109 bp	-	-
Szemes sárgaborsó	+	590 bp	-	-	-	-
Sárgaborsó liszt	+	590 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	+	150 bp <sup>1</sup>
Sárgaborsó tészta	+	590 bp	+	109 bp <sup>1</sup>	+	150 bp <sup>1</sup>

18. táblázat Az összes minta WBR11/WBR13 primer párral nyert eredményei\*

Minták	WBR11/WBR13 búza, árpa, rozs specifikus primer alkalmazásával nyert			
	PCR ter- mék	PCR termék mérete	PCR-RFLP vizsgálat során	
			AluI esetén a fragmen- tumok mérete	BsmAI esetén a fragmen- tumok mérete
Búza „CY-45 Q”	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
Búza „T-128 Q”	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
Búza „CY-45 Grandstar”	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
Búza „T-128 Grandstar”	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.



Minták	WBR11/WBR13 búza, árpa, rozs specifikus primer alkalmazásával nyert			
	PCR termék	PCR termék mérete	PCR-RFLP vizsgálat során	
			<i>AluI</i> esetén a fragmen- tumok mérete	<i>BsmAI</i> esetén a fragmen- tumok mérete
Búza „Izabella”	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
Búza „D-78”	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
„Izabella” száraztészta	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
„D-78” száraztészta	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
5 percig hőkezelt „Izabella” száraztészta	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
10 percig hőkezelt „Izabella” száraztészta	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
5 percig hőkezelt „D-78” száraztészta	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
10 percig hőkezelt „D-78” száraztészta	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
CY-45 Q kenyerek	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
T-128 Q kenyerek	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
Búza „ÖKO-10”	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp
Búza „D-78”	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp
Búza „GK Cipó”	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp
Árpa „STC I. 22-03”	+	196 bp	68 bp és 128 bp	89 bp és 110 bp
Árpa „GK Rezi”	+	196 bp	68 bp és 128 bp	89 bp és 110 bp
Árpa „GK Árpád”	+	196 bp	68 bp és 128 bp	89 bp és 110 bp
Rozs „GK Wibro”	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp
Rozs „Matador”	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp
Rozs „Gamet”	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp
Tritikalé „Kargo” normál	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp
Tritikalé „Kargo” stresszelt	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp
Tritikalé „EMBR 18” normál	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp
Tritikalé „EMBR 18” stresszelt	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp
Rizs „Janka”	-	-	-	-
Rizs „Bioryza”	-	-	-	-

Minták	WBR11/WBR13 búza, árpa, rozs specifikus primer alkalmazásával nyert			
	PCR termék	PCR termék mérete	PCR-RFLP vizsgálat során	
			<i>AluI</i> esetén a fragmen- tumok mérete	<i>BsmAI</i> esetén a fragmen- tumok mérete
Rizs „Ábel”	-	-	-	-
Kukorica „Sze TC 269”	-	-	-	-
Kukorica „Ella SC”	-	-	-	-
Kukorica „Sze SC 352”	-	-	-	-
Amaránt „Róza”	-	-	-	-
Amaránt „Maros”	-	-	-	-
Amaránt „Edit”	-	-	-	-
Hajdina „430 törzs”	-	-	-	-
Hajdina „P425 törzs”	-	-	-	-
Hajdina „P427 törzs”	-	-	-	-
Zab „GK Zalán”	-	-	-	-
Zab „GK Iringó”	-	-	-	-
Zab „GK Impala”	-	-	-	-
Rizsliszt	-	-	-	-
Kukoricakeményítő	-	-	-	-
Burgonyapehely	-	-	-	-
Tojáspor	-	-	-	-
Élesztő	-	-	-	-
Előre bekevert kenyérpör	-	-	-	-
Nyers kenyértészta	-	-	-	-
<b>A</b> gluténmentes kenyér	-	-	-	-
<b>B</b> gluténmentes kenyér	-	-	-	-
<b>A2</b> (tisztá+tiszta)	-	-	-	-
<b>A3</b> (tisztá+szennyezett)	-	-	-	-
<b>A4</b> (szennyezett+tiszta)	-	-	-	-
<b>B2</b> (tisztá+tiszta)	-	-	-	-
<b>B3</b> (tisztá+szennyezett)	-	-	-	-
<b>B4</b> (szennyezett+tiszta)	+	201 bp <sup>1</sup>	68 bp és 133 bp <sup>1</sup>	89 bp és 115 bp <sup>1</sup>
<b>B5</b> (szennyezett+szennyezett)	+	201 bp <sup>1</sup>	68 bp és 133 bp <sup>1</sup>	89 bp és 115 bp <sup>1</sup>
<b>A5</b> (szennyezett+szennyezett)	-	-	-	-
Ü (üzemben szárítva)	+	201 bp <sup>1</sup>	68 bp és 133 bp <sup>1</sup>	89 bp és 115 bp <sup>1</sup>
S (silóban szárítva)	+	201 bp <sup>1</sup>	68 bp és 133 bp <sup>1</sup>	89 bp és 115 bp <sup>1</sup>
<b>B1</b> rozskenyér	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp

Minták	WBR11/WBR13 búza, árpa, rozs specifikus primer alkalmazásával nyert			
	PCR termék	PCR termék mérete	PCR-RFLP vizsgálat során	
			<i>AluI</i> esetén a fragmensek mérete	<i>BsmAI</i> esetén a fragmensek mérete
A1 búzakenyér	+	201 bp	68 bp és 133 bp	89 bp és 115 bp
Sárgaborsó tészta	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
Sárgaborsó liszt	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
Szemes sárgaborsó	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.

\*Jelmagyarázat az 17. és 18. táblázathoz:

+: hatékony, PCR-termék keletkezik

-: nincs specifikus PCR-termék (negatív)

n. v.: nem vizsgáltam

<sup>1</sup>: szennyeződésből adódó pozitív eredmény

A B49317/A49855 növény-specifikus kloroplasztisz primer pár alkalmazásával bizonyítást nyert a DNS minták sokszorozhatósága. Ezen kívül ez az amplifikálási lépés alkalmas gluténmentes élelmiszerekben a tiltott gabonafélék (búza, árpa, rozs, zab(?), tritikálé) jelenlétének igazolására, mivel fajspecifikus jelet produkál a módszer.

A kontrollként adaptált, TR01/TR02 primer pár alapú rendszerrel egy konzervatív búza amplikon detektálható és nem mérhető vele semmilyen más keresztreagáló és nem keresztreagáló gabonaféle, illetve pszeudocereália. A hazai köztermesztésben előforduló búza fajtákat és ezek erősen hőkezelt termékekben előforduló DNS nyomait is biztonsággal érzékeli a módszer.

A P1/P2 mikroszatellit primer pár adaptálása és a rá alapozott módszerfejlesztés sikeres volt, a technika a búza és a tritikálé eredetű LMW-glutenin nyomokat megbízhatóan detektálja a nyers és a részben hőkezelt termékekben. Erősen hőkezelt termékek esetében, ha a szennyező DNS templát csak nyomokban van jelen, a módszer eredményeit mindenképpen javasolt összevetni a többi primer párral kapott eredményekkel a végső következtetés levonása előtt. Más cereáliák esetében nem amplifikálható 150 bp hosszúságú specifikus DNS szakasz.

Méréseim is igazolták, hogy a WBR11/WBR13 primer pár alkalmas a búza, rozs és árpa kimutatására. A hazai köztermesztésben lévő búza, árpa és rozs fajokkal végzett méréseim ezt alátámasztották. Kísérleteim során fény derült arra is, hogy a WBR11/WBR13 primer pár a fenti három cöliákiás tüneteket kiváltó gabonán kívül még a tritikálét is képes kimutatni. A WBR11/WBR13 primer pár tesztelése megtörtént a különböző más cereáliák és pszeudocereáliák esetében is, de ezeknél nem eredményezett specifikus, 201 vagy 196 bp hosszúságú jelet a PCR

módszer. Az amplikonok restriktív endonukleázzal való hasítása, minden pozitív minta esetében alátámasztotta, hogy az irodalomban leírt RFLP módszer alkalmas a PCR termékek azonosítására.

Méréseim igazolták, hogy ezeknek a PCR rendszereknek egymás kiegészítéseként való alkalmazásával jól kiegészíthető a fehérjealapú módszerek többsége, illetve technológiák kritikus pontjainak megállapítása is lehetővé válhat olyan gyártók esetében, akik bizonyosságot szeretnének a felől, hogy a saját gluténmentes termékük nem szennyezett ártalmas gabonával.

## 6.1. Új eredmények

1. Glutén szennyezés kimutatására irányuló módszerfejlesztés során adaptáltam a B49317/A49855 növény-specifikus primer párt és a TR01/TR02 búzaspecifikus primer párt, mint kontroll módszert. Megállapítottam, hogy a növény-specifikus primer párral való amplifikáció alkalmas a tiltott gabonafélék (búza, árpa, rozs, tritikálé) szelektív kimutatására a többi ártalmatlan gabonaféle és pszeudo-cereália jelenlétében, hiszen nagyon közeli mérettartományban sorolhatók az amplikonjaik. A jelenleg még tiltott, de vitatott zab a növény-specifikus vizsgálat során teljesen más mérettartományban adott jelet a többi ártalmas gabonaféléhez képest, ami biztosította az elkülöníthetőségét ezzel a módszerrel. A két módszert erősen hőkezelt mintáknál is eredményesen alkalmaztam.
2. P1/P2 mikroszatellit (SSR) primer pár segítségével glutén szennyezettség szűrésére alkalmas módszert fejlesztettem, amely kimutatja a búzából és a tritikáléból származó LMW-glutenin gén nem kódoló, ismétlődő szekvenciákból álló szakaszát.
3. A búza, árpa és rozs specifikus WBR11/WBR13 primer pár alapú PCR technikát az utána következő PCR-RFLP analízissel együtt adaptáltam és mint szűrőmódszert, alkalmaztam hazai köztermesztésben lévő 7 gabonafaj és 2 pszeudocereália-faj vizsgálatára. Elsőként mutattam ki, hogy a primer pár a búza, az árpa és a rozs fajokon kívül a tritikálé esetében is eredményesen alkalmazható. Ezt a technikát megbízhatóan alkalmaztam erősen hőkezelt minták esetében is.
4. Elsőként vizsgáltam egy gluténmentes kenyereket gyártó technológia lépéseit a nyomonkövetés szempontjából a nyersanyagoktól a késztermékekig. A technológia egyes lépéseinél vett mintákon teszteltem a növény-specifikus, búzaspecifikus, LMW-glutenin specifikus, illetve a búza-, rozs-, árpa specifikus PCR technikát. Ugyanezeket a technikákat

speciális diétára tervezett sárgaborsó tészták szennyezettségének vizsgálata során is teszteltem. A végeredményeket összevetve megállapítottam, hogy az alapanyag szennyezettsége minden esetben kihat a végtermékre, ugyanis a szennyezés utólag kimutatható még akkor is, ha a termék időközben hőkezelésen ment át.

5. Az irodalmi adatok alapján elsőként alkalmaztam mesterségesen tervezett kontaminációt üzemi körülmények között annak érdekében, hogy a technológia kritikus pontjait kiszűrjem. Miután meghatároztam a technológia veszélyeztetett fázisait, ezeknél előbb búzát, majd rozst használtam szennyezőként, végül ezeknek a gabonaféléknek a végtermékben való detektálhatóságát vizsgáltam. A végterméknek számító kenyerek vizsgálata után az eredményekből meghatároztam, hogy a dagasztó tál szennyezettsége és a kenyerek szárításánál történt utólagos szennyezés a végtermékből is kimutatható. A sütőformák szennyezettsége által okozott enyhe felületi szennyezés nem detektálható a végtermékben.

## 7. TOVÁBBI JAVASLATOK

A továbbiakban mindenképpen javaslom a PCR rendszerek további kereskedelmi forgalomban lévő mintákon való tesztelését. Nagyon fontos lenne ezekben az esetekben ELISA módszerrel, vagy más kvantitatív immunoanalitikai módszerekkel történő párhuzamba vonást egyrészt az utólagos kimutathatóság mérésére, másrészt a DNS- és fehérjekivonás hatékonyságának mérése érdekében. A genetikai adatbankokból származó szekvenciainformációk ismeretében akár ugyanezen DNS részletekre, de akár más szekvenciákra is ajánlott lenne további PCR primerek tervezése és tesztelése az élelmiszermintákon. Ezek hatékonyabb működése céljából szükséges lenne más típusú élelmiszer-mátrixokra optimált DNS kivonási módszerek fejlesztése is. Tovább lehetne haladni abban az irányban is, hogy a B49317/A49855 primer párral sokszorozott DNS szakaszokat tovább hasítani *AluI* és *BsmAI*, hiszen ezek hasító helyeit biztosan tartalmazza az adott DNS szakasz (lásd: M2. Adatbázisban megtalálható szekvencia-információk). Így módon a fajok pontosabb elkülönítését tehetjük lehetővé.

Fontos cél lehet egy valós idejű (real-time) PCR rendszer kidolgozása vagy adaptálása, amely lehetővé tenné a kvantitatív DNS mérést, majd ezt fehérje mennyiségre visszavetítve megállapítható lenne a DNS és fehérje korrelációja az egyes minták esetében. Ezeknek az információknak a birtokában már megalapozottan lehetne érvelni a PCR rendszerek létjogosultsága mellett.

Fontos volna több technológiai-sor tesztelése is, amely feltárná a GMP számára a kritikus kontaminációs pontokat, így lehetővé téve azok kiküszöbölését.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A glutén szenzitív enteropátia lényege, hogy az érintett páciensben egyes gabonafélék (búza, árpa, rozs, tritikálé, zab(?)) prolaminjai a vékonybél bolyhainak sorvadását, deformálódását idézik elő. Ezen prolaminek teljes kizárása az étrendből a betegeket tünetmentessé teszi. Habár a zabról manapság úgy tartják, hogy talán nem ártalmas, mégis jelentős probléma a zab búzával való szennyeződése, tehát még szerepel a tiltólistán. Sajnos nincs arra nézve meggyőző adat, hogy mely határérték alatt biztonságos az ártalmas prolaminek fogyasztása a cöliakiás betegek számára. Az élelmiszerek keresztszennyeződése és az akaratlan diétahibák sem ritkák, ezért érthető, hogy az allergén-jelenlét címkén történő feltüntetése kötelező, illetve a gyártók kötelesek az allergénmentesség tényére garanciát vállalni. Ilyen megfontolásból osztályunkon a fehérje alapú (ELISA) direkt vizsgálatokon kívül kifejlesztésre kerültek DNS alapú, indirektnek mondható kontamináció szűrésére alkalmas módszerek is. Erre azért volt szükség, mert bizonyos esetekben, főleg feldolgozott élelmiszereknél a fehérje olyan konformációt vehet fel, mely megnehezítheti a kioldódását, így módosíthatja a valósághoz képest az ELISA módszerrel, illetve más fehérje alapú kitekkel kapott mennyiségi eredményt. A PCR módszeren alapuló DNS vizsgálat ugyan nem helyettesíti a fehérje módszereket, csak megerősítésre, ellenőrzésre szolgál, viszont elég bizonyítékot nyújt arra, hogy az adott élelmiszer valamikor búzával vagy vele keresztreagáló gabonával szennyeződött. Ez jó módszer lehet továbbá olyan típusú élelmiszerek esetében, amelyek eredendően nem tartalmazhatnak glutént („rejtett” allergének: például búzakeményítő, mint adalékanyag), és erről a termék gyártója is szeretne megbizonyosodni. Ilyen esetekben a DNS vizsgálat, nagy érzékenységénél fogva, kiválóan alkalmas lehet az esetleges keresztszennyeződések kiszűrésére.

Kísérleteim során különböző mintákra adaptáltam 4 primer párt: A49855 és B49317 kloroplasztisz DNS primer párt (400-700 bp amplikont sokszoroz, növényfaj-specifikus) az izolált DNS amplifikálhatóságának ellenőrzésére, TR01/TR02 búzaspecifikus primer párt (109 bp amplikont sokszoroz) a DNS eredetének vizsgálatára, egy glutenin specifikus mikroszatellit (P1/P2) primer párt (150 bp amplikont sokszoroz) a LMW glutenint kódoló gén intronja jelenlétének kimutatására és végül egy búza, rozs és árpa szelektív kimutatására alkalmas WBR11/WBR13 nevű primer párt (201 bp amplikont sokszoroz búza és rozs esetében; 196 bp amplikont sokszoroz árpa esetében). Ez utóbbi esetben termékanalízis céljából PCR-RFLP vizsgálat is történt.

Az adaptált és kifejlesztett módszereket a következő mintákkal optimáltam: búzafajták, száraztészták, főtt tészták, hőkezelt kenyerek, keresztreagáló (rozs, árpa, zab(?), tritikálé) és nem keresztreagáló gabonafélék (kukorica, rizs), pszeudocereáliák (hajdina, amaránt).

Bizonyítottam a DNS minták tisztaságát és sokszorozhatóságát egyrészt az R értékek meghatározásával, majd a B49317/A49855 növény-specifikus kloroplasztisz primer pár alkalmazásával. Ezen kívül ez az amplifikálási lépés alkalmasnak bizonyult élelmiszerekben megtalálható gabonafélék előszelektálására, hiszen fajspecifikus jelet kaptam a mérés során.

A TR01/TR02 primer pár alapú rendszerrel egy konzervatív búza amplikont detektáltam a búzát tartalmazó mintákban, majd bizonyítottam, hogy a búzán kívül nem mérhető vele semmilyen más gabonaféle. A DNS extraktum búza eredetének igazolására azonban megbízható választ kaptam a mérések során még erősen hőkezelt minták esetében is.

A P1/P2 primer párt a glutenint kódoló génrészlet jelenlétének kimutatására használtam. Ezzel a primer párral kimutathatóvá vált a búza és a vele keresztreakciót mutató tritikálé. Az amaránt a búzához közeli mérettartományban eső jelet adott, ezért nem javaslom ebben az esetben negatív kontrollként való alkalmazását, hiszen kis felbontású gélkép esetében a jel megtévesztő lehet.

Végül a búza, illetve a keresztreakáló gabonafélék közül a rozs és az árpa szelektív kimutatására adaptált WBR11/WBR13 nevű primer párról kísérleteim során bebizonyosodott, hogy tritikálé kimutatására szintén alkalmas. A szekvencia pontosabb azonosíthatósága érdekében az ezen primerrel kapott DNS szakaszokat az irodalomban leírtak szerint *Alu1* (68 bp és 133 bp hosszú DNS-fragmentumok) és *BsmA1* (86 bp és 115 bp hosszú DNS-fragmentumok) restrikciós endonukleázokkal hasítottam, így az eredményeket PCR-RFLP módszer segítségével pontosítottam.

A fenti módszerek mindegyike, optimálás után, sok esetben önmagában is, de legfőképpen együttesen alkalmazva megfelelőnek bizonyult glutén szennyeződés szűrésére. Optimálás után további mintákon teszteltem az adaptált és kifejlesztett módszereket: gluténmentes kenyeret sütő üzemben vett mintákon és gluténmentesnek szánt élelmiszer mintákon (sárgaborsó tészta).

A Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt. közreműködésével egy gluténmentes kenyeret gyártó üzemi technológia vizsgálatát végeztem el a lehetséges kontamináció kiszűrése céljából. Vizsgáltam a nyersanyagokat (kukoricakeményítő, rizsliszt, burgonyapehely, tojáspor, élesztő) az esetleges tárolási hibák kiszűrése végett, majd mesterséges szennyezést iktattam be a technológiai folyamatok három fontos pontján (a dagasztási eljárás, a sütés és a kenyerek szárítása során). A kísérleti gyártást két részletben végeztem, először búzalisztet, majd rozslisztet használtam mesterséges szennyezőanyagként. Vizsgáltam ezek utólagos megjelenését, illetve kimutathatóságát a végtermékből. Arra törekedtem, hogy a veszélyeztetett technológiai fázisok pontos meghatározása révén a kontaminációs kockázat kiszűrhető legyen. Eredményeim összegzése során arra a következtetésre jutottam, hogy búza specifikus PCR, érzékenységből adódóan, a nyersanyagban is megtalálta a nyomokban jelen lévő kontamináns tiltott gabonaféle, a búza DNS részletét. Ez a szennyezettség a végtermékben is érzékelhető volt. Más módszerek esetében, mint a búza, rozs és árpa szelektív kimutatására adaptált WBR11/WBR13 technikánál megállapítható volt, hogy a két



leginkább szennyeződésnek kitett pont a technológia során a dagasztó tisztasága és a nagy nedvességtartalmú kenyerek 24 órás szárítása volt.

További alkalmazásként teszteltem a módszereket sárgaborsó lisztből készült száraztésztákon, amelyeket új fejlesztésként, mint gluténmentes élelmiszert kívánnak forgalomba hozni. Eredményként azt állapítottam meg, hogy a sárgaborsónak ugyan nincs keresztreakciója a tiltott gabonafélékkel, tehát a pozitív eredményt a sárgaborsó lisztben és tésztában nyomokban jelen lévő búza eredetű szennyeződés okozta. Ezt a kontaminációt a sárgaborsó nem megfelelő őrlési körülményei, vagy a kereskedelemben kapható sárgaborsó liszt nem megfelelő kezelése, tárolása okozhatta.

## 9. SUMMARY

Coeliac disease (gluten-sensitive enteropathy) is an autoimmune disease triggered by consumption of cereal (wheat, rye, barley, triticale, oat(?)) prolamins, like gluten. The substance is, that these prolamins can cause the characteristic symptoms of coeliac disease, like damaging the small intestine in subjects who are predisposed to it. Therapy consists of a gluten-free diet. Although nowadays oats are generally considered not to be harmful, it has to be pointed out that it is still a potential problem that oats are frequently contaminated by wheat, therefore it is also prohibited in the coeliac diet. There are no conclusive clinical data on the threshold of gluten sensitivity of coeliac patients. Contamination of foodstuff constituents and inadvertent dietary transgressions are not rare. Accordingly, the food producers have to guarantee that their products are free from gluten, otherwise the labelling of gluten content is obligatory. For this purpose considerable progress has been made in gluten analysis of food, immunochemical assays (e.g. ELISA) and non-immune methods have been introduced. Sensitivity, specificity and reproducibility of earlier protein based methods for gluten analysis were unsatisfactory, since the protein conformation usually changes dramatically during the technological process applied in the food industry. DNA-based PCR method provides new facilities to detect gluten contamination in processed foodstuffs. The aim of the application of PCR method is not to substitute ELISA, but to find a good complementary opportunity to detect gluten, or other toxic prolamins contamination. Furthermore, this could be a possibility to prove the presence of some „hidden” allergens, like wheat starch in foodstuffs originally free from allergen residues. The present study describes the evaluation of polymerase chain reaction systems as possible indicators of contamination of gluten-free food with the celiac-toxic cereals.

During the experiment 4 primer pairs were adapted to analyse the different samples: A49855 and B49317 chloroplast DNA primer pair (amplifies 400-700 bp long amplicons, plantspecies-specific) in order to check the amplificability of the isolated DNA; TR01/TR02 wheat-specific primer pair (amplifies 109 bp amplicons) for proving the origin of the DNA; a glutenin-specific microsatellite (P1/P2) primer pair (amplifies 150 bp amplicons) in order to find the specific intron sequence of the LMW glutenin gene; and finally a wheat-, barley- and rye-specific WBR11/WBR13 primer pair (amplifies 201 bp amplicons in case of wheat and rye; amplifies 196 bp amplicons in case of barley) for the selective detection of these three cereals. In case of the last primer pair a PCR-RFLP analysis for PCR-products was adapted regarding the references.

The adapted and developed methods were optimized on different samples like: flours from different varieties of wheat, wheat pastas, boiled pastas, wheat breads, cross-reactive (rye, barley, oat(?), triticale) and not cross-reactive (rice, maize) cereals, pseudocereals (amaranth, buckwheat).

The amplifiability and purity (lack of PCR inhibitors) of the DNA samples was proved by determining the R value and by the amplification with the B49317/A49855 plant-specific primer pair. Considering that this analysis has eventuated species-specific signals, this is a good opportunity for pre-selection of the foodstuffs containing forbidden cereals according to these results.

With the TR01/TR02 primer pair based analysis a conservative wheat DNA sequence was detected in the wheat containing samples. There was no cross-reaction detected with other cereals. Nevertheless, the wheat origin of the DNA samples was also proved in cases of the strongly heat treated samples.

The P1/P2 primer pair was used for identification of the presence of partial sequence from the LMW-glutenin coding gene. It was turned out that this primer pair is applicable to detect both the wheat and the triticale, too. During this analysis the amaranth DNA eventuated a very similar size of amplicon than the wheat and triticale samples. Considering this result the application of amaranth as negative control, may result in a false-positive signal in case of a gelelectroforetogram of inferior quality, therefore its use as a negative control is not recommended.

Finally it was proved also that the adapted wheat-, barley- and rye-specific WBR11/WBR13 primer pair is appropriate for detecting triticale, too. The DNA fragments amplified by this primer pair, according to the references, were digested with *Alu1* (effected 68 bp and 133 bp long DNA-fragments) and *BsmA1* (effected 86 bp és 115 bp long DNA-fragments) restriction endonucleases in order to identify and refine the results with PCR-RFLP method.

After an adequate optimization, each methods mentioned above proved appropriate one by one, or more effectively in sequence for detection of gluten contamination. After optimization, the adapted and developed methods were tested on further samples: samples from a factory making gluten-free bread and samples from other gluten-free products (yellow-pea noodles).

With kind contribution of „Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi” LTD. the analysis of a gluten-free bread manufacturing technology was performed in order to detect the critical contamination points. The raw materials (maize-starch, rice-flour, potato- flakes, egg-powder and yeast) were analysed to exclude the incidental storage failures. An artificial contamination was also performed in 3 operative points of the technology (in the kneader-engine, in the pastry cutters and during desiccation of the gluten-free bread). In two series of production wheat and rye flours were used as contaminants, and then their detection was attempted from the end-products. Through the intervention of exact definition of the critical points, the contamination risk could be easily

determined. As a summary it can be concluded that wheat specific PCR method detects even traces of wheat residues, due to the high sensibility of this primer pair. This contamination was detectable also in the end-products. Regarding the other methods like wheat-, barley- and rye-specific PCR it was found that the most critical risk points of the technology were the clearness of the kneader-engine and the place of 24 hour long drying of the gluten-free bread products.

As a further adaption, the PCR methods were tested on recently developed and introduced yellow-pee noodles. Concerning the results it can be pointed out that although the yellow-pea gives no crossreaction with the specific primers of the prohibited cereals, the yellow-pea flour and the yellow-pea noodle samples originating from the production, gave positive contamination signals. It could be probably due to the inadequate milling circumstances or due to the storage failures of the flour on the commercial circulation.

## 10. MELLÉKLETEK

### M1. Irodalomjegyzék

167/2004. (XI. 29.) FVM-EÜM-GKM (2004) együttes rendelet, kiadva a „19/2004. (II. 26.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet az élelmiszerek jelöléséről” módosítására.

2003/89/EK (2003), Az Európai Parlament és Tanács irányelve (2003/89/EC direktíva), Az Európai Unió Hivatalos Lapja L308.

2006/142/EK irányelv (2006. december 22.) a 2000/13/EK európai parlamenti és tanácsi irányelvnek az élelmiszerek címkézésén minden körülmények között megjelölendő összetevők listáját tartalmazó IIIa. melléklete módosításáról.

AALBERSE, R. C. (1995): Physicochemical Characteristics of food allergens, In: Weck, A., Sampson, H. A. (ed.): *Intestinal immunology and food allergy*, New York: Raven Press Ltd., 47-51. p.

ALINORM 08/31/26: Report of the 29<sup>th</sup> Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Germany 12 - 16 November 2007, Appendix III., 50-51. p.

ALLMANN, M., CANDRIAN, U., HÖFELEIN, C., LÜTHY, J. (1993): Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food, *Lebensmittel Untersuchung und -Forschung*, 196 248-251. p.

ARENDRT, K. E., SCHOBER, T. J., GORMLEY, R., GALLAGHER, E. (2004): Új szemlélet a gluténmentes gabonatermékek előállításában, *Élelmezési ipar*. LVIII. évf. 1. szám, 5-13. p.

AUSUBEL, F.M. (ed.) (1989) *Short Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley, 387. p.

BARKER, R.F., HARBERD, N.P., JARVIS, M.G., FLAVELL, R.B. (1988): Structure and evolution of the intergenic region in a ribosomal DNA repeat unit of wheat, *J. Mol. Biol.*, 201 (1) 1-17. p.

BARNA, M. (2000): Bevezetés a táplálékallergia és intolerancia problémakörébe, In: Barna M. (ed.): *Magyar Táplálékallergia és Táplálékintolerancia Adatbank*, Budapest: ZOO-VITA Kft., 11-16. p.

BÁLINT, M. (2000a): Molekuláris biológia I. Budapest: Műszaki Könyvkiadó. 207 .p.

BÁLINT, M. (2000b): Molekuláris biológia II.. Budapest: Műszaki Könyvkiadó.

BELOZERSKY, M. A., DUNAEVSKY, Y. E., MUSOLYAMOV, A. K., EGOROV, T. A. (1995): Complete aminoacid sequence of the protease inhibitor from buckwheat seeds, *FEBS Lett.*, 371 264-266. p.

BIACS, P., AUBRECHT, E., LÉDER, I., LAJOS, J. (1999): A hajdina termesztése, felhasználása, táplálkozásélettani szerepe. A hajdinamag és termék kémiai, immunokémiai jellemzése, *Sütőipar*, XLVI (3) 9-13. p.

BIENVENIDO, O. J. (1993): Rice in human nutrition., *FAO Food and Nutrition Series*, 26 61-62. p.

BOROSS, L., SAJGÓ, M. (2003): A biokémia alapjai, Budapest: Mezőgazda Kiadó

BRANLARD, G. (2004): Genetic determination of protein quality in wheat grain, *International workshop on modelling quality traits and their genetic variability for wheat*, 18-21 July 2004, Clermont-Ferrand, France.

CANDRIAN, U., LÜTHY, J. (1991): Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik, *Chimia*, 45 49-52. p.

CHARBONNIER, L., MOSSÉ, J. (1980): Large scale isolation of gliadin fractions, *Journal of Science and Food Agricultural* 31 54-61. p.

CHEFTEL, J. C. (2005): Food and nutrition labelling in the European Union, *Food Chemistry*, 93 531-550. p.

CICLITIRIA, P.L., ELLIS, H.J. (1991): Determination of gluten content of foods, *Panminerva med.*, 33 75-82. p.

COLLIN, P., THORELL, L., KAUKINEN, K., MÄKI, M. (2004): The safe threshold for gluten contamination in gluten-free products. Can trace amounts be accepted in the treatment of coeliac disease?, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 19 1277-1283. p.

COLLIN, P., KAUKINEN, K. (2005): Are trace amounts of gluten acceptable in the treatment of coeliac disease, In: Stern, M. (ed.): *Proceedings of the 20th Meeting of Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*, 16-18. September, Maikammer, Germany, 107-110. p.

CX/NFSDU 03/4 OKT. (2003), Fogyasztható gliadin mennyiség cöliákiásokban a (WGPAT), 2003. Prolamin-Analízis és Toxicitás Munkacsoport jelentése alapján.

DAHINDEN, I., VON BÜREN, M., LÜTHY, J. (2001): A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients, *European Food Research and Technology*, 212 228-233. p.

DÁVID, CS. (1999): A pohánka jellemzői, termesztése és felhasználása, Budapest: Gazda Kiadó, 4-6. p.

DELANO, J., SCHMIDT, A. (2004): Use of an intron region of a chloroplast tRNA gene (*trnL*) as a target for PCR identification of specific food crops including sources of potential allergens, *Food Research International*, 37 395-402. p.

DENERY-PAPINI, S., NICOLAS, Y., POPINEAU, Y. (1999): Efficiency and limitations of immunochemical assays for the testing of gluten-free foods, *Journal of Cereal Science*, 30 121-131. p.

DE VINCENZI, M., LUCHETTI, R., PERUFFO, A. D., CURIONI, A., POGNA, N. E. (1996): *In-vitro* assessment of acetic-acid-soluble protein (glutenin) toxicity in celiac disease, *Journal of Biochemical Toxicology*, 11 205-210. p.

DEVOS, K. M., BRYAN, G. J., COLLINS, A. J., STEPHENSON, P., GALE, M. D. (1995): Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers, *Theor. Appl. Genet.*, 90 247-252. p.

DICKE, W. K. (1950): Coeliakie. *MD Thesis*, Utrecht.

EFSA-Q-2003-016 (2004) Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on the request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes, *The EFSA Journal*, 32 1-197. p.

ELLIS, H. J., DEWAR, D. H., GONZALEZ-CINCA, N., POLLOCK, E. L., WIESER, H. et al. (2005): The toxicity of recombinant high-molecular-weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease, In: Stern, M. (ed.): *Proceedings of the 20th Meeting of Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*, 16-18. September, Maikammer, Germany, 83-85. p.

FALCHUK, Z. M., NELSON, D. L., KATZ, A. J., BERNARDIN, J. E., KASARDA, D. D. et al. (1980): Gluten-sensitive enteropathy, *J. Clin. Invest.*, 66 227-233. p.

FANG, G., HAMMAR, S., GRUMET, R. (1992): A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA, *BioTechniques*, 13 52-55. p.

FRÄNKEN, J., STEPHAN, U., MEYER, H. E., KONIG, W. (1994): Identification of alpha-amylase inhibitor as a major allergen in wheat flour, *Arch. Allergy Immunol.*, 104 171-4. p.

GEE, S.J. (1888): On the coeliac affection. *St Bartholomew's Hospital Report*, 24 17-20. p.

GERRARD, J.A., SUTTON, K.H. (2005): Addition of transglutaminase to cereal products may generate the epitope responsible for coeliac disease, *Trends in Food Science and Technology*, 16 510-512. p.

GORINSTEIN, S., ZEMSER, M., FLIESS, A., SHNITMAN, I., PAREDES-LOPEZ, O. et al. (1998): Computational analysis of the amino acid residue sequences of amaranth and other proteins, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62 1845-1851. p.

GORINSTEIN, S., PAWELZIK, E., DELGADO-LICON, E., HARUENKIT, R., WEISZ, M., TRAKHTENBERG, S. (2002): Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 886-891. p.



HAJÓSNÉ NOVÁK, M. (ed.) (1999): Genetikai variabilitás a növénynevelésben, Budapest: Mezőgazda Kiadó, 42-44. p.

HERNANDÉZ, M., ESTEVE, T., PLA, M. (2005): Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Assays for Quantitative Detection of Barley, Rice, Sunflower and Wheat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (18) 7003-7009. p.

HERNANDO, A., MUJICO, J. R., JUANAS, D., MENA, M. C., MÉNDEZ, E. (2005): Corroboration of a massive contamination of wheat, barley and rye in oat samples by confirmatory techniques: R5 ELISA, Western blot, PCR and mass spectrometry, In: Stern, M. (ed.): *Proceedings of the 20th Meeting of Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*, 16-18. September, Maikammer, Germany, 29-35. p.

HERNANDO, A., MUJICO, J. R., JUANAS, D., MÉNDEZ, E. (2006): Confirmation of the cereal type in oat products highly contaminated with gluten, *Journal of the American Dietetic Association*, 106 (5) 665. p.

HISCHENHUBER, C., CREVEL, R., JARRY, B., MÄKIS, M., MONERET-VAUTRIN (2006): Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23 559-575. p.

HOLZHAUSER, T., STEPHAN, O., VIETHS, S. (2006): Polymerase chain reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods, 125-143. p., In: Koppelman, S. J., Hefle, S. L. (ed.): *Detecting allergens in food*, Cambridge: CRC Press, XVI, 422. p.

HORACSEK, M. (1995): A gliadin kimutatása élelmiszerekben, *Doktori összefoglalók. OÉTI*.  
<http://www.chemonet.hu/hun/food/phd/kerteszhoracsek.html>

HORACSEK, M. (2005): A gluténmentes élelmiszerek nemzetközi szabályozásának aktuális kérdései, In: Bánáti, D., Molnár, I. (ed.): *Gluténmentes élelmiszerek, Élelmiszer-biztonsági közlemények II.*, Budapest: Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, 33-36. p.

HÖGGER, L., LAURIN, P., FÄLTH-MAGNUSSON, K., GRANT, C., GRODZINSKY, E., et al. (2004): Oats to children with newly diagnosed coeliac disease: a randomised double blind study. *Gut*, 53 649-654. p.

INNIS, M. A., GELFAND, H., SNINSKY, J. (ed.) (1990): PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, *Academic Press Inc.*

JAMES, D., SCHMIDT, A.-M. (2004): Use of an intron region of a chloroplast tRNA gene (trnL) as a target for PCR identification of specific food crops including sources of potential allergens, *Food Res. Intern.*, 37 395-402. p.

JAMES, J. M., SIXBEY, J. P., HELM, R. M., BANNON, G. A., BURKS, A. W. (1997): Wheat  $\alpha$ -amylase inhibitor: A second route of allergic sensitization, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 99 239-44. p.

JANATUINEN, E. K., KEMPPAINEN, T. A., JULKUNEN, R. J. K., KOSMA, V.-M., MÄKI, M., et al. (2002): No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease, *Gut*, 50 332-335. p.

JANSSEN, F. W., HÄGELE, G. H., VAN TRIEST, M., DE BAAIJ, J. A. (1998): Contamination of rolled oats with wheat, rye and barley. *Proceedings of the 13th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*, November 5-8, Barcelona, Spain, 29-35. p.

JANSSEN, F. W. (2006): Detecting wheat gluten in food, 244-272. p., In: Koppelman, S. J., Hefle, S. L. (ed.): *Detecting allergens in food*, Cambridge: CRC Press, XVI, 422. p.

JUHÁSZ, A., TAMÁS, L., KARSAI, I., VIDA, G., LÁNG, L. et al. (2001): Identification, cloning and characterization of a HMW-glutenin gene from an old hungarian wheat variety, Bánkúti 1201, 183-188. p. In: Bedő, Z. and Láng, L. (ed.): *Wheat in a Global Environment*, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

KAHLENBERG, F., SANCHEZ, D., LACHMANN, I., TUCKOVA, L., TLASKALOVA, H. (2006): Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides, *European Food Research and Technology*, 222 (1-2) 78-82. p.

KASARDA, D. D., AUTRAN, J.-C., LEW, E. J.-L., NIMMO, C. C., SHEWRY, P. R. (1983): N-terminal amino acid sequences of  $\omega$ -gliadins and  $\omega$ -secalins. Implications for the evolution of prolamin genes, *Biochim. biophys. acta*, 747 (1-2) 138-150. p.

KASARDA, D. D., OKITA, T. W., BERNARDIN, J. E., BAECKER, P. A., NIMMO, C. C. et al. (1984): Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of alpha-type gliadins from wheat (*Triticum aestivum*), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 81 (15) 4712–4716. p.

KASARDA, D. D. (2001): Grains in relation to celiac disease, *Cereal foods world*, 46 (5) 209-210. p. (<http://www.aaccnet.org/grainbin/kasarda.asp>)

KO, H. L., HENRY, R. J., GRAHAM, G. C., FOX, G. P., CHADBONE, D. A. et al. (1994): Identification of cereals using the polimerase chain reaction, *Journal of Cereal Science*, 19 101-106. p.

KOPPELMAN, S. J., HEFLE, S. L. (2006): Detecting allergens in food, Cambridge: CRC Press, 28-29. p.

KORPONAY-SZABÓ, I. R., KOVÁCS, J. B., CZINNER, A., GORACZ, G., VÁMOS, A., et al. (1999): High prevalence of silent celiac disease in preschool children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 28 26–30. p.

KOVÁCS, B. J. (2000): Gluténszenzitív betegségek, 190-195. p. In: Barna M.(ed.): *Magyar Táplálékallergia és Táplálékintolerancia Adatbank*, ZOO-VITA Kft., Budapest

KÖPPEL, E., STADLER, M., LÜTHY, J., HÜBNER, P. (1998): Detection of wheat contamination in oats by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Zeitung für Lebensm. Unters. Forsch.*, 206 399-403. p.

KUCHTA, T. (2004): DNA extraction and PCR method for the detection of gluten-containing cereals (wheat or barley or rye) in instant infant powder, MolSpec-ID Collaborative Study

LÁSZTITY, R. (1981): Gabonafehérjék, Budapest: Mezőgazdasági Kiadó, 41-48. p.; 133-143. p.

LÁSZTITY, R. (1996): The Chemistry of Cereal Proteins, Boca Raton: CRC Press Inc., 23-47. p.; 142-147. p.; 159-162. p.; 185-189. p.; 249-253. p.; 282-283. p.

LÁSZTITY, R. (1999): Cereal Chemistry, Budapest: Akadémiai Kiadó, 73-84. p., 174-176. p.; 222-225. p.; 267-272. p.

LUNDIN, K. E. A., NILSEN, E. M., SCOTT, H.G., et al. (2003): Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut*, 52 1649-1652. p.

MANIATIS, T., FRIRSCH, E. F., SAMBROOK, J. (1989): Molecular cloning, New York: Cold Spring Harbor

MASON-GAMER, R.J., ORME, N.L., ANDERSON, C.M. (2002): Phylogenetic analysis of North American Elymus and the monogenomic Triticeae (Poaceae) using three chloroplast DNA data sets, *Genome*, 45 (6) 991-1002. p.

MATUZ, J. (2000): Gabonafélék, In: Hajós. Gy., Zajkás, G. (ed.): *Táplálkozás egészségkönyve*, Budapest: Kossuth Kiadó, 95-107. p.

MÉNDEZ, E., VELA, C., IMMER, U., JANSSEN, F. W. (2005): Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food, *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17 (10) 1053-1063. p.

MEYER, R., CANDRIAN, U. (1996): PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components, *Lebensm. –Wiss. u. –Technol.*, 29 1-9. p.

MOORE, G., DEVOS, K. M., WANG, Z., GALE, M. D. (1995): Grasses, line up and form a circle, *Current Biology*, 5 (7) 737-739. p.

MUJICO, J. R., MÉNDEZ, E. (2005): Simultaneous detection/quantification of wheat, barley and rye DNA by a new quantitative real-time PCR system, In: Stern, M. (ed.): *Proceedings of the 20th Meeting of Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*, 16-18. September, Maikammer, Germany, 39-45. p.

MULLIS, K. B., FRED, A., FALOONA, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, 335-350. p. In: Wu, R. (ed.): *Methods in Enzymology. Recombinant DNA Part F* New York: Elsevier Inc., 628 p.

NÉMEDI, E., UJHELYI, G., GELENCSÉR, É. (2007): Detection of gluten contamination with PCR method, *Acta Alimentaria*, 36 (2) 241-248. p.

OGIHARA, Y., ISONO, K., KOJIMA, T., ENDO, A., HANAOKA, M. et al. (2002): Structural features of wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA, *Mol. Genet. Genomics*, 266 740-746. p.

OLEXOVÁ, L., DOVICOVICOVÁ, L., SVEC, M., SIEKEL, P., KUČHTA, T. (2006): Detection of gluten-containing cereals in flours and "gluten-free" bakery products by polymerase chain reaction. *Food Control*, 17 234-237. p.

OSBORNE, T. B. (1907): *The Proteins of the Wheat Kernel*, Washington: Carnegie Institute

PARNELL, N. D. J., CICLITIRA, P. J. (1999): Review article: coeliac disease and its management, *Aliment. Pharm. Ther.*, 13 1–13. p.

PITTS, E.G., RAFALSKI, J.A., HEDGCOTH, C. (1988): Nucleotide sequence and encoded amino acid sequence of a genomic gene region for a low molecular weight glutenin, *Nucleic Acids Res.*, 16 (23) 11376. p.

POLGÁR, M. (1996): Táplálkozási allergiák, In: Polgár, M.(ed.): *Allergia csecsemő- és gyermekkorban*, Budapest: Springer Hungarica Kiadó, 117-121. p.

POLGÁR, M. (2005): A coeliakia és gabonaallergia jellegzetességei, diagnosztikus és étrendi konzekvenciái gyermek és felnőtt korban, In: Bánáti D., Molnár I. (ed.): *Gluténmentes élelmiszerek, Élelmiszer-biztonsági közlemények II.*, Budapest: Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, 14-18. p.

POMS, R. E., KLEIN, C. L., ANKLAM, E. (2004): Methods for allergen analysis in food: review, *Food Additives and Contaminants*, 21 (1) 1-31. p.

REDONDO, M. C. B., GRIFFIN, P. B., GARZON RANSANZ, M., ELLIS, H. J., CICLITIRA, P. J. et al. (2005): Monoclonal antibody-based competitive assay for the sensitive detection of coeliac disease toxic prolamins, *Analytica Chimica Acta*, 551 105-114. p.

REINTON, N., HELGHEIM, A., SHEGARFI, H., MOGHADDAM, A. (2006): A one-step real-time PCR assay for detection of DQA1\*05, DQB1\*02, and DQB1\*0302 to aid diagnosis of celiac disease, *Journal of Immunological Methods*, 316 125-132. p.

RETHEL, B., DELMAS, G., LAOUEDJ, A. (1993): Isolation of polysaccharide-free DNA from plants, *Plant Mol. Biol. Repr.*, 11 333-337. p.

RODLER, I. (ed.) (2005): Új tápanyagtáblázat, Budapest: Medicina.

ROGERS, H. J., BURNS, N. A., PARKES, H. C. (1996): Comparison of small-scale methods for the rapid extraction of plant DNA suitable for PCR analysis, *Plant Molecular Biology Reporter*, 14 (2) 170-183. p.

ROSSEN, L., NORSKOV, P., HOLMSTROM, K., RASMUSSEN, O. F. (1992): Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17 37-45. p.

RÖDER, M. S., KORZUN, V., WENDEHAKE, K., PLASCHKE, J., TIXIER, M.-H. et al. (1998): A microsatellite map of wheat, *Genetics*, 149 2007-2023. p.

RUMBO, M., CHIRDO, F. G., FOSSATI C. A., ANON, M. C. (1996): Influence of thermal treatment of food on the immunochemical quantification of gliadin, *Food and Agricultural Immunology*, 8 195-203. p.

SANDBERG, M., LUNDBERG, L., FERM, M., YMAN, I. M. (2003): Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods, *Eur. Food Res. Technol.*, 217 344-349. p.

SHARMA, K. K., LAVANYA, M., ANJIAH, V. (2000): A Method for Isolation and Purification of Peanut Genomic DNA Suitable for Analytical Applications, *Plant Molecular Biology Reporter*, 18 393a-393h. p.

SKERRITT, J. H., DEVERY, J.M. (1990a): Gluten Intolerance: Chemistry, Celiac toxicity and Detection of Prolamins in Foods, *Cereal Foods World*, 35 638-644. p.

SKERRITT, J. H., HILL, A.S. (1990b): Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods, *J.Agric. Food Chem*, 38 1771-1778. p.

SKERRITT, J. H., FREND, A. J., ROBSON, L. G., GREENWELL, P. (1990c): Immunological homologies between wheat gluten and starch granule proteins, *Journal of Cereal Science*, 12 123-136. p.

SZAMOS, J., AUBRECHT, E., GELENCSÉR, É. (1998): Detection of wheat by adapted polymerase chain reaction (PCR) methodology, *Acta Alimentaria*, 27 (1) 87-95. p.

TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G., BOUVET, J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, *Plant Molecular Biology*, 17 1105-1109. p.

TAKÁCS, K., NÉMEDI, E., GELENCSÉR, É. (2005): Fehérje és DNS alapú glutén kimutatási módszerek, *Élelmiszer Biztonsági Közlemények II.* 24-32. p.

TAKÁCS, K., NÉMEDI, E., MÁRTA, D., GELENCSÉR, É. (2007): Use of the enzyme transglutaminase for developing glutenfree noodle products from pea flour, *Acta Alimentaria*, 36 (2) 195-205. p.

TAMÁSI, M. (1999): Allergénkomponenst nem tartalmazó élelmiszerek gyártási folyamatának minőségbiztosítása, *Hozzáférhető a Fejér Megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomáson*, 374-377. p.

TERZI, V., INFASCELLI, F., TUDISCO, R., RUSSO, G., STANCA, A. M. et al. (2004): Quantitative detection of *Secale cereale* by real-time PCR amplification, *Lebensm. –Wiss. u. –Technol.*, 37 239-246. p.

TERZI, V., MORCIA, C., GORRINI, A., STANCA, M., SHEWRY, P. R. et al. (2005): DNA-based methods for identification and quantification of small grain cereal mixtures and fingerprinting of varieties, *Journal of Cereal Science*, 41 213-220. p.

TILLEY, M. (2004): PCR amplification of wheat sequences from DNA extracted during milling and baking, *Cereal Chemistry*, 81 (1) 44-47. p.

THOMPSON, T. (2004): Gluten contamination of commercial oat products in the United States. *New Engl. J. Med.*, 351 (19) 2021-2022. p.

TÖRJÉK, O., KISS, E., MÁZIK-TÓKEI, K., HUTVÁGNER, G., SILHAVY, D. et al. (2001): Comparative molecular analysis of winter wheat cultivars and their doubled haploid derivatives, *Cereal Research Communications*, 29 41-47. p.

TÖRJÉK, O., KISS, E., MÁZIK-TÓKEI, K., HUTVÁGNER, G., SILHAVY, D. et al. (2002): Hagyományos és DH (Doubled Haploid) búzafajták, valamint DH vonalaik homogenitásának molekuláris elemzése, *Növénytermelés*, 51 (1) 7-20. p.

TSUJI, H., KIMOTO, M., NATORI, Y. (2001): Allergens in major crops, *Nutrition Research*, 21 925-934. p.

TSYBINA, T. A., DUNAEVSKY, Y. E., MUSOLYAMOV, A. K., EGOROV, T. A., BELOZERSKY, M. A. (2001): Cationic inhibitors of serine proteinases from buckwheat seeds, *Biochemistry (Mosc.)*, 66 (9) 941-947. p.

VALDÉS, I., GARCÍA, E., LLORENTE, M., MÉNDEZ, E. (2003): Innovative approach to low level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol, *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15 (5) 465-474. p.

VARMA, A., PADH, H., SHRIVASTAVA, N. (2007): Plant genomic DNA isolation: An art or a science, *Biotechnology Journal*, 2 (3) 386-392. p.

VÁRKONYI, Á. (2000): Allergiás kórképek és a coeliakia genetikai háttere, In: Barna, M.(szerk.) *Magyar Táplálékallergia és Táplálékintolerancia Adatbank*, ZOO-VITA Kft., Budapest, 24- 30. p.

WILSON, I.G.(1997): Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification, *Appl. Env. Microbiology*, 63 (10) 3741-3751. p.

YAP, E. P. H., LO, Y.-M. O., FLEMING, A., MCGEE, J. O'D. (1994): False-positives and contamination in PCR, 249-258. p., In: Griffin, H. G., Griffin, A. (ed.): *PCR Tecnology: Current Innovations, Chapter 27*, Florida: CRC Press, 370 p.



YUAN HE, G., JONES, H. D., D'OVIDIO, R., MASCI, S., CHEN, M. et al. (2005): Expression of an extended HMW subunit in transgenic wheat and the effect on dough mixing properties, *Journal of Cereal Science*, 42 225-231. p.

ZIMMERMANN, A., LÜTHY, J., PAULI, U. (1998): Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples, *Zeitung für Lebensm. Unters. Forsch.*, 207 81-90. p.

[www.promega.com](http://www.promega.com) ; Protocols&Applications Guide: Nucleic Acid Amplification

<http://hu.wikipedia.org/wiki/PCR>

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> National Center for Biotechnology Information (NCBI) adatbázisa

## M2. Adatbázisban megtalálható szekvencia-információk

A dolgozatban felhasznált primer párok és az általuk amplifikált DNS szekvenciák egy része az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázisban visszakereshető. A következőkben megadtam az irodalmi hivatkozások és az egyes primer párok szekvenciái alapján kikeresett ampikonok adatbázisban fellelhető szekvencia információit, amelyek alátámasztják a vizsgálataimat. Az alábbiakban a szekvenciák elérhetőségeit azonosító kódjuk (accession number) és definíciójuk (definition) alapján adtam meg. A primer párokat különböző színekkel jelöltem megkülönböztetésül.

- **WBR11/WBR13** szekvenciája: **GGTAACTTCCAAATTCAGAGAAAC** és **TCTCTAATTTAGAATTAGAAGGAA** (reverz formája: **TTCCTTCTAATTCTAAATTAGAGA**)
- **B49317/A49855** szekvenciája: **CGAAATCGGTAGACGCTACG** és **GGGGATAGAGGGACTTGAAC** (reverz formája: **GTTCAAGTCCCTCTATCCCC**)
- **TR01/TR02** szekvenciája: **GAACGGGCTGTACGAGGACACGGGA** és **GCGGCGTGTGCCACGTACGTGGTTT** (reverz formája: **AAACCACGTACGTGGCACACGCCGC**)
- **P1/P2** szekvenciája: **TCCCGCCATGAGTCAATC** és **TTGGGAGACACATTGGCC** (reverz formája: **GGCCAATGTGTCTCCCAA**)

### Búza (*Triticum aestivum*) **WBR11/WBR13** és **B49317/A49855** primer párokkal nyert ampikonok szekvenciái

ACCESSION NUMBER: **DQ131550** 662 bp DNA  
DEFINITION *Triticum aestivum* tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; chloroplast.  
(James and Schmidt, 2004)

Vagy ugyanez a részlet megtalálható még a:

ACCESSION NUMBER: **AB042240** 134545 bp DNA  
DEFINITION *Triticum aestivum* chloroplast DNA, complete genome.  
(Ogihara et al., 2002)

**CGAAATCGGTAGACGCTACG**GACTTGATTGTATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCT  
AAGT**GGTAACTTCCAAATTCAGAGAAAC**CCCTGGAATTAATAAAAGGGCAATCCTGAGC  
CAAATCCGTGTTTTGAGAAAACAAGGGGTTCTCGAACTAGAATACAAAGGAAAAGGAT  
AGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATCGAGTTAATTACGTTGTGTTGTT  
AGTGGAAT**TTCCTTCTAATTCTAAATTAGAGA**AAGAGGGGTTTTATACTTATACATTT  
AATAAACACGTATAGATACTGACATAGCAAACGATTAATCACAGAACTCATATTATAT  
TATAATTATAATATAGGTTCTTTATCTTTTTTAGAAATGAAATTAGAAATGATAATGAT  
TATGAAATAAAAAACTCATAAAAACTCATATCATAATTTTTTTTTCATTATTGTGAATCC

ACTCCAATCGAATATTGAATAATCAAATTCTTCAATTCAAATTCAAAGTTTTTCGAGATC  
TTTAAAAAAGTGGATTAATCGGACGAGGACAAAGAGAGAGTCCCATTCTACATGTCAA  
TACTGACAACAATGAAATTTCTAGTAAAAGGAAAATCCGTCGACTTTATAAGTTGTGA  
GG**GTTCAAGTCCCTCTATCCCC**

662 bp amplikon

201 bp amplikon

Árpa (*Hordeum vulgare*) **WBR11/WBR13** és **B49317/A49855** primer párokkal nyert  
amplikonok szekvenciái

ACCESSION NUMBER: **DQ131555** 642 bp DNA  
DEFINITION *Hordeum vulgare* tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence;  
(James and Schmidt, 2004)

**CGAAATCGGTAGACGCTACG**GACTTGATTGTATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCT  
AAGT**GGTAACTTCCAAATTCAGAGAAAC**CCCTGGAATTAATAAAAGGGCAATCCTGAGC  
CAAATCCGTGTTTTGAGAAGGGATTCTCGAACTAGAATACAAAGGAAAAGGATAGGTG  
CAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATCGAGTTAATTACGTTGTGTTGTTAGTGG  
AA**TTCCTTCTAATTCTAAATTAGAGA**AAGAGGGGTTTTATACTTTATACATTTAATAA  
ACACGTATAGATACTGACATAGCAAACGATTAATCACAGAACTCATATTATAATATAG  
GTTCTTTATCTTTTTTAAAATTTCAAATAAAAATTCGAAATGATTATGAAATAAAAAAC  
TCATATCATAATTTTATTTTGAATTATTGTGAATCCACTCCATTCGAATATTGAATAATC  
AAATTCTTCAATTCAAATTCAAAGTTTTGAGAACTTTTTAAAAAGAAAGTGGATTAATCG  
GACGAGGACAAAGAGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACTGACAACAATGAAATTTCT  
TAGTAAAAGGAAAATCCGTCGACTTTTTAAGTTGTGAGG**GTTCAAGTCCCTCTATCCC**  
**C**

642 bp amplikon

196 bp amplikon

Árpa és búza összehasonlítása (WBR11/WBR13 primer amplikonjai közötti különbség 5 bp)

**Búza**

**GGTAACTTCCAAATTCAGAGAAAC**CCCTGGAATTAATAAAAGGGCAATCCTGAGCCAA  
ATCCGTGTTTTGAGAA**AACAAGGGG**TTCTCGAACTAGAATACAAAGGAAAAGGATAG  
GTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATCGAGTTAATTACGTTGTGTTGTTAG  
TGGAAT**TTCCTTCTAATTCTAAATTAGAGA**

**Árpa**

**GGTAACTTCCAAATTCAGAGAAAC**CCCTGGAATTAATAAAAGGGCAATCCTGAGCCAA  
ATCCGTGTTTTGAGAA**GGGA**TTCTCGAACTAGAATACAAAGGAAAAGGATAGGTGCAG  
AGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATCGAGTTAATTACGTTGTGTTGTTAGTGGAA**T**  
**TCCTTCTAATTCTAAATTAGAGA**

**(a különböző régió a két fajnál)**

**Rozs (Secale cereale) [WBR11/WBR13](#) és [B49317/A49855](#) primer párokkal nyert amplikon szekvenciái**

ACCESSION NUMBER: **AF519162** 1706 bp DNA

DEFINITION: Secale cereale trnT gene, partial sequence; trnL gene, complete sequence; and trnF gene, partial sequence; chloroplast genes for chloroplast products.  
(Mason-Gamer et al., 2002)

GCTAAGTGGGCTTACATAACGGAAATAGTGTAACAAATAGAAATAGGTATAGTATAGG  
AAATCCGTAAAATCTCAGATATTAGTTATTAATCTTAGCTATTAAGTCTAAATTT  
GAAGTTCTACTTATAAAAATAAAAAAATACTAAAACCTTCTTAAAGATAAAGTTAGCTT  
GATATGCTTAACTATAGGATATTAATAAATAAATTATAGAATTTATTGGTATTTTCAT  
TCGATCATTATAGACTTTATTATTTGTTAATAATTTGAGGATTAATTTGACTAAGGG  
GAACATAGAGTCAGAGTAAATAAAATTGCTAATTCTGATTAGAAAAAAGAATAAATA  
TCAAGCGTTATAGTATAATTTTGAATACTATAAAAAAGTAAGATGGGAGGTGGGGGAG  
ATAAAAACTTTTGGATATATTGATTTCGGATTGAATTGCAAATACATCAAGGATAGAAT  
CAATTCAATTCTGAATTGCAATAAGCAAGCGGGGTCTCTCAAATAGAGTTCGAACTGAA  
CTGCTAGACTNCGTTGAGTGATGAACTCAATGATTCAAAAAAAAAAAACTAAGAGATG  
GATGAAATTACACAAGGAATCCTGGTCTCAAAGAAGAGGGAAATGGGGATATGG**CGA**  
**AATCGGTAGACGCTACG**ACTTGATTGTATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGT  
**GGTAACTTCCAAATTCAGAGAAAC**CCCTGGAATTA AAAAAGGGCAATCCTGAGCCAA  
ATCCGTGTTTTGAGAAAACAAGGGGTCTCGAACTAGAATACAAAGGAAAAGGATAG  
GTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATCGAGTTAATTACGTTGTGTTGTTAG  
TGGAAT**TTCCTTCTAATTCTAAATTAGAGA**AAGAGGGGTTTGGTTTTATACCTTATAACA  
TATACATTTAATAAACACGTATAGATACTGACATAGCAAACGATTAATCACAGAACTC  
ATATTATATTATAATTATAATATAGGTTCTTTATCTTTTTTAAAAATGAAATTCGAAATG  
ATAATGATTATGAAATAAAAAACTCATATCATAATTTTTTTTTTTTCATTATTGTGAAT  
CCACTCCAATCGAATATTGAATAATCAAATCTTCAATTCAAATTCAAAGTTTTTCGAGA  
TCTTTAAAAAAGCGGATTAATCGGACGAGGACAAAGAGAGAGTCCCATTCTACATGTC  
AATACTGACAACAATGAAATTTCTAGTAAAAGGAAAATCCGTCGACTTTATAAGTTGT  
GAGG**GTTCAAGTCCCTCTATCCCC**AAATCCTCTTTTATCCCTAACTATAACTATACT  
ATATTATTATTATTTATCCTCTTTTTTTTTTATCAATGGGTTTAAGATTCATTAGCTTTCTC  
ATTCTACTCTTTCACAAAGGAATGCGAAGAGAACTCAATGGATCTTATCCTATTTCATTG  
AATAGATTTCTTTTTTATTAGAGTATCGGCAAGAAATCTTGGTTATTCCTCCATTTTTTA  
AGTTTTATTTTATTTAAGTAAACCATGCACAATGCATAGGACTACCCCCCCCATTTTCA  
AATTTTGAATTTGAAATACTTTAATTAATTTTTTAGTCCTTTTAATTGACATAGATACAAA  
TACTCTACTAGGATGATGCACAAGAAAAGGTCAGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAG  
GACTGAAAATC

667 bp amplikon

196 bp amplikon

**Zab (Avena sativa) [WBR11/WBR13](#) és [B49317/A49855](#) primer párokkal nyert amplikon szekvenciái**

ACCESSION NUMBER: **DQ131557** 405 bp DNA

DEFINITION: Avena sativa tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; chloroplast.  
(James and Schmidt, 2004)

**CGAAATCGGTAGACGCTACG**GACTTGATTGTATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCT  
AAGT**GGTAACTTCCAATTCAGAGAAAC**CCTGGAATTAATAAAAGGGCAATCCTGAGC  
CAAATCCGTGTTTTGAGAGGGGGTTCGAAGTAGAATACAAAGGAAAAGGATAGGT  
GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATCGAGTTAATTACGTTGTGTGTTAGTG  
GAACTCCTTCTAAATTTGAAGGAAGGGCTTTATACATCTAATAAAGTGGATTAATCGG  
ACGAGGACAAAGAGAGAGTCCCATTCTACATGTGCGATACTGACAACAATGAAATTTCT  
AGTAAAAGGAAAATCCGTGCGACTTTATAAGTCGTGAGG**GTTCAAGTCCCTCTATCCC**  
**C**

405 bp amplikon

A WBR11/WBR13 nem tud sokszorozni, hiszen a primer pár közül csak az egyiknek van meg a kötődési helye.

### Rizs (*Oryza sativa*) **WBR11/WBR13** és **B49317/A49855** primer párokkal nyert amplikonok szekvenciái

ACCESSION NUMBER: **DQ131552** 615 bp DNA  
DEFINITION: *Oryza sativa* tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; chloroplast.  
(James and Schmidt, 2004)

**CGAAATCGGTAGACGCTACG**GACTTGATTGTATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCT  
AAGTGGCAACTTCCAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAATAAAAGGGGCAATCCTGAGC  
CAAATCCATGTTTTGAGAAAACAAGCGGTTCGAAGTAGAACCCAAAGGAAAAGGAT  
AGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATCGAGTTAATTACGTTGTGTGCT  
AGCGGAACTCCCTTCTAAATTAGGGAAAGAAGGGCTTTCGAAATCTAATACACACGTA  
TAGATACTGGCATAGCAAACGATTAATCACAGAACTCATATCATAATATAGGTTCTTTA  
ATTCTTTTTTTAAAATGAAAATAGGAATGATTATGAAATAGAAAATTCATAATTTTTTTA  
GAATTGTTGTGAATCCATTCCAATCGAATATTGAGTAATCAAATCCTTCAATTCATAGT  
TTTCGAAATCTTTTTAAAAGCGGATTAATCGGACGAGGATAAAGAGAGAGTCCCATT  
TACATGTCAATACTGACAACAATGAAATTTCTAGTAAAAGGAAAATCCGTGCGACTTTCT  
AAGTCGTGAGG**GTTCAAGTCCCTCTATCCCC**

615 bp amplikon

### Kukorica (*Zea mays*) **WBR11/WBR13** és **B49317/A49855** primer párokkal nyert amplikonok szekvenciái

ACCESSION NUMBER: **DQ131551** 532 bp DNA  
DEFINITION: *Zea mays* tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; chloroplast.  
(James and Schmidt, 2004)

**CGAAATCGGTAGACGCTACG**GACTTGATTGTATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCT  
AAGT**GGTAACTTCCAATTCAGAGAAAC**CCTGGAATGAAAATGGGCAATCCTGAGC  
CAAATCCCTTTTTTTGAAAACAAGTGGTTCGAACTAGAACCCAAAGGAAAAGGATA  
GGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATCGAAGTAATAACGATTAATCACA  
GAACCATATTATAATATAGGTTCTTTATTTTATTTTATTTTAGAATGAAATTAGGAATGATT  
ATGAAATAGAAAATTCATAATTTTTTTTTTATAATTATTGTGAATCTATTCCAATCAAAT  
ATTGAGTAATCAAATCCTTCAATTCATTGTTTTTCGAGATCTTTTAAATTTTTAAAAGTGG  
TTAATCGGACGAGGATAAAGAGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACTGACAACAATG

AAATTTCTAGTAAAAGGAAAATCCGTCGACTTTATAAGTCGTGAGG**GTTCAAGTCCCT  
CTATCCCC**

532 bp amplikon

A WBR11/WBR13 nem tud sokszorozni, hiszen a primer pár közül csak az egyiknek van meg a kötődési helye.

### **Búza (*Triticum aestivum*) P1/P2 primer párral nyert amplikon szekvenciája**

ACCESSION NUMBER: **X07747**

1827 bp

DEFINITION: DNA Wheat gene for low molecular weight glutenin

(Pitts et al., 1988)

TGCTCTGTAGGCGTCAGTTCATCTTATCATCTTAGAGGAAAATACAAAGTTAGTTTTAT  
AAAAAGCAACCGAGTCTAGAAGAACCCTCCACACGCAAGACTTCAATAATCGAGCATA  
TCTTAACAGCCCACACACGATTGCAAACCTTAGTCCTACACAAGCTTTGCCTTTCTTGTTT  
ACGGCTGACAACCTATAACAAGGTTCCAAACTCGGTTGCAAAAAGTGATACTATCCTGAT  
AAGTGCGTGACATGTAAAGTTAATAAGGTGAGTCATATGTACCAAACATCGAGGTTTC  
TGTACTTTGTGTATGATCATATGCACAACCTAAAAAGCAACTTTGATGATGAATCCAAAA  
GTACGCTTTTGTAGCTAGTGCAACCCAACACAATGTACCAAAAAAATTCATTTTCAGATG  
CATCCAAACAGAATTATTAAGCCGGTGCAAAGAAGGAAAAGAGGTGGTGTCCCGGC  
AACTATAAATAGGCATGAAGTATAAAGATCATCACAAGTACAAGCATCAAAGCCAAG  
CAACACTAGTTAACACCAATCCACAATGAAGACCTTCCTCGTCTTTGCCCTCCTCGCTC  
TTGCGGCGGCAAGTGCCGTTGCGCAAATTTACAGCAACAACAAGCACCGCCATTTTC  
GCAGCAACAACAACCACCATTTTCACAGCAACAACAACCACCATTTTCGCAGCAACA  
CAATCACCATTTTCGCAACAACAACAACAACCACCATTTGCGCAGCAACAACAACCAC  
CGTTTTACACAACAACCACCAATTTACAGCAGCAACAACCACCATTTTCACAGCAACA  
ACAACCACAATTTTCACAGCAACAACAACCACCATATTCGCAGCAACAACAGCCACCA  
TATTCGCAGCAACAACAACCACCATTTTCGCAGCAACAACAACCACCATTTTCGCAGC  
ACAACAACAACCACCATTTACACAGCAGCAGCAGCAGCAACAACAACAACAACCAT  
TTACACAGCAACAGCAACCACCGTTTTTACAACAGCCACCAATTTACAGCAGCAACA  
ACCACCATTTTTGCAGCAACAACGACCACCATTTTCACGGCAACAACAATAACAGTT  
ATTCATCCATCTGTTTTGCAACAGCTAAACCCATGCAAGGTATTCCTCCAACAGCAGTG  
CATCCCTGTGGCAATGCAGCGATGTCTTGCTAGGTCACAAATGTTGCAGCAGAGCATT  
GCCATGTGATGCAGCAACAATGTTGCCAGCAGTTGCGGCAAATCCCCGAGCAA**TCCCG  
CCATGAGTCAATCC**GTGCTATCATCTACTCTATCATCCTGCAGCAGCAGCAGCAGCAA  
CAACAACAACAACAACAACAACAGGGTCAAGTATCATCCAATATCAGCAACAACA  
CCCCAACAGTTGG**GGCCAATGTGTCTCCCA**CCCCTACAGCAGTTGCAGCAGCAACTC  
GGCAACAACCTCAACAACAACAATTGGCACACCAGATAGCTCAGCTTGAGGTGATGA  
CTTCCATTGCACTCCGTACCCTGCCAACAATGTGCAATGTCAATGTGCCGTTGTACGAA  
ACCACCACTAGTGTGCCATTAGGCGTTGGCATCGGAGTTGGTGTCTACTGATAAGAAA  
AGATCTCTAGTAATATATAGTTGGATCACCGTTGTTAGTCGATGGATATGTCGATGTA  
GCGGTGACAAATAAAGTGTACACAACGTCATGTGTGACCCGCTCAAACCTAGTTGTTT  
AAATTCTGAAATAAATAACAATAAAGGTGTATTAAGAAAATGTTTCATATCGGCATTG  
TGTGGATGTCGATCTGATTGCCAT

150 bp amplikon

**Búza (*Triticum aestivum*) TR01/TR02 primer párral nyert amplikon szekvenciája**

ACCESSION NUMBER: **X07841** 4642 bp DNA

DEFINITION: Wheat rDNA 25S-18S intergenic region EcoRI-BamHI fragment  
(Barker et al., 1988)

COMMENT: Within the 25S-18S rDNA intergenic spacer 4 repeat families are present. Family A consists of 12 direct repeats of ca. 135 bp, family B of 3 direct repeats of ca. 150 bp, family C of 2 direct repeats of ca. 173 bp and family D of 2 repeats of 30 bp lengths.

AGCAGAATTCACCAAGTGTGGATTGTTACCCACCAATAGGGAACGTGAGCTGGGTT  
TAGACCGTCGTGAGACAGGTTAGTTTTACCCTACTGATGACAGTGTGCGGATAGTAATT  
CAACCTAGTACGAGAGGAACCGTTGATTCACACAATTGGTCATCGCGCTTGGTTGAAA  
AGCCAGTGGCGCGAAGCACCGTGTGCCGGATTATGACTGAACGCCTCTAAGTCAGAAT  
CCAAGCTAGCATGCGACGCCTGCGCCC GCCCGCCCCGACCCACGTTAGGGGCGCT  
TGCGCAAGGGCCCGTGCCATTGGCTAAGCCGGTCCGGCCGAAGTGCCGCGGCCGGCCG  
CCTCGAAGCTCCCTTCCCAACGGGCGGTGGGCTGAATCCTTTGCAGACGACTTAAATAC  
GCGACGGGGCATTGTAAGTGGCAGAGTGGCCTTGCTGCCACGATCCACTGAGATCCAG  
CCCCATGTCGCACGGATTCGTCCCTCCCCACAACCTTTCCTTCACCAAGTAAGGTTTCGA  
AGATGCCATCAAAATCTGCACCGCAAAATCATGAGGACTAGAAATGGCTAAGTCCCTT  
GTAAGACATACCCTTGGACCCAATAAGGCCAGTGGAAACAACACTCAAACTATATGT  
GCCGAATGCAAAAGATACTTGGCCGATTCATGCGGATGCCGTCGTCAGAGGCTACACT  
GCTAAGTCATGGTCAAGGCAAATGGTATAGTCCCTTATATGACATACACAATCACTCA  
ATAAGGCCAGTGACGAGCACACTCAAAAGTATATGTGCCAAGTGAACAAGATACTTGA  
CCGATTCATTCGGATGCCTTCATCAGGCTAAACGGCTATGTCATGGACAAGACAAAAT  
GGTAAAGTCCCTTGAATGAAATACGTAATCACTCGATAAGGCCAGTCGCGAGCACAGT  
CAAACTATTTGAGGCAAGTGACCAAGATACTTCAGCGATTCATGTGTGCAACTCATC  
ACAAAGACACTTACACGGACCCATGAACGGGCTGTACAGGGACACGGGAAAGAAGTG  
CTTGACATACTTCATGGACGGATGTGGACGCGCCCCATTGATCACCAGGCAAAAACAC  
TTAAAGGGAGCCGT**GAACGGGCTGTACGAGGACACGGGA**AAAAACTGGCCGACCGC  
**CGTCGTGGACGGAAGTTGACGCGCGCCATGGAAAACCGGGCAAAACCACGTACGTGG**  
**CACACGCCGC**GTAGACGGACCCTTACACGGAGCCGTGAACGGGCTGTACGTGGACAC  
GGGAAAAAACTGGCCGACGGCCGTCGTGGACGGAAGTTGACGCGCGCCATGGAAAAC  
TGGGCAAAACCACGTACGTGGCACACGCCGCGTACACGGACCCTTACACGGACCCGTG  
AACGGGCTGTACGTGGACACGGGAAAAAACTGGCGAACGGCCGTCCTGGACGGAAGT  
GGACGCGCGCCATGGAAAACTAGGCAAAACCACGTACGTGGCACACGCCGCGTACAC  
GGCCCCTTACACGGACCCGTGAACGGGCTGTACGTGGACACAGGAAAAAAGTGCCCG  
ACGGCCGTCGTGGACGGAAGTTGACGCGCGCCATGGAAAACTGGGCAAAACCACGTA  
CGTGGCACACGCCGCGTACACGGCCCCCTTACACGGACCCGTGAACGGGCTGTACGTGG  
ACACGGGAAAAAAGTGCCCGACGGCCGTCATGGACGGAAGTTGACGCGCGCCATGGA  
AAACTGGGCAAAACCACGTACGTGGCACACGCCGCGTACACGGACCCTTACACGGACC  
CGTGAACGGGCTGTACGTGGACACGGGAAAAAAGTGCCCGACGGCCGTCGTGGACGG  
AAGTTGACGCGCGCCATGGAAAACTGGGCAAAACCACGTACGTGGCACACGCCGCGT  
ACACGGACCCTTACACGGAGCCGTGAACGGGCTGTACGTGGACACGGGAAAAAAGTG  
CCCGACGGCCGTCGTGGACGGAAGTTGACGCGCGCCATGGAAAACTGGGCAAAACCA  
CGTACGTGGCACACGCCGCGTACACGGACCCTTACACGGACCCCGTGAACGGGCTGTA  
CGTGGACACGGGAAAAAAGTGCCCGACGGCCGTCGTGGACGGAAGTTGACGCGCGCC  
ATGGAAAACTGGGCAAAACCACGTACGTGGCACACGCCGCGTACACGGACCCTTACAC  
GGACCCCGTGAACGGGCTGTACGTGGACACGGGAAAAAAGTGCCCGGCGGCCGTCGT  
GGACGGAAGTTGACGCGCGCCATGGAAAACTGGGCAAAACCACGTACGTGGCACACG  
CCGCGTACACGGACCCTTACACGGAGCCGTGAACGGGCTGTACGTGGACACGGGAAA  
AAAGTGCCCGACGGCCGTGCTGGACGGAAGTTGACGCGCGCCATGGAAAACTGGGCA  
AAACCACGTACGTGGCACACGCCGCGTACACGGACCCTTACACGGACCCCGTGAACGG

GCTGTACGTGGACACGGGAAAAAAGTGCCCGACGGCCGTCGTGGACGGAAGTTGACG  
CGCGCCATGGAAAACCTGGGCAAAACCACGTACGTGGCACACGCCGCGTACACGGACC  
CTTACACGGAGCCGTGAACGGGCTGTACGTGGACACGGGAAAAAAGTGCCCGACGGC  
CGTCGTGAACGGAAGTTGACGCGCGCCATGGAAAACCTGGGCAAAACCATGTACGTGGC  
ACACGCCGCGTACACGGACCCGTACACGGACCCGTGAACGGGTATGAGAGGTCCGGG  
AAAAAATGGCCCATACACCATGCGAACCCGGCTCAAAACCAGCTAATGATGGTCAACAA  
ACGGTGCCATGGCAGCGAAAACATGTCTCATGGCAAAAAAACGCTGCCACGGCAGCGT  
TTCAAAACAGTGTACCCCTCCTTCACAACTAAGGGCAGGGGTCCCAATGGGGGCTAA  
AACCCCTCGGGTATAGTAGGGAGGAGGGGTCTTCTGTTGGGCGTACGGAACACGGGT  
GATTTTTCTTAGGGAAAACACCCGTGTTACAGTACGCCCATCCTTTCCCAACGTTGCCT  
CGGATGTCCCGTCGTTATGCCATCACGAAGGTGTTGGCCCGGTCCCGTGTACGTCTCGT  
GAGAAATTCTGACCCAACAGCCGAAGGTAGCTCGGGAAACAGGAAAGTACCCCGTTG  
CGTACACGATCCGACCGACGGTAAACAGTCGCAACGATGTCCCTCCAATGTCGCCTCC  
GGAAAACGTTGCCCTCGGTGGCAACGTCATCGCTGTCCCGGTCCCTGTACGTCTCA  
AGTGAATTTCTAACCCAACAGCCGAATGCGGCTCGGGAAACAGGAAAGTAGCCCGTTT  
CGTGCACGATAAGACCGTCCGACAACGTTGCACCGATGTCCCGATAAAGTTGCCTTTG  
GAAAATCGTTGCATCCGTAGCTTTATTGCTGCTGGTGTGACACGCGTGATTTGGCCTTG  
CAGGACGCCTTCGTGCAAGTGATCCTCCCGTGCTATGCATGGGCGGAGGCTTGGTTGGT  
TTGACCGCTTGTGGCTACTAAGCGCATGAGTAGCTTTGGACCCGTGTCTGCCGGTAGA  
TCCCCCGTTGTAAGTGCAGGCGACTACCGGCGCCGTGTCCCGTCCCTCGTGTGGCTTCGA  
ATCGCTGGATTAATAGTGCTTGCCTGCTAGTACCCGACCTACGGGAAGTGGTGTCTCGG  
ATAATTGTTGCCTCGCGGCGGACGCCATTGGGTGTGCCGCTGCGGCCAAATAGCGCTT  
GCGGCGTTGCCTCGTGGGGCTGGCACATTACGTGCCCGTTGCTATCAAGGCAACCTCGC  
TCCCGCTTTTGGTCTCGGATGCTGCTCACGATAAAGGGTCTGTGGCCCTTTCGGTTGCCT  
CGACCCGACCCAAAGCTCTCCGAACCTGAGAACAACCGGAACAGGACTTGCCTCTACCT  
CTCCACAGTTACGTGGTAGGATACGCAACTCTCTGCGCCGATCCTCAAGGACGATGAG  
CTGTGCCGCTCAAGAGCGACAACCGGCCCGGCTGTTGCCTCTGAGTTTCCACGAAAGT  
GGAAGCGCAGAACGATGGCCGTGCTGGTAGTCACCAAGGACGTGCTACCTGGTTGATC  
CTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTGCAAGTATGAACCA  
ATTTGAACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGTTTGTGGTATGGTAC  
GTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCAACAAACCCCGACTT  
CTGGGAGGGGCGCATTATTAGATAAAAGGCTGACGCGGGCTCTGCTCGCTGATCCGA  
TGATTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCATTCAAAT  
TTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGGGGCCTACCATGGTGGTGACGGGTGAC  
GGAGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAG  
GAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAA  
TAACAATACCGGGCGCATTAGTGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTA  
ACGAGGATCC

109 bp amplikon



### **M3. Aktuális törvénymódosulások**

#### **40/2008. (IV. 3.) FVM-SZMM együttes rendelet az élelmiszerek jelöléséről szóló 19/2004. (II. 26.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet módosításáról**

Az élelmiszerekről szóló 2003. évi LXXXII. törvény 20. §-a (3) bekezdésének *a*) pontjában foglalt felhatalmazás alapján - a gazdasági és közlekedési miniszterrel egyetértésben - a következőket rendeljük el:

1. § Az élelmiszerek jelöléséről szóló 19/2004. (II. 26.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet (a továbbiakban: R.) 19. §-ának (4) bekezdése a következő *k*) ponttal egészül ki:

*[Ez a rendelet a következő uniós jogi aktusoknak való megfelelést szolgálja:]*

"*k*) a Bizottság 2007/68/EK irányelve (2007. november 27.) bizonyos élelmiszer összetevők tekintetében a 2000/13/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv IIIa. mellékletének módosításáról"

2. § Az R. 4. számú melléklete helyébe e rendelet *melléklete* lép.

3. § (1) Ez a rendelet a kihirdetése napján lép hatályba azzal, hogy rendelkezéseit 2007. november 26.-tól kell alkalmazni. E rendelet hatálybalépésekor folyamatban lévő eljárásokat - ha az eljárás tárgya kizárólag a 2007. november 25-ig kivételnek minősült allergének jelölésének hiánya - meg kell szüntetni.

(2) E rendelet hatálybalépésével egyidejűleg az R. 19. §-a (4) bekezdésének *h*) és *i*) pontja hatályát veszti.

(3) E rendelet 2. §-ával módosított, az R. 4. számú mellékletének előírásaiból eredő új jelölési rendelkezéseknek nem megfelelő jelölésű termékek 2009. május 31.-ig előállíthatóak, és az addig előállított termékek 2009. május 31-ét követően is forgalomba hozhatóak.

4. § Ez a rendelet a bizonyos élelmiszer összetevők tekintetében a 2000/13/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv IIIa. mellékletének módosításáról szóló, 2007. november 27-i 2007/68/EK bizottsági irányelvnek való megfelelést szolgálja.

#### **Melléklet a 40/2008. (IV. 3.) FVM-SZMM együttes rendelethez**

"4. számú melléklet a 19/2004. (II. 26.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelethez

#### ***Allergén összetevők***

*Azon anyagok listája, amelyeket a kivételektől eltekintve jelölni kell, amikor hivatkozás történik a 4. számú mellékletre*

1. Glutént tartalmazó gabona (búza, rozs, árpa, zab, tönköly, kamut-búza vagy ezek hibrid változatai) és azokból készült termékek, kivéve
  - a) búzából készült glükózsirup, beleértve a dextrózt is (\*),
  - b) búzából készült maltodextrin (\*),
  - c) árpából készült glükózsirup,
  - d) gabonafélék, amelyből készült párlatot vagy mezőgazdasági eredetű etilalkoholt szeszes italok vagy egyéb alkoholtartalmú italok készítéséhez használják.
2. Rákfélék és azokból készült termékek.
3. Tojás és abból készült termékek.
4. Halak és azokból készült termékek, kivéve
  - a) vitaminok vagy karotinoidok hordozójaként használt halenyv,
  - b) a sör és a bor derítéséhez használt halenyv és vizahólyag.
5. Földimogyoró és abból készült termékek.
6. Szójabab és abból készült termékek, kivéve
  - a) finomított szójabab olaj és zsír (\*),
  - b) szójababból származó természetes vegyes tokoferolok (E 306), természetes D-alfa tokoferol, természetes D-alfa tokoferol-acetát, természetes D-alfa tokoferol szukcinát,
  - c) a szójabab növényi olajából nyert fitoszterolok és fitoszterol észterek,
  - d) a szójabab növényi olajából nyert szterolokból előállított fitosztanol-észter.
7. Tej és abból készült termékek (beleértve a laktózt is), kivéve
  - a) tejsavó, amelyből készült párlatot vagy mezőgazdasági eredetű etilalkoholt szeszes italok vagy egyéb alkoholtartalmú italok készítéséhez használják,
  - b) laktit.
8. Diófélék, azaz mandula (*Amygdalus communis* L.), mogyoró (*Corylus avellana*), dió (*Juglans regia*), kesudió (*Anacardium occidentale*), pekándió [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], brazil dió (*Bertholletia excelsa*), pisztácia (*Pistacia vera*), makadámia és queenslandi dió (*Macadamia ternifolia*) és azokból készült termékek, kivéve
  - a) diófélék, amelyből készült párlatot vagy mezőgazdasági eredetű etilalkoholt szeszes italok vagy egyéb alkoholtartalmú italok készítéséhez használják.
9. Zeller és abból készült termékek.
10. Mustár és abból készült termékek.
11. Szezám-mag és abból készült termékek.
12. Kén-dioxid és SO<sub>2</sub>-ben kifejezett szulfitek 10 mg/kg, illetve 10 mg/liter koncentrációt meghaladó mennyiségben.
13. Csillagfürt és abból készült termékek.

14. Puhatestűek és abból készült termékek.

(\* ) és az abból készült termékek, amennyiben az előállítási eljárás során várhatóan nem növekszik az előállítás alapjául szolgáló termék EFSA által megállapított allergizálhatóság-szintje”

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Bánáti Diánának**, a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet főigazgatónőjének, aki lehetővé tette és támogatta Ph.D. tanulmányaimat.

Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Gelencsér Évának** a szakmai és emberi segítségéért.

A minták biztosítását köszönöm **Dr. Pauk Jánosnak**, **Dr. Bóna Lajosnak** (Gabonatermesztési Kutató Kht., Szeged), **Dr. Kovács T. Erzsébetnek** (Szegedi Tudományegyetem, Élelmiszeripari Főiskolai Kar), **Kiss Róbertnek** (Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt.) és **Léder Ferencnének** (KÉKI, Technológia osztály).

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Jánosi Annának**, **Dr. Szabó Erikának**, **Dr. Szamos Jenőnek**, **Ujhelyi Gabriellának**, **Takács Krisztinának**, **Zalán Zsoltnak** és a KÉKI Biológia Osztályán dolgozó többi kollégának a baráti légköréért, a szakmai és technikai segítségért.

Külön köszönöm családom, főleg gyermekeim megértő türelmét és ösztönzését a Ph.D. fokozat megszerzéséhez vezető rögzös út során.

