

# Soort-specifieke PCR detectie van mosterd species (*Sinapis alba*, *Brassica nigra*, *Brassica juncea*) als potentiële “verborgen” allergenen in voeding

Taverniers Isabel, Van Droogenbroeck Bart en De Loose Marc

ILVO, eenheid Technologie & Voeding, Burg. Van Gansberghelaan 115, 9820 Merelbeke

## Inleiding: mosterd species en allergene eiwitten

Mosterd behoort tot de familie van de *Brassicaceae* – goed voor meer dan 3200 species en 375 genera – en meer bepaald tot de genera *Sinapis* en *Brassica*. Witte mosterd (*Sinapis alba*), bruine of gele mosterd (*Brassica juncea*) en zwarte mosterd (*Brassica nigra*) worden wereldwijd gecultiveerd en gebruikt als bronnen van plantaardige olie, als smaakversterker of als groenbemester. Deze planten vinden hun oorsprong in de regio rondom de Middellandse Zee en het Nabije Oosten en zijn nu wereldwijd terug te vinden als gecultiveerde soorten en als onkruid. Mosterdzaad wordt verkocht als volledige of vermalen zaden, of verder verwerkt en/of vermengd in voedingsproducten. Gele mosterdzaadjes, beter bekend als “tafelmosterd”, bestaat meestal uit een mengsel van verschillende species. *Sinapis alba* vormt het meest gebruikte mosterd species in Europa, terwijl *Brassica juncea* meer gebruikt wordt in de V.S. en Japan (Monsalve et al., 1993).

Voedselallergieën vormen vooral in Westerse landen een groeiend probleem. Zeer lage dosissen van allergenen kunnen in gevoelige personen reeds een respons opwekken. In mosterd werden eiwitten met een allergisch potentieel teruggevonden. Door hun hitte-resistentie en beperkte enzymatische degradatie zijn ze in het productieproces moeilijk onschadelijk te maken. Ook het wijd verspreide gebruik van mosterdzaad in kruidenmengsels, maakt van deze species mogelijks gevaarlijke zgn. “verborgen allergenen”. Een verborgen allergeen is een allergeen dat niet vermeld staat op de verpakking, waarvan de consument niet weet dat het voedingsmiddel het allergeen bevat of waarvan de consument niet weet dat hij/zij er allergisch voor is. Een studie van 2007 over de prevalentie, de rol en de oorzaak van de aanwezigheid van verborgen allergenen in voedsel, onthulde dat deze aan de basis liggen van 22,4% van alle reacties op voedingsmiddelen (Anibarro et al., 2007). De manier waarop verborgen allergenen in het voedsel terecht komen is zeer gevarieerd. Vaak gaat het om onvoorzichtigheid van de consument of contaminatie van het voedsel in restaurants door bijvoorbeeld onvoldoende gereinigde grills. Contaminatie tijdens het productieproces van het voedingsmiddel behoort echter ook tot de mogelijkheden. Om die reden worden op vele verpakkingen waarschuwingen zoals “kan sporen bevatten van...” gedrukt.

Het voornaamste gekarakteriseerde allergene eiwit in mosterd is 2S albumine, een zaadopslag eiwit (Menendez-Arias et al., 1988). Het is een klein eiwit (12-15 kDa) opgebouwd uit 2 polypeptides die aan elkaar gelinkt zijn via disulfidebruggen. Het 2S albumine werd ook geïsoleerd uit rapenzaad, leguminosen zoals erwt en soja, walnoot, sesamzaad, en andere *Brassica*'s. In witte mosterd wordt 2S albumine aangeduid als *Sin a 1* en in bruine mosterd als *Bra j 1*. Karakterisering van deze proteïnen heeft algemene homologieën in epitopen aangeduid tussen de verschillende species onderling. Dit is niet verwonderlijk gezien de nauwe genetische verwantschappen tussen de species onderling. Bruine en zwarte mosterd zijn twee van de zes species binnen “U's triangle”, die de verwantschap weergeeft tussen wat men collectief de “gecultiveerde Brassica's” noemt (Fig. 1). De hoeken van U's triangle



worden gevormd door drie species met een eigen basisgenoom: *B. rapa* (A-genoom), *B. nigra* (B-genoom) en *B. oleracea* (C-genoom). De zijden bestaan uit drie amfiploïde species gevormd uit de basisgenomen: *B. juncea* (AB), *B. napus* (AC) en *B. carinata* (BC).

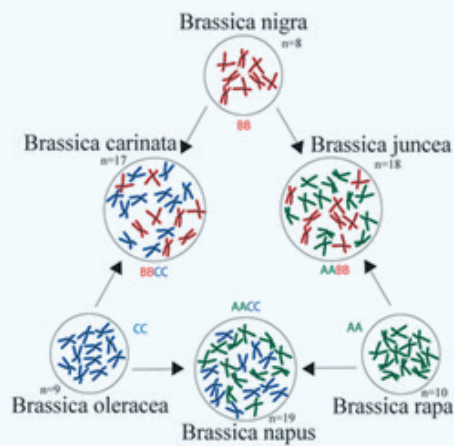


Fig. 1: De 'triangle of U' beschrijft de genetische verwantschap tussen de drie diploïde gewassen *B. oleracea*, *B. nigra* en *B. rapa* en hun allopolyploïde verwanten *B. carinata*, *B. juncea* en *B. napus*. Figuur overgenomen van <http://en.wikipedia.org>.

De 2S opslagalbumines *Sin a 1* en *Bra j 1* zijn dus structureel gelijkaardig en nauw verwant aan allergenen van andere soorten zoals koolzaad (*Brassica napus*). Beiden zijn hitte-resistent (EFSA, 2004). Van *Sin a 1* werd aangetoond dat het antigenische en allergenische determinanten deelt met het koolzaad hoofdallergeen *Bra n 1* (Monsalve et al. 1997). Andere allergene eiwitten die geïdentificeerd werden in mosterdzaad, zijn o.a. het 11S globuline *Sin a 2*, het lipide transfer eiwit *Sin a 3*, en de proflin eiwitten *Sin a 4* en *Bra n 8*.

## Probleemstelling en doelstelling

Niettegenstaande werd aangetoond dat personen met een allergie voor mosterd ook gevoelig kunnen zijn voor andere species binnen de Brassicaceae (Poikonen et al. 2008), is enkel mosterd onderhevig aan de verplichte etikettering volgens Europese Verordening 1169/2011. Gevoelige en specifieke methoden voor de detectie van allergene ingrediënten zijn nodig om lage concentraties aan allergenen in diverse matrices te kunnen opsporen. Verschillende producenten brengen kant-en-klare qPCR of ELISA kits op de markt voor de detectie en kwantificering van mosterd species. Bestaande detectiemethoden en -kits voor mosterd detecteren echter meestal de drie species samen en vertonen bovendien vaak kruisreactiviteit met andere species. Dit kan een probleem zijn wanneer een voedingsmiddel op basis van mosterd ook koolzaad of andere gerelateerde Brassica species bevat (intentioneel of als contaminant). Daarenboven kan het gebruik van mosterd als groenbemester een bron van contaminatie vormen bij de teelt en oogst van koolzaad. Tenslotte zorgen ook gemengde en opeenvolgende teelten van koolzaad en mosterd species voor mogelijke contaminatie van het eindproduct.

Een aantal ELISA en PCR methoden beschreven in de literatuur (Fuchs et al., 2010; Mustorp et al. 2008, Palle-Reisch et al. 2013) alsook kant-en-klare commercieel verkrijgbare kits werden, in een vergelijkende studie naar moleculaire detectiemethoden voor mosterd species, uitgetest op hun specificiteit. Daarnaast werden primers ontwikkeld voor de soort-specifieke amplificatie van de mosterd species via qPCR. In een poging om species van elkaar te onderscheiden op basis van één enkel nucleotide verschil in een specifieke doelsequentie (single nucleotide polymorphisms – SNPs) werden tevens primers ontworpen voor hoge resolutie smeltcurve analyse (HRMA of HRM-PCR).

## Experimentele setup

Voor het testen van bestaande, ELISA en qPCR, alsook nieuw ontwikkelde PCR methoden, werden in totaal 37 zaadmonsters gebruikt, bestaande uit *Brassica juncea*, *B. nigra* en *Sinapis alba*, maar ook *B. oleracea* (koolraap), *B. napus* (koolzaad), *Raphanus sativus* (raap) en *Arabidopsis thaliana* (zandraket) zaden. Deze waren afkomstig van ILVO, CER-Groupe en IPK in Gatersleben, Duitsland.

Vier commerciële ELISA- en 2 qPCR kits voor mosterd werden vooreerst uitgetest. Daarna werd een qPCR methode uit de literatuur (Fuchs et al., 2010) geëvalueerd op specificiteit voor *Sinapis alba* (witte mosterd). Tenslotte werden voor *B. nigra* en *B. juncea* nieuwe PCR methoden ontwikkeld en geëvalueerd.

## Resultaten & discussie

De vier geteste ELISA-kits gaven detectie van de 3 mosterd species. Targets van deze commerciële kits worden niet gespecificeerd, echter zijn hoogstwaarschijnlijk polyklonale antilichamen tegen 2S albumine (*Sin a 1*, *Bra j 1*, *Bna III napin*) of homologe allergene eiwitten. Ook de twee geteste commerciële qPCR-kits amplificeerden de 3 mosterd species, maar gaven ook aspecifieke amplificatie met o.a. *B. napus* en *A. thaliana*. Een voorbeeld van resultaten van een qPCR-test evaluatie wordt getoond in Fig. 2.

De *S. alba*-specifieke qPCR methode van Fuchs et al. (2010) blijkt inderdaad specifiek te zijn voor witte mosterd. Geen enkel ander species vertoonde amplificatie in een real-time PCR reactie met deze kit. De primers en TaqMan probe zijn gericht tegen een specifieke sequentie binnen het gen coderend voor het MADS-D eiwit.

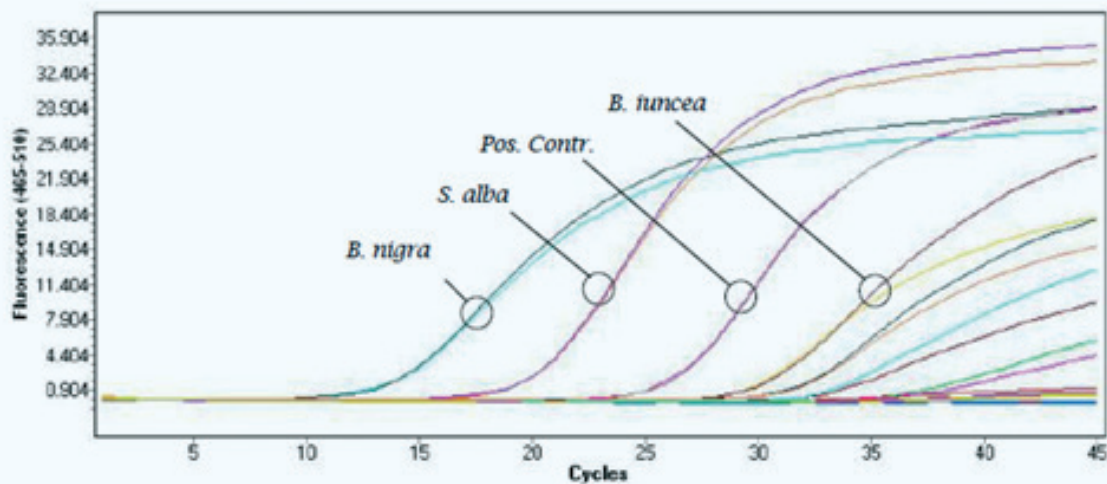


Fig. 2: qPCR amplificatieplots als voorbeeld van output van een commercieel verkrijgbare qPCR kant-en-klare kit voor detectie van mosterd. De opkomende plots tonen de aspecificiteit van de gebruikte primers.



De nieuw ontwikkelde qPCR analyses leverden twee potentieel bruikbare primersets op voor *B. nigra*-specifieke detectie. Evaluatie van primerpaar Bni COL-Fa/Ra1 jegens 37 accessies over 7 species van verschillende origine toonde volledige specificiteit voor zwarte mosterd doch 3 van 7 *Brassica nigra*-accessies gaven geen amplificatie. In een eerste evaluatie lijkt ook Bni COL-Fa/Ra2 specifiek voor zwarte mosterd. Deze primerparen amplificeren een 146 bp resp. 100 baseparen (bp) fragment van het constans-like eiwit-coderend gen. Resultaten van de geoptimaliseerde smeltpieken voor de set van 37 zaadmonsters, bekomen met primerpaar Bni COL-Fa/Ra1, worden getoond in Fig. 3.

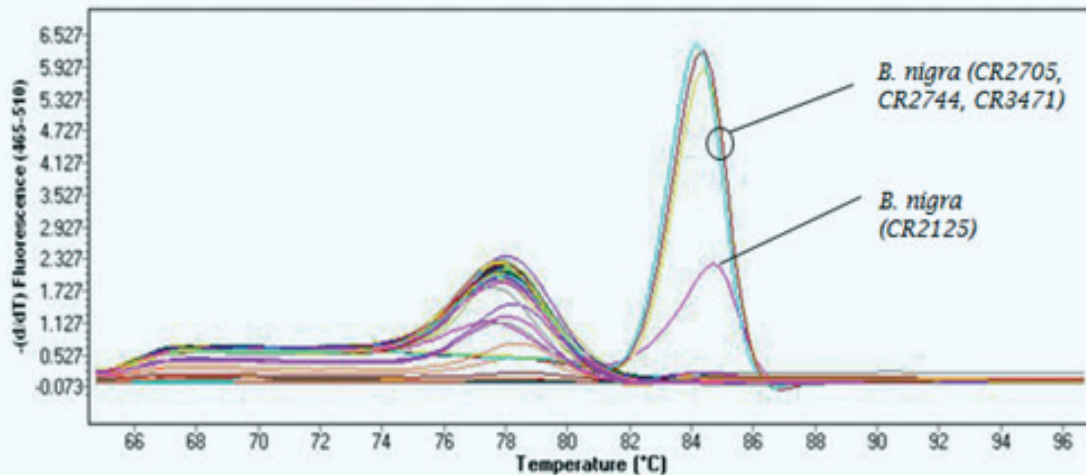


Fig. 3: Smeltcurves van de SYBR Green I qPCR assay met *B. nigra*-specifiek primerpaar Bni COL-Fa/Ra1 (146 bp). Een specifieke smeltpiek van 84°C wordt bekomen voor 4 van de 7 geteste *B. nigra* stalen. De aspecifieke smeltpiek bij 78°C is mogelijks toe te wijzen aan primer-dimeren.

Een verhoging van de specificiteit van primerset Bni COL-Fa/Ra1 wordt beoogd, mits het gebruiken van een Taq-man probe samen met de primers en/of aanpassing van de annealing temperatuur en primer concentraties en/of toepassing van de methode in hoge-resolutie smeltcurve PCR analyse (HRM-PCR).

Voor *B. juncea* werd het enige gekende, nl. het 2S zaadopslag eiwit, geselecteerd als target voor primerontwikkeling. Vermits de homologieën van dit gen met andere Brassica soorten heel groot zijn, werd geopteerd om een 10-tal primerparen rechtstreeks uit te testen via HRM-PCR. Het doel was een sterkere differentieerbaarheid van de species onderling te bekomen. HRM-PCR analyseresultaten algemeen gaven geen éénduidig soort-specifiek resultaat. Accessies van verschillende species werden vaak samengebundeld. Minstens één primerkoppel lijkt specifiek voor bruine mosterd (zie Fig. 4).

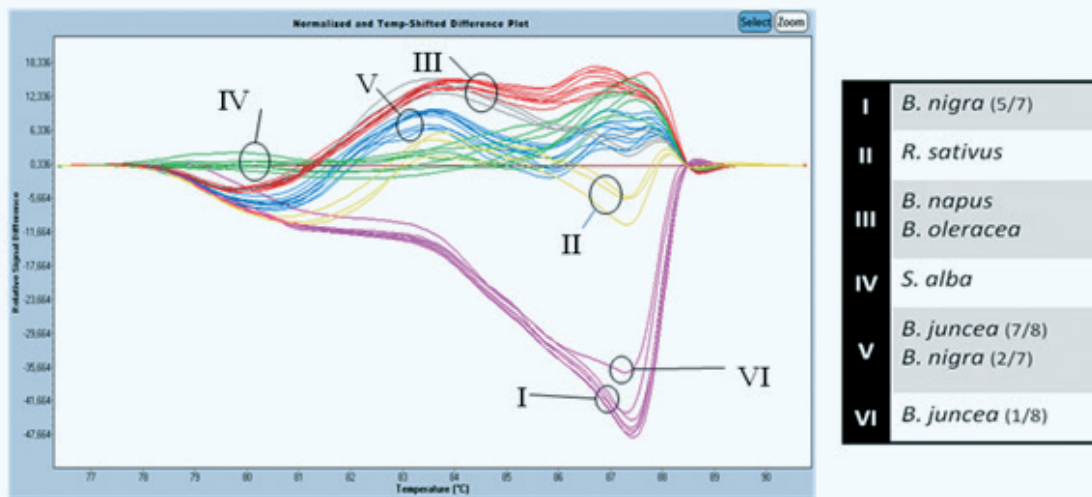


Fig. 4 Smeltcurves van de HRM-PCR assay met *B. juncea* specifiek primerkoppel Bju HRM-F1/R1 (203 bp). De verschillende groepen resultaten of 'klassen' die gedifferentieerd worden in HRM, worden rechts getoond.

Zeven van de 8 geteste *B. juncea* stalen worden nl. in dezelfde groep geklasseerd (groep V in Fig. 4), echter ook minstens 2 van de 7 *B. nigra* accessies vallen daaronder. De test blijkt specifiek te zijn voor *B. nigra* (5/7 in groep I), echter ook hier niet voor 100%. Herhalingen voor het nagaan van de reproduceerbaarheid en eventuele bijkomende optimalisatiestappen in HRM-PCR, zijn nodig om tot éénduidige specificiteit voor *B. juncea* versus *B. nigra* te kunnen komen. Daarnaast dient de zuiverheid van enkele accessies met dubbelzinnige resultaten te worden nagegaan.

## Referenties

Añibarro B., Seoane F. J., Múgica M. V. (2007) Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 17: 168-172

European Food Safety Authority (EFSA). (2004) Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes. *EFSA J.* 32: 120-128

Fuchs M., Cichna-Markl M., Hochegger R. (2010) Development and validation of a real-time PCR method for the detection of white mustard (*Sinapis alba*) in foods. *J. Agric. Food Chem.* 58 (21): 11193-11200

Menéndez-Arias L., Moneo I., Domínguez J., Rodríguez R. (1988) Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, *Sin a I*. *Eur. J. Biochem.* 177: 159-166

Monsalve R. I., González De La Peña M. A., López-Otín C., Fiandor A., Fernández C., Villalba M., Rodríguez R. (1997) Detection, isolation and complete amino acid sequence of an aeroallergenic protein from rapeseed flour. *Clin. Exp. Allergy* 27: 833-841



Monsalve R. I., Gonzalez De La Peña M. A., Menéndez-Arias L., Lopez-Otin C., Villalba M., Rodriguez R. (1993) Characterization of a new oriental-mustard (*Brassica juncea*) allergen, *Bra j I E*: detection of an allergenic epitope. *Biochem. J.* 293: 625-632

Mustorp S., Engdahl-Axelsson C., Svensson U., Holck A. (2008) Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real-time PCR. *Eur. Food Res. and Technol.* 226: 771–778

Palle-Reisch M., Wolny M., Cichna-Markl M., Hochegger R. (2013) Development and validation of a real-time PCR method for the simultaneous detection of black mustard (*Brassica nigra*) and brown mustard (*Brassica juncea*) in food. *Food Chem.* 138: 348-355

Poikonen S., Rancé F, Pjuumalainen T.J., Le Manach G., Reunala T., Turjanmaa K. (2008) Sensitization and allergy to turnip rape: a comparison between the Finnish and French children with atopic dermatitis. *Acta Paediatrica* 98: 310-315

isabel.taverniers@ilvo.vlaanderen.be