بررسی وجود پروتئین گلوتن با استفاده از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE در نان‌های فاقد گلوتن تهیه شده جهت بیماران سلیاک در شهر اصفهان

پرستو توسلی[1]، محمود یاحیّ[2]، نسرین دهقان‌نژاد[3]، سحر ترکی باغبادرانی[4]، محمدرضا خواجه[5]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بیماری سلیاک یا انتروپاتی حساس به گلوتن، بیماری مرتبط با سیستم ایمنی است که به صورت حساسیت دایم به گلیادین گندم یا سایر پرولامین‌های موجود در جو در افرادی که از نظر ژنتیکی مستعد هستند، تعریف می‌شود. گلوتن پروتئینی است که در گندم، جو و چاودار یافت می‌شود. این ماده باعث کش آمدن خمیر و ترد شدن بافت فراورده نهایی می‌گردد. گلوتن ترکیبی از دو زیر واحد گلیادین و گلوتنین می‌باشد که گلیادین محلول در الکل است و گلوتنین فقط در باز و اسیدهای رقیق محلول می‌باشد و بر اساس این ویژگی‌ها می‌توان گلیادین را جداسازی کرد. با تعیین گلوتن موجود در آرد نان فاقد گلوتن مخصوص به بیماران سلیاک با روشی مناسب و دقیق، می‌توان صحت ادعای تولید کنندگان این محصولات را تعیین نمود.

روش‌ها: نمونه مورد بررسی آرد نانوایی بود که از تعداد ۲۴ نمونه آردی که برچسب فاقد گلوتن داشت، تهیه و از الکل ایزوپروپانل به عنوان حلال الکلی استفاده شد. در مرحله بعد، طبق روش الکتروفورز SDS- PAGE (Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel) ترکیب استخراج شده پس از آماده‌سازی با بافر مخصوص و همچنین، نمونه گلوتن خالص به عنوان کنترل مثبت به ژل اکریل آمید تزریق گردید. پس از اتمام این مرحله، ژل توسط محلول رنگی کوماسی بلو رنگ‌آمیزی و سپس، با محلول رنگ‌بر شفاف‌سازی شد.

یافته‌ها: ژل حاصل از این آزمون در مقایسه با نمونه شاهد مثبت و همچنین، مارکر پروتئینی استاندارد، باند مشخصی در محدوده مربوط به گلیادین بر روی ژل قابل رویت نبود که دلالت بر فقدان گلوتن در نمونه آرد داشت.

نتیجه‌گیری: در تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE به دلیل حساسیت و دقت بالا، مقادیر بسیار کم گلوتن قابل سنجش می‌باشد. بنابراین، تشخیص این مقادیر در آرد و خودداری از مصرف آن در بیماران مبتلا به سلیاک از بروز تظاهرات بالینی جلوگیری خواهد کرد. از مزایای دیگر این تکنیک سرعت بالا و کم هزینه بودن آن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گلوتن، سلیاک، آرد بدون گلوتن، الکتروفورز SDS-PAGE

ارجاع: توسلی پرستو، یاحیّ محمود، دهقان‌نژاد نسرین، ترکی باغبادرانی سحر، خواجه محمدرضا. **بررسی وجود پروتئین گلوتن با استفاده از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE در نان‌های فاقد گلوتن تهیه شده جهت بیماران سلیاک در شهر اصفهان.** مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۳۹۵؛ ۱۲ (۳): ۳۶۸-۳۶۵

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۸/۲۴ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۶/۷

مقدمه

سلیاک یک اختلال خودایمنی روده باریک با زمینه ژنتیکی- ارثی است. در این بیماری گوارشی پرزهای روده باریک آسیب دیده و در جذب مواد اختلال به وجود می‌آید. در بیماران سلیاک، مصرف پروتئین گلوتن که در برخی از غلات مانند گندم، جو، چاودار و گاه جوی دوسر وجود دارد، باعث ایجاد علایم عدم تحمل می‌شود. واکنش این بیماران در درجه اول به گلیادین موجود در گلوتن است. سلیاک می‌تواند به صورت طیفی از تظاهرات بالینی ظهور کند. این تظاهرات در سلیاک متناسب با سن بیمار، طول دوره بیماری و شدت آن تغییر می‌کند (۱). در کشور ما اولین مطالعات غربالگری توسط مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام و معلوم شد که شیوع این بیماری در ایران بالا می‌باشد. در مطالعه‌ای شیوع این بیماری در کشور ما ۱ در ۷۰۰ می‌باشد که در حال حاضر در کشور ما حداقل ۱۰۰۰۰۰ نفر فرد مبتلا به بیماری سلیاک وجود دارد. تظاهرات بالینی سلیاک شامل یک طیف وسیع از بی‌علامتی یا علایم خفیف گوارشی یا عصبی تا سوء تغذیه شدید می‌باشد. در واقع، سلیاک یک بیماری سیستمیک است. برخی از مشخصات بالینی و آزمایشگاهی بیماران سلیاک عبارت از آنمی فقر آهن، آنمی کمبود فولات،

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- کارشناس، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- کارشناس ارشد، دانشگاه آزاداسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴- کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۵- کار آفرین صنایع غذایی، اصفهان، ایران
نویسنده مسؤول: محمود یاحیّ
Email: yahaii2003@yahoo.com

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2025-09-05]

بی‌اشتهایی، اسهال، سستی، تهوع و استفراغ، دردهای مکرر شکمی است (۲). بیماری سلیاک به صورت حساسیت دایمی به گلیادین موجود در گلوتن گندم یا سایر پرولامین‌های موجود در جو در افرادی که از نظر ژنتیکی مستعد هستند، تعریف می‌شود (۳). به این ترتیب، با توجه به مصرف بالای نان در رژیم غذایی، بیماری سلیاک و نحوه مرتفع کردن مشکلات مربوط به این بیماران بسیار حایز اهمیت است. هدف اصلی از پژوهش حاضر، ارایه و معرفی تکنیکی جدید، سریع و با قیمت مناسب جهت ارزیابی و تشخیص وجود پروتئین گلوتن در آردهای مورد استفاده جهت بیماران سلیاک بود. این آزمایش بر مبنای استخراج گلوتن توسط حلال مناسب و سپس، تعیین کیفی حضور این ترکیب در نمونه حاصل توسط روش الکتروفورز به شیوه SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel) انجام شد. نمونه آرد از نانوایی تولید کننده این نان‌ها در اصفهان (نانوایی خواجه) تهیه گردید.

روش‌ها

در مطالعه حاضر، از یک روش الکتروفورز خاص با عنوان الکتروفورز SDS-PAGE جهت جداسازی و تشخیص پروتئین گلوتن استفاده شد. تکنیک مذکور، نوعی روش الکتروفورز عمودی است که برای تشخیص وجود پروتئین توسط ژل آکریلامید به کار برده می‌شود که حساسیت بالایی دارد.

روش به کار رفته در این طرح پژوهشی برای سنجش وجود گلوتن در آرد فاقد گلوتن عرضه شده، بر اساس حلالیت و استخراج گلیادین و گلوتنین و سپس، استفاده از روش SDS-PAGE برای تعیین کیفی این ترکیبات در آرد است. این مطالعه بر مبنای استخراج و شناسایی گلوتن از آرد و نان ارایه شده با برچسب "فاقد گلوتن" در شهر اصفهان از نانوایی‌هایی که مجوز بهداشت دارد، انجام گرفته است. روش استخراج بر اساس حلالیت پرولامین‌ها در الکل‌ها بود. با توجه به الکلی بودن محلول مادر، گلیادین قابل جداسازی است. پروسه استخراج بدین ترتیب بود که ابتدا ۲۰۰ میلی‌گرم آرد گندم با برچسب فاقد گلوتن وزن شد و ۱ میلی‌لیترمحلول آبی ۵۰ درصد حجمی ایزوپروپانل به آن اضافه گردید. سپس، در درجه حرارت اتاق به مدت ۳۰ دقیقه مداوم مخلوط شد و در ۲۵۰۰ xg به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، مایع رویی به دست آمده از سانترفیوژ به عنوان اولین استخراج گلیادین در نظر گرفته شد. به دنبال آن، برای بار دوم و سوم همین کار با باقیمانده محلول آبکی ایزوپروپانل ۵۰ درصد حجمی تکرار شد و محصول آن به عنوان استخراج دوم و سوم گلیادین در نظر گرفته شد. در مرحله بعد، استخراج گلوتنین بدین طریق انجام گردید که باقیمانده محلول به دست آمده پس از استخراج گلیادین با ۱ میلی‌لیتر محلول آبکی ایزوپروپانل ۵۰ میلی‌مولار با pH = ۷/۵ شامل ۱/۴ -dithiothreitol (DTT) ۱ درصد وزنی/ حجمی مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و هم زده شد. پس از آن با ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاصل شده محتوی گلوتنین بود. عمل سانتریفیوژ با دورهای ارایه شده در مقاله Van den Broeck و همکاران انجام گرفت (۴). در نهایت، ۵ میلی‌لیتر طبق پروتکل استاندارد از محلول رویی محتوی گلیادین برداشته و در مجاورت Loading buffer به نسبت ۲/۱ در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت تا واکنش‌های لازم انجام شود. سپس، از این ترکیب به میزان ۲۰ میکرولیتر در چاهک‌های ژل اکریل آمید SDS-Page ۱۰ درصد تزریق گردید. یک نمونه حاوی گلوتن خالص به عنوان کنترل مثبت و همچنین، یک مارکر پروتئین حاوی طیف وسیعی از وزن‌های مولکولی پروتئین یعنی از ۱۰ تا ۲۶۰ کیلو دالتون (kDa) است به عنوان Ladder برای تشخیص نوع پروتئین در یک چاهک دیگر تزریق شد. سپس، به مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت تحت ولتاژ ۱۰۰ و جریان ۱۵ میلی‌آمپر در دستگاه الکتروفورز محتوی Running buffer قرار داده شد. بعد از این مرحله، ژل با استفاده از رنگ کوماسی بلو و یا نیترات نقره رنگ‌آمیزی و سپس، با محلول رنگ‌بر متشکل از متانول و اسید استیک گلاسیال شفاف‌سازی گردید، زیرا باندهای پروتئین در صورت وجود در محدوده حدود ۶۶ کیلو دالتون قابل مشاهده است. در صورت وجود گلوتن در نمونه آرد یا نان، باید باند گلیادین که در گلوتن موجود است، قابل رویت باشد. در غیر این صورت، گلوتن وجود ندارد. تعداد نمونه با توجه به رابطه $n = Z^2 p(1-p)/d^2$ حداقل ۲۴ مورد به دست آمد. در این معادله، z برابر با ضریب اطمینان یعنی ۹۵ درصد و P برآوردی از فراوانی نسبی وجود گلوتن در آرد بود که با توجه به این که حداقل درصد گلوتن باید ۲۷ درصد باشد، به طور نسبی درصد آن ۵ و d میزان دقت است که ۲ در نظر گرفته شد. از محدودیت‌های این تکنیک حجم کم نمونه و دسترسی محدود به منابع مناسب به شمار می‌آید. حساسیت این روش در صورت استفاده از رنگ کوماسی بلو برابر با ۰/۰۵ میکروگرم بود (۵).

یافته‌ها

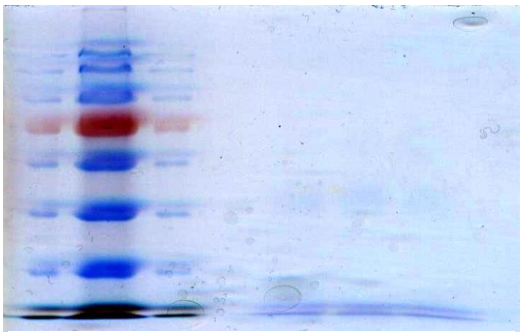
همان گونه که ذکر شد، بعد از اتمام مرحله الکتروفورز و رنگ‌آمیزی، باند اختصاصی گلیادین در صورت وجود باید قابل مشاهده باشد. در نتیجه پژوهش معلوم گردید که آردهای مورد استفاده جهت تهیه نان در نانوایی خواجه که مورد مصرف بیماران سلیاک قرار می‌گیرد، آلوده به گلوتن نبود. پس از انجام آزمایش مطابق با روش ذکر شده در نهایت، با انجام رنگ‌آمیزی ژل به دست آمده بایستی تشکیل باند مربوط به گلیادین به طور تقریبی ۶۶/۲ kDs قابل رویت باشد (۴) که با توجه تصویر ژل به دست آمده از الکتروفورز و مقایسه با Ladder استاندارد تزریق شده و نمونه شاهد مثبت که گلوتن خالص بود، باند مذکور مشاهده نشد که دلالت بر عدم وجود گلوتن در آرد نمونه داشت (شکل ۱). در واقع، بر اساس روش مورد استفاده در صورت دیده شدن باند در محدوده وزن مولکولی گلیادین در استخراج به دست آمده که فاقد گلوتنین بوده، این محصول آلوده به گلیادین و برای بیماران سلیاکی مضر می‌باشد که در این محصول چنین فرضیه‌ای محقق نشد.

بحث

مقاله حاضر سعی داشت که با استفاده از روش Van den Broeck و همکاران (۴) حضور گلوتن را در محصولات ارایه شده با برچسب فاقد گلوتن در شهر اصفهان بررسی نماید. این روش، بر اساس جداسازی گلوتنین و گلیادین در آرد نمونه مورد نظر بود. امروزه به دلیل اهمیت عدم وجود گلوتن حتی به میزان بسیار ناچیز در محصولات غلات برای بیماران سلیاک، پژوهش‌هایی در خصوص تشخیص آلودگی این محصولات با گلوتن انجام گرفته است. از جمله این پژوهش‌ها می‌توان به پژوهش Freedman و همکاران اشاره کرد که با

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2025-09-05]

استفاده از تکنیک ایمونوبایندینگ دات و حضور آنتی‌بادی میزان گلیادین موجود در آردهای فاقد گلوتن عرضه شده را اندازه‌گیری کردند (۶).



شکل ۱. عدم تشکیل باند در محدوده مربوط به گلیادین

دیگر تحقیق مربوط به Van den Broeck و همکاران در مرکز تحقیقات واخینگن می‌باشد که علاوه بر مقایسه چهار روش تشخیص و استخراج گلوتن، روش کروماتوگرافی را نیز معرفی کرده است (۴). همچنین، Olexova و همکاران با استفاده از PCR میزان گلوتن را در محصولات با عنوان "بدون گلوتن" اندازه‌گیری کردند و آن را روش مناسب و سریع ارزیابی نمودند (۷). دیگر پژوهش موجود به Albanell و همکاران مربوط می‌شود. این محققان از روش near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) برای اندازه‌گیری میزان گلوتن در آرد و خمیر استفاده کردند. در نتیجه، معلوم گردید که این روش می‌تواند به طور دقیق حضور گلوتن را در آرد و خمیر پیش‌بینی کند، اما به عنوان روش اندازه‌گیری گلوتن در محصولات فاقد گلوتن آلوده قابل اتکا نیست (۸). در تحقیق دیگری توسط Debnath و همکاران نیز از روش Polymerase chain reaction (PCR) به عنوان شناساگر گلوتنین در گلوتن گندم استفاده کردند (۹). علاوه بر روش‌های مذکور، می‌توان به پژوهش Valdes و همکاران اشاره کرد که تکنیک ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) به استخراج گلوتن پرداختند (۱۰).

در مطالعه حاضر یک تکنیک بیوشیمیایی کاربردی با دقت و صحت بالا برای تشخیص وجود گلوتن در آردهای عرضه شده با برچسب فاقد گلوتن ارایه و انجام گردید. روش پیشنهادی الکتروفورز SDS-PAGE به منظور تعیین کیفی از این ترکیب در آرد تاکنون در ایران برای تشخیص این پروتئین به کار برده نشده بود و برای اولین بار ارایه گردید. در مقایسه با روش‌های ذکر شده به خصوص روش ELISA، مزایایی چون هزینه پایین برای حصول نتیجه قابل ملاحظه بود. اگرچه به استناد مطالعات انجام شده روش ELISA از حساسیت بالایی برخوردار می‌باشد، اما در مقایسه با PCR این روش سرعت و نیز هزینه بسیار پایین‌تری خواهد داشت. این تکنیک کاربردی می‌تواند به عنوان یک سیاست اجرایی پیشگیرانه و یک آزمون غربالگری در راستای جلوگیری از عوارض بالینی ناشی از گلوتن در بیماران سلیاک به شمار آید. دقت بالای این تکنیک، امکان تشخیص مقادیر ناچیز گلوتن و جداسازی آردهای فاقد گلوتن را فراهم می‌کند و از بروز تظاهرات بالینی بیماری در مصرف کنندگان جلوگیری به عمل می‌آید.

مسأله حضور گلوتن در محصولات فاقد گلوتن و آلودگی آن‌ها به گلوتن می‌تواند برای پژوهش‌های بعدی مفید باشد. امید است که در آینده تحقیقات بیشتری در باب روش‌های استخراج گلوتن موجود در مواد اولیه گلوتنی با برچسب فاقد گلوتن انجام گیرد. از محدودیت‌های مطالعه هم می‌توان به حجم کم نمونه اشاره کرد و امکان دسترسی به تعداد متنوعی از آرد از نانوایی‌های سراسر کشور وجود نداشت.

تشکر و قدردانی

این طرح به شماره ۲۹۲۰۸۲ با حمایت معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات امنیت غذایی دانشکده تغذیه و علوم صنایع غذایی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان صورت پذیرفت. بدین وسیله، از زحمات و مساعدت کلیه مسؤولان و همکاران محترم تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Shakeri R, Malekzadeh R, Sachdev A, FahidAli A. Coeliac disease in developing countries: Middle East, India and North Africa. Govaresh 2005; 9(4): 242-7. [In Persian].
2. Malekzadeh R, Shakeri R. Celiac disease in Iran. Tehran Univ Med J 2008; 65(2): 1-11. [In Persian].
3. Biagi F, Corazza GR. Clinical features of coeliac disease. Dig Liver Dis 2002; 34(3): 225-8.
4. van den Broeck HC, America AH, Smulders MJ, Bosch D, Hamer RJ, Gilissen LJ, et al. A modified extraction protocol enables detection and quantification of celiac disease-related gluten proteins from wheat. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2009; 877(10): 975-82.
5. Zahid A, Jamil W, Begum R. Method development and validation of SDS-PAGE for quality control testing of pegylated interferon Alpha-2a. IOSR J Pharm Biol Sci 2014; 9(6): 32-6.
6. Freedman AR, Galfre G, Gal E, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Detection of wheat gliadin contamination of gluten-free foods by a monoclonal antibody dot immunobinding assay. Clin Chim Acta 1987; 166(2-3): 323-8.
7. Olexova L, Dovicovicova L, Svec M, Siekel P, Kuchta T. Detection of gluten-containing cereals in flours and gluten-free bakery products by polymerase chain reaction. Food Control 2006; 17(3): 234-7.
8. Albanell E, Minarro B, Carrasco N. Detection of low-level gluten content in flour and batter by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). J Cereal Sci 2012; 56(2): 490-5.
9. Debnath J, Martin A, Gowda LR. A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: Implications for gluten-free labelling. Food Res Int 2009; 42(7): 782-7.
10. Valdes I, Garcia E, Llorente M, Mendez E. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003; 15(5): 465-74.

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2025-09-05]

Journal of Health System Research
Vol. 12, No. 3, Autumn 2016
Received: 15.11.2015
Accepted: 28.08.2016

Verification of Gluten Presence Using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis Technique in Gluten-Free Bread Prepared for Patients with Celiac in Isfahan, Iran

Parastoo Tavasoli[1], Mahmood Yahaii[1], Nasrin Dehghannejad[2], Sahar Torki-Baghbaderani[3], Mohammadreza Khajeh[4]

Original Article

Abstract

Background: Celiac disease or gluten-sensitive enteropathy is an immune-related disease which is defined as a permanent sensitivity to wheat gliadin or barley prolamin in individuals who are genetically predisposed. Gluten is a protein found in wheat, barley and rye. Gliadin causes the stretching of the dough and crunchy texture of the final product. Gluten is composed of two subunits, gliadin and glutenin. Gliadin is alcohol-soluble and glutenin is only soluble in bases and diluted acids, and gliadin can be isolated based on these features. The assessment of gluten in gluten-free bread flour can verify the manufacturers' claims on these products.

Methods: A total of 24 samples of flour were collected and isopropanol was used as the alcoholic solvent. In the next step, through sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the composite extracted after preparation with buffer and pure gluten, as a positive control, were injected into the acrylamide gel. Upon completion of this step, the gel solution was stained using Coomassie Blue, and then, de-stained using bleach solution.

Findings: Compared with the positive control sample and the standard protein marker, gliadin bands were not visible within the obtained gel, indicating the absence of gluten in the flour samples.

Conclusion: The SDS-PAGE technique, due to its high sensitivity, can measure trace amounts of gluten. Therefore, the incidence of clinical symptoms in patients with celiac disease can be prevented through the determination of this amount in flour and the prohibition of its use. The other advantages of this technique are its high speed and low cost.

Keywords: Gluten, Celiac, Gluten-free bread, Electrophoresis SDS-PAGE

Citation: Tavasoli P, Yahaii M, Dehghannejad N, Torki-baghbaderani S, Khajeh M. **Verification of Gluten Presence Using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis Technique in Gluten-Free Bread Prepared for Patients with Celiac in Isfahan, Iran.** J Health Syst Res 2016; 12(3): 365-8.

1- Food Security Research Center AND School of Nutrition and Food Science, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3- Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Entrepreneur in the Food Industry, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mahmood Yahaii, Email: yahaii2003@yahoo.com

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2025-09-05]