

SVILUPPO DI METODOLOGIE DI PURIFICAZIONE ED ANALISI DI PROTEINE ALLERGENICHE

Partecipanti alla Ricerca

Asolo Dolce Sas, Asolo (TV)

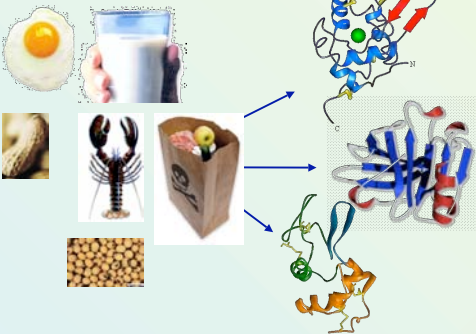
Chelab Srl, Resana (TV)

CRIBI Biotechnology Centre, Università di Padova

Laboratorio di Spettrometria di Massa del CNR, Camin (PD)

Obiettivo: Sviluppare metodi di analisi di proteine allergeniche contenute in alimenti complessi mediante metodi di spettrometria di massa, in alternativa ai metodi immunochimici (ELISA) attualmente in uso.

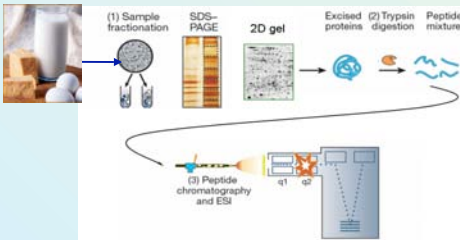
Fase 1: Isolamento e caratterizzazione di proteine allergeniche



ALLERGENI: La maggior parte degli allergeni degli alimenti sono proteine. Le caratteristiche delle proteine allergeniche sono

- Solubili in acqua
- Resistenti alla proteolisi
- Glicosilate
- PM 10-70 kDa
- Presenti in bassa quantità negli alimenti ed in miscele estremamente complesse.

Fase 2: Sviluppo di metodi MS e MS/MS di analisi di proteine allergeniche



Nota: Lo spettrometro di massa Micro-QToF (Micromass, UK) permette l'analisi sequenziale di frammenti proteici (peptidi) di circa 10-20 residui amminoacidici. In particolare, la sequenza di un peptide di 16 residui costituisce una informazione sufficiente per identificare in modo univoco una proteina di sequenza nota e catalogata nelle banche dati.

Le caratteristiche di questo procedimento sono correlabili al fatto che le 16 lettere del codice fiscale o di una carta di credito permettono di identificare un solo individuo nell'ambito della popolazione mondiale. Pertanto, la metodologia ESI-MS/MS potrà portare allo sviluppo di metodi di analisi di proteine molto innovativi ed estremamente specifici e sensibili, con vaste applicazioni in vari settori di ricerca pura ed applicata.

Motivazioni della Ricerca: L'industria alimentare attualmente tende a produrre alimenti sempre più sofisticati e contenenti ingredienti da diverse fonti alimentari non sempre elencati nell'etichetta. Questo implica per le persone allergiche, specialmente i bambini, il rischio di assumere allergeni "nascosti". Attualmente i metodi analitici in uso per la verifica dell'eventuale presenza di proteine allergeniche in alimenti sono test ELISA. I risultati di questi test però non sono sempre affidabili, in quanto i prodotti alimentari del commercio sono moltissimi e nel contempo l'industria utilizza un gran numero di ingredienti per la formulazione dei prodotti commerciali. Anche piccole quantità di proteine allergeniche possono essere sufficienti per scatenare una significativa reazione allergica, con sintomi che possono andare da semplici eruzioni cutanee fino alla morte dovuta a shock anafilattico. E' oltremodo urgente quindi utilizzare strumenti di analisi che permettano di rivelare anche tracce di queste sostanze, superando i limiti analitici dei test ELISA attualmente in uso.

Conclusioni e Prospettive: I notevoli sviluppi metodologici e strumentali delle tecniche MS permettono analisi particolarmente sensibili e precise della massa molecolare delle proteine e di loro frammenti ottenuti mediante loro digestione proteolitica con tripsina.

La collezione dei numeri di massa di questi frammenti permette, tramite opportune interrogazioni di banche dati di proteine, l'identificazione univoca e sicura di una proteina di cui sia nota la sequenza amminoacidica.

Questa tecnica, denominata *fingerprinting*, implica l'uso di un sistema HPLC per la separazione dei frammenti proteici, accoppiato ad uno strumento MS per la contemporanea analisi del peso molecolare dei frammenti separati.

Le prospettive quindi sono che l'approccio combinato di *fingerprinting*, separazione HPLC di peptidi, analisi MS ed interrogazione di banche dati (bioinformatica) permetterà lo sviluppo di nuovi e sensibili metodi di identificazione di proteine allergeniche contenute in alimenti complessi. Questi metodi MS offrono una alternativa ai metodi ELISA attualmente in uso.