

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos
recombinantes y de técnicas de PCR en tiempo real para la
detección de almendra y nuez de Brasil de alimentos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Silvia de la Cruz Ares

Directores

Teresa García Lacarra
M^a Isabel González Alonso

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**DESARROLLO DE TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS
CON ANTICUERPOS RECOMBINANTES Y DE
TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA
DETECCIÓN DE ALMENDRA Y NUEZ DE BRASIL EN
ALIMENTOS**

TESIS DOCTORAL

SILVIA DE LA CRUZ ARES

DIRECTORAS

TERESA GARCÍA LACARRA

ISABEL GONZÁLEZ ALONSO

ROSARIO MARTÍN DE SANTOS

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**DESARROLLO DE TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS
CON ANTICUERPOS RECOMBINANTES Y DE
TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA
DETECCIÓN DE ALMENDRA Y NUEZ DE BRASIL EN
ALIMENTOS**

TESIS DOCTORAL

SILVIA DE LA CRUZ ARES

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**DESARROLLO DE TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS
CON ANTICUERPOS RECOMBINANTES Y DE
TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA
DETECCIÓN DE ALMENDRA Y NUEZ DE BRASIL EN
ALIMENTOS**

TESIS DOCTORAL

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de
"Doctorado Internacional", presenta la Licenciada
Silvia de la Cruz Ares

Madrid, 2016



Departamento de Nutrición, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91-394 3749. Fax: 91-394 3743

TERESA GARCÍA LACARRA (Profesora Titular de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos), M^a ISABEL GONZÁLEZ ALONSO (Profesora Titular de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos) y M^a ROSARIO MARTÍN DE SANTOS (Catedrática de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos),

CERTIFICAN:

Que, la Tesis Doctoral titulada **“Desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos recombinantes y de técnicas de PCR en tiempo real para la detección de almendra y nuez de Brasil en alimentos”**, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria y en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Dña. Silvia de la Cruz Ares, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UCM, bajo la dirección conjunta de las que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la UCM con mención honorífica de “Doctorado Internacional”.

Y, para que surta los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid a cuatro de octubre de dos mil dieciseis.

Las Directoras de la Tesis Doctoral,

Teresa García Lacarra

Isabel González Alonso

Rosario Martín de Santos

深海に生きる魚族の
ように自らが燃えなければ
何処にも光はない

大島 渚

*Just like the fish that dwell in the abyss, we
cannot find the light until we ourselves shine*

Nagisa Ōshima

Este trabajo ha sido financiado por:

Ministerio de Economía y Competitividad, España, mediante la concesión del Proyecto de Investigación AGL2013-48018-R.

Comunidad de Madrid, España, mediante la concesión del Proyecto de Investigación S2013/ABI-2747.

Ministerio de Ciencia e Innovación, España, mediante la concesión del Proyecto de Investigación AGL2010-15279.

Comunidad de Madrid, España, mediante la concesión del Proyecto de Investigación S2009/AGR-1489.

Ministerio de Ciencia e Innovación, España, mediante la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI), disfrutada desde el 1 de agosto de 2011 al 30 de noviembre de 2011 (BES-2011-043634).

Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, España, mediante la concesión de una Beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU), disfrutada desde el 1 de diciembre de 2011 hasta el 31 de julio de 2015 (AP2010-0028).

Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, España, mediante la concesión de Ayuda para Estancias Breves en el Extranjero, dentro del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad, realizada entre el 1 de septiembre de 2014 y el 30 de noviembre de 2014, en el Departamento de *Nutritional Sciences, School of Biosciences, University of Nottingham*, Reino Unido.

La realización de este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo de mis directoras de Tesis, Teresa García Lacarra, Isabel González Alonso y Rosario Martín de Santos, quienes me brindaron la oportunidad de formar parte de un gran grupo de investigación. Gracias por compartir vuestro conocimiento científico conmigo, por enseñarme a aceptar los fracasos y a disfrutar de los éxitos. Por vuestra dedicación, ayuda y afecto, mi más sincero agradecimiento.

Del mismo modo, quisiera agradecer al resto de miembros del Departamento la ayuda prestada durante estos años. A Juan Miguel, María, Carmen, Luis, Paloma y Ana: gracias por haberme permitido usar vuestros equipos cuando los he necesitado, y perdonadme el haber abusado tanto de vuestro tiempo. Gracias en especial a Pablo E. Hernández Cruza, por ser ejemplo de una verdadera pasión por la Ciencia.

Muchas gracias a todos mis compañeros: A María e Irene, quienes terminaban esta etapa al tiempo que yo la empezaba; a Miguel Ángel y Nicolette, por dedicarme vuestro preciado tiempo a enseñarme a desenvolverme en el laboratorio; a Inés, por estar siempre dispuesta a echarme una mano, y por todo el trabajo que me ha ayudado a sacar adelante; a Raquel y Aina, con quienes me tocó desempeñar el papel que antes otros hicieron conmigo: espero haber estado a la altura; a Samuel, Carolina y Satyabrata. Gracias a Alicia y Diego, al "Grupo de Juan Miguel": Esther, Irene, Virginia, Susana, Nivia, Marta, Laura, Javi y Rebeca, y a "punto Lab": Cristina, Loreto, Juan, Juanjo, Estefanía, Carlos y Sara. Gracias por los cafés, las conversaciones animadas a la hora de comer, las tardes de viernes en el Lagar, y todos los buenos recuerdos que me llevo (aunque algunos sean en una furgoneta camino al matadero). ¡Y gracias por los probióticos! Estefanía, Carlinhos y Sara, habéis sido mi gran apoyo durante estos años. Gracias a vosotros nunca me he sentido sola en esta ciudad tan inhóspita. Sois ge –wait for it- niales.

I would also like to thank Marcos Alcocer for accepting me in his research laboratory and for supervising my research work during my stay. Thanks to lab technicians, PhD students and postdoc researchers for their help, especially to Nuzul and Summer, for their affection and for making my stay more enjoyable. You made Saturday the best day of the week.

A Margarita Menéndez, del Instituto de Química Física "Rocasolano" (CSIC), quien me permitió trabajar en su laboratorio para que una parte de este trabajo saliera adelante. Gracias también por la valoración crítica de los resultados obtenidos.

No quisiera olvidarme de Andrés Muñoz Serrano y Ángeles Alonso Moraga, de la Universidad de Córdoba, con quienes empecé en este apasionante mundo de la Ciencia, y quienes me animaron a proseguir con mis estudios de postgrado. He conseguido llegar hasta aquí también gracias a vosotros.

A mis amigos: Iván, tus conjuros resultaron ser de mucha utilidad a la hora de abrir las puertas que custodian los inmensos tomos de sabiduría ancestral: *May your beard never grow thin*. A Angie, Sagrario y Soraya, por vuestro apoyo incondicional. Me habéis instilado valor

cuando este escaseaba, y me habéis enseñado a no dejar que las adversidades me desvíen de la meta. Esta aventura ha terminado: *Mischief managed!* Ahora, a por la siguiente.

Gracias a mi familia, por haberme dado la fuerza necesaria para acabar esta tesis. En especial a mis padres y mi hermano. Todo este esfuerzo ha sido compartido con ellos.

Y a ti, por estar siempre a mi lado, gracias infinitas.

A todos, **GRACIAS.**

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 7 |
| CAPÍTULO 1 | |
| EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR | 13 |
| CAPÍTULO 2 | |
| INTRODUCCIÓN | 19 |
| 2.1. REACCIONES ADVERSAS A LOS ALIMENTOS | 21 |
| 2.1.1. Alergia alimentaria | 22 |
| 2.1.2. Alergia a los frutos de cáscara | 23 |
| 2.1.3. Alergia alimentaria mediada por IgE (Hipersensibilidad tipo I)..... | 23 |
| 2.1.4. Prevalencia de la alergia alimentaria..... | 24 |
| 2.1.5. Dosis umbral | 26 |
| 2.1.6. Información alimentaria facilitada al consumidor..... | 26 |
| 2.1.7. Planes de control de alérgenos | 27 |
| 2.2. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS EN ALIMENTOS..... | 28 |
| 2.2.1. Técnicas basadas en la detección de proteínas | 29 |
| 2.2.1.1. Inmunoensayos | 29 |
| i) ELISA | 30 |
| ii) Dispositivos de flujo lateral (DFL)..... | 33 |
| 2.2.1.2. Biosensores de proteínas..... | 34 |
| i) Biosensores ópticos..... | 34 |
| ii) Biosensores electroquímicos | 35 |
| iii) Biosensores piezoeléctricos (electromecánicos)..... | 36 |
| 2.2.1.3. Espectrometría de masas | 37 |
| 2.2.2. Técnicas basadas en la detección de ADN..... | 40 |
| 2.2.2.1. PCR y PCR en tiempo real..... | 41 |
| 2.2.2.2. MLPA | 46 |
| 2.2.2.3. Biosensores de ADN..... | 47 |
| 2.3. GENOTECAS DE FAGOS RECOMBINANTES..... | 47 |
| 2.3.1. Tecnología del <i>phage display</i> | 49 |
| 2.3.2. Fago filamentoso M13 | 49 |
| 2.3.3. Fagémido | 50 |
| 2.3.4. Genotecas de fragmentos de anticuerpos de tipo scFv..... | 51 |
| 2.3.5. <i>Biopanning</i> | 51 |
| 2.3.6. Genoteca Tomlinson I + J | 52 |
| 2.4. SISTEMAS EMPLEADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES | 54 |
| 2.4.1. Bacterias | 55 |
| 2.4.2. Levaduras..... | 56 |
| 2.4.3. Hongos filamentosos | 57 |
| 2.4.4. Células de insecto | 57 |
| 2.4.5. Células de mamífero..... | 57 |
| 2.4.6. Animales transgénicos..... | 58 |
| 2.4.7. Plantas transgénicas..... | 58 |
| 2.5. PRODUCCIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES | 58 |

CAPÍTULO 3/CHAPTER 3

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL CON SONDA TAQMAN PARA LA DETECCIÓN DE TRAZAS DE NUEZ DE BRASIL (*Bertholletia excelsa*) EN ALIMENTOS

TAQMAN REAL-TIME PCR ASSAY FOR DETECTION OF TRACES OF BRAZIL NUT (*Bertholletia excelsa*) IN FOOD PRODUCTS 63

INTRODUCTION..... 65

MATERIALS AND METHODS..... 66

RESULTS AND DISCUSSION..... 68

CONCLUSIONS..... 72

REFERENCES..... 72

CAPÍTULO 4/CHAPTER 4

DETECCIÓN SENSIBLE Y ESPECÍFICA DE ALMENDRA (*Prunus dulcis*) EN ALIMENTOS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

SENSITIVE AND SPECIFIC DETECTION OF ALMOND (*Prunus dulcis*) IN COMMERCIAL FOOD PRODUCTS BY REAL-TIME PCR 75

INTRODUCTION..... 77

MATERIALS AND METHODS..... 79

RESULTS AND DISCUSSION..... 81

CONCLUSIONS..... 84

REFERENCES..... 84

CAPÍTULO 5/CHAPTER 5

SELECCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE PHAGE DISPLAY Y SU APLICACIÓN EN LA DETECCIÓN DE NUEZ DE BRASIL (*Bertholletia excelsa*) EN ALIMENTOS

SELECTION OF RECOMBINANT ANTIBODIES BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY AND APPLICATION FOR DETECTION OF ALLERGENIC BRAZIL NUT (*Bertholletia excelsa*) IN PROCESSED FOODS 87

INTRODUCTION..... 89

MATERIALS AND METHODS..... 90

RESULTS AND DISCUSSION..... 93

REFERENCES..... 97

CAPÍTULO 6/CHAPTER 6

USO DE LA TECNOLOGÍA DE PHAGE DISPLAY PARA AISLAR ANTICUERPOS RECOMBINANTES DE TIPO scFv PARA DETECTAR ALÉRGENOS DE ALMENDRA EN ALIMENTOS

ISOLATION OF RECOMBINANT ANTIBODY FRAGMENTS (scFv) BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY FOR DETECTION OF ALMOND ALLERGENS IN FOOD PRODUCTS 99

INTRODUCTION..... 101

| | |
|-----------------------------|-----|
| MATERIALS AND METHODS..... | 102 |
| RESULTS AND DISCUSSION..... | 105 |
| REFERENCES..... | 108 |

CAPÍTULO 7/CHAPTER 7

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN DE FAGO-ANTICUERPOS RECOMBINANTES (scFv) ESPECÍFICOS OBTENIDOS FRENTE A EXTRACTOS PROTEICOS DE NUEZ DE BRASIL Y DE ALMENDRA

| | |
|--|-----|
| <i>IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE PROTEINS BOUND BY SPECIFIC PHAGE-DISPLAYED RECOMBINANT ANTIBODIES (scFv) OBTAINED AGAINST BRAZIL NUT AND ALMOND EXTRACTS</i> | 111 |
|--|-----|

| | |
|-----------------------------|-----|
| INTRODUCTION..... | 113 |
| MATERIALS AND METHODS..... | 114 |
| RESULTS AND DISCUSSION..... | 117 |
| REFERENCES..... | 125 |

CHAPTER 7: APPENDIX A

| | |
|-------------------------|-----|
| SUPPLEMENTARY DATA..... | 127 |
|-------------------------|-----|

CAPÍTULO 8/CHAPTER 8

PRODUCCIÓN DE scFv BIOTINILADOS *in vivo* ESPECÍFICOS FRENTE A PROTEÍNAS DE ALMENDRA (*Prunus dulcis*) EN *Pichia pastoris* RECOMBINANTE

| | |
|---|-----|
| <i>PRODUCTION OF in vivo BIOTINYLATED scFv SPECIFIC TO ALMOND (Prunus dulcis) PROTEINS BY RECOMBINANT Pichia pastoris</i> | 131 |
|---|-----|

| | |
|-----------------------------|-----|
| INTRODUCTION..... | 133 |
| MATERIALS AND METHODS..... | 134 |
| RESULTS AND DISCUSSION..... | 137 |
| REFERENCES..... | 140 |

CHAPTER 8: APPENDIX B

| | |
|-------------------------|-----|
| SUPPLEMENTARY DATA..... | 141 |
|-------------------------|-----|

CAPÍTULO 9

| | |
|----------------------------|-----|
| DISCUSIÓN INTEGRADORA..... | 149 |
|----------------------------|-----|

| | |
|---|-----|
| 9.1. DETECCIÓN DE NUEZ DE BRASIL (<i>Bertholletia excelsa</i>) Y ALMENDRA (<i>Prunus dulcis</i>) EN ALIMENTOS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL CON SONDAS DE HIDRÓLISIS..... | 152 |
| 9.2. SELECCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES (scFv) MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE PHAGE DISPLAY PARA LA DETECCIÓN DE NUEZ DE BRASIL Y DE ALMENDRA EN ALIMENTOS..... | 167 |
| 9.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS DIANAS MOLECULARES RECONOCIDAS POR LOS FAGO-ANTICUERPOS RECOMBINANTES AISLADOS FRENTE A EXTRACTOS DE NUEZ DE BRASIL Y DE ALMENDRA..... | 179 |
| 9.2. PRODUCCIÓN, EN LA LEVADURA METILOTRÓFICA <i>Pichia pastoris</i> , DE scFv BIOTINILADOS <i>in vivo</i> ESPECÍFICOS FRENTE A LAS PROTEÍNAS DE ALMENDRA..... | 185 |

CAPÍTULO 10/CHAPTER 10

CONCLUSIONES 195
CONCLUSIONS 197

CAPÍTULO 11

TRABAJO FUTURO 199

CAPÍTULO 12

BIBLIOGRAFIA..... 207

APÉNDICES

1. LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS..... 227
2. LISTADO DE TABLAS 230
3. LISTADO DE FIGURAS 232

RESUMEN

La exposición accidental de individuos sensibles a ingredientes alergénicos supone un importante problema de salud pública. En estos individuos, incluso pequeñas cantidades del alérgeno pueden desencadenar reacciones alérgicas severas. Para proteger a los consumidores, el Reglamento (UE) 1169/2011 proporciona una lista de ingredientes de declaración obligatoria en el etiquetado de los alimentos, entre los que se encuentran la nuez de Brasil y la almendra. Por lo tanto, para cumplir con la normativa de seguridad alimentaria, las industrias alimentarias y los proveedores deben identificar la presencia de alérgenos en sus productos.

Las técnicas analíticas para detectar frutos de cáscara en alimentos se basan en la detección de proteínas o de ADN. Hasta la fecha, los inmunoensayos disponibles para la detección de frutos secos alergénicos dependen de la disponibilidad de anticuerpos policlonales, con las desventajas que ello supone relacionadas con su disponibilidad limitada y la especificidad variable entre lotes. En lo que se refiere a los métodos genéticos, el desarrollo de técnicas de PCR para la detección de ciertos frutos de cáscara es aún incipiente.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, los principales objetivos de este trabajo de investigación han consistido en: el desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis para detectar nuez de Brasil (i) y almendra (ii) en alimentos; el uso de fragmentos de anticuerpos recombinantes expresados en la superficie de fagos como sondas de afinidad en ELISA para detectar nuez de Brasil (iii) y almendra (iv) en alimentos; la identificación y caracterización de las proteínas de nuez de Brasil y almendra reconocidas por los fago-anticuerpos aislados (v); la producción en *Pichia pastoris* de scFv biotinilados *in vivo* específicos frente a almendra (vi).

Para la consecución de estos objetivos se empleó la siguiente metodología: (1) diseño de cebadores y sondas para desarrollar y validar sistemas de PCR en tiempo real para la detección de ADN de nuez de Brasil y almendra; (2) cribado de genotecas comerciales de fagos recombinantes para seleccionar fago-anticuerpos con afinidad frente a las proteínas de nuez de Brasil y de almendra, caracterización de los mejores clones, y puesta a punto de una técnica de ELISA indirecto para detectar la presencia de proteínas de nuez de Brasil y de almendra en alimentos; (3) identificación y caracterización de las proteínas reconocidas por los fago-anticuerpos empleando técnicas electroforéticas, cromatográficas, inmunológicas y espectrométricas, análisis de velocidad de sedimentación y estudio del espectro dicróico; (4) construcción de vectores de expresión proteica adecuados para producir scFv biotinilados *in vivo* usando un único clon de *P. pastoris*, y multimerización de los scFv biotinilados para usarlos como sondas de afinidad en técnicas ELISA para detectar almendra en alimentos.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

(i) El sistema de PCR en tiempo real con cebadores y sonda diseñados en el gen de la albúmina 2S de la nuez de Brasil permitió la detección de ADN de nuez de Brasil hasta

2.5 mg kg⁻¹ cuando se analizaron mezclas de nuez de Brasil cruda y tostada en una matriz de harina de trigo. La técnica desarrollada demostró su idoneidad para el análisis de productos comerciales y, en la mayoría de las ocasiones, los resultados de PCR obtenidos estuvieron en consonancia con el etiquetado. Para descartar la presencia de inhibidores de la reacción, todos los experimentos se hicieron en paralelo con un control positivo de amplificación.

(ii) El sistema de PCR en tiempo real con cebadores y sonda diseñado en la región ITS1 de almendra permitió la detección de ADN de almendra hasta 0.1 mg kg⁻¹ cuando se analizaron mezclas de almendra cruda y tostada en una matriz de harina de trigo. El sistema desarrollado mostró su idoneidad para el análisis de productos comerciales, revelando la presencia de ADN de almendra en un 40 % de las muestras que no la declaraban en el etiquetado. Para verificar la ausencia de inhibidores de la reacción de PCR, las muestras se analizaron también con un control positivo de amplificación.

(iii) El fago-anticuerpo BE95 aislado tras el cribado de la genoteca Tomlinson I frente a un extracto proteico total de nuez de Brasil resultó ser incompleto por carecer de cadena pesada. Este fago-anticuerpo se utilizó como sonda de afinidad en ELISA, siendo capaz de detectar específicamente proteínas de nuez de Brasil con un límite de detección de 5000 mg kg⁻¹ cuando se analizaron mezclas de nuez de Brasil cruda y tratada térmicamente en una matriz de harina de trigo. La aplicabilidad del ensayo se demostró analizando 92 productos comerciales. Los resultados del ELISA indirecto empleando fago-anticuerpos se compararon con los obtenidos en el objetivo (i) y mostraron que, en general, el clon BE95 era capaz de detectar la presencia de nuez de Brasil en aquellos productos que la declaraban en el etiquetado, con la excepción de una barrita de cereales, posiblemente debido al menor límite de detección alcanzado por la técnica de ELISA.

(iv) Los fago-anticuerpos PD1F6 y PD2C9, aislados a partir de la genoteca Tomlinson I utilizando un extracto proteico total de almendra presentaron un scFv completo. Ambos fago-anticuerpos se emplearon como sondas de afinidad en ELISA, detectando específicamente proteínas de almendra. El límite de detección fue de 110-120 mg kg⁻¹ cuando se analizaron mezclas binarias de almendra cruda y tostada en una matriz de harina de trigo. La aplicabilidad del ensayo se demostró analizando 92 productos comerciales. Los resultados se compararon con los obtenidos con el sistema de PCR en tiempo real del objetivo (ii). Los fago-anticuerpos PD1F6 y PD2C9 detectaron la presencia de almendra en los productos que la declaraban en el etiquetado, con la excepción de las bebidas de almendra; posiblemente debido a la desnaturalización del epítipo tras el tratamiento de esterilización, que podría afectar a la capacidad del anticuerpo para detectar a su proteína diana. Las discrepancias observadas entre el ELISA y la técnica de PCR en tiempo real en muestras que declaraban contener trazas de frutos de cáscara o no los declaraban, se atribuyeron a las diferencias en sensibilidad entre ambas técnicas.

(v) El uso de técnicas electroforéticas, cromatográficas, inmunológicas y espectrométricas permitió la identificación de las proteínas diana reconocidas por los fago-anticuerpos como globulina 11S de nuez de Brasil (clon BE95), y globulina 11S de almendra (amandina) (clones PD1F6 y PD2C9). Los análisis de velocidad de sedimentación determinaron un coeficiente de sedimentación de 11.95S para la globulina 11S de la nuez de Brasil, y de 13.3S para la amandina. Los resultados del dicroísmo circular mostraron cambios en la elipticidad de la globulina 11S de nuez de Brasil purificada cuando la temperatura alcanzó 85 °C, mientras que la amandina mostró cambios cuando la temperatura alcanzó los 80 °C, perdiendo la estructura terciaria y cuaternaria en el intervalo de 75-97 °C. Los resultados obtenidos permiten explicar por qué los fago-anticuerpos seleccionados no reconocen a las proteínas diana tras hervir los extractos proteicos.

(vi) Las células de *P. pastoris* co-transformadas con dos vectores de expresión – uno expresando el scFv fusionado a un péptido aceptor de biotina, el otro expresando la enzima BirA– produjeron de manera eficaz fragmentos solubles biotinilados *in vivo* con la secuencia del scFv PD1F6. Tras la purificación y multimerización con un núcleo de avidina-peroxidasa, los scFv biotinilados *in vivo* conservaron la capacidad de detectar proteína de almendra con un límite de detección de 470 mg kg⁻¹ cuando se utilizaron como sondas de afinidad en ELISA.

Por lo tanto, puede concluirse que las técnicas genéticas desarrolladas en este trabajo proporcionan herramientas específicas y sensibles para detectar la presencia de nuez de Brasil y almendra en alimentos, contribuyendo al cumplimiento de la normativa europea en materia de etiquetado de los alimentos. Por otra parte, las genotecas de fagos recombinantes han demostrado ser una fuente adecuada de fago-anticuerpos específicos que pueden emplearse como sondas de afinidad en inmunoensayos, proporcionando una alternativa a los anticuerpos producidos en animales consecuente con la normativa sobre bienestar animal. Además, en este trabajo se ha conseguido por primera vez la obtención en *Pichia pastoris* de scFv biotinilados *in vivo*, estrategia que puede emplearse en el futuro para conseguir otras modificaciones funcionales para adaptar las sondas a diferentes plataformas analíticas.

ABSTRACT

The unintentional exposure of sensitive individuals to allergenic food ingredients represents a serious health problem. For those individuals, even small intakes of the allergen can trigger severe medical disorders. With the purpose of protecting consumers, Regulation (EU) 1169/2011 provides a list of mandatory particulars (including Brazil nuts and almonds) which must be indicated in the label of foodstuffs. Consequently, to accomplish with food safety laws, food industries and ingredient suppliers must seek out the presence of allergens in their products.

Analytical techniques to detect allergenic tree nuts in foodstuffs are usually based on the detection of proteins or DNA. Up to date, available immunoassays rely on the use of polyclonal antibodies, which show disadvantages such as limited availability and batch to batch variability in their specificity. Regarding genetic methods, the development of real-time PCR techniques for detection of some allergenic nuts is still incipient.

Considering all the above mentioned, the main goals of the present research work were the following: development of real-time PCR techniques with hydrolysis probes to detect Brazil nut (i) and almond (ii) in food products; use of recombinant antibody fragments displayed in phage particles as affinity probes in ELISA immunoassays aimed to detect Brazil nut (iii) and almond (iv) in processed foods; identification and characterization of the Brazil nut and almond proteins detected by the selected phage-displayed scFv antibodies (v); production of *in vivo* biotinylated scFv specific to almond proteins by recombinant *Pichia pastoris* (vi).

The methodology used to address those goals included: (1) design of species-specific primer pairs and probes to develop and validate real-time PCR methods to detect Brazil nut and almond DNA in foodstuffs; (2) screening of commercial libraries of recombinant phage-antibodies to select phage-displayed scFv with affinity towards Brazil nut and almond proteins. Characterization of best phage binders and implementation of an indirect phage-ELISA to detect Brazil nut and almond proteins in foodstuffs; (3) identification and characterization of scFv target proteins through electrophoretic, chromatographic, immunological and spectrometric techniques, ultracentrifugation analysis, and circular dichroism studies; (4) molecular engineering of *P. pastoris* to produce *in vivo* biotinylated scFv with a single clone, and multimerization of the biotinylated scFv to be used as an affinity probe in ELISA immunoassays to detect almond in foodstuffs.

The results obtained were the following:

(i) The Real-time PCR system developed with a primer pair and hydrolysis probe targeting 2S albumin gene of Brazil nut allowed detection of Brazil nut DNA down to 2.5 mg kg⁻¹ in experimental mixtures of raw or roasted Brazil nut in a wheat flour matrix. The method developed demonstrated its suitability for analysis of commercial food products. For most of the samples, real-time PCR results were in accordance with allergen declarations stated in the labels of the

foodstuffs. To discard the presence of PCR inhibitors in negative samples, all the experiments were run in parallel with a positive amplification control.

(ii) The Real-time PCR system developed with a primer pair and hydrolysis probe targeting the almond ITS1 region allowed detection of almond DNA down to 0.1 mg kg^{-1} in mixtures of raw or roasted almond in a wheat flour matrix. The method developed was suitable for analysis of commercial food products, and demonstrated the presence of almond DNA in 40 % of samples that did not declare to contain it. To verify the absence of PCR inhibitors, positive amplification control was run in parallel with all the experiments.

(iii) BE95 phage-scFv, isolated after screening the Tomlinson I library with a crude Brazil nut protein extract, consisted of an incomplete scFv, which lacked the VH chain. BE95 phage-antibody was used as an affinity probe in ELISA assays, being able to specifically detect Brazil nut proteins with a detection limit of 5000 mg kg^{-1} in mixtures of raw or roasted Brazil nut in a wheat flour matrix. Applicability of the assay was demonstrated by analysis of 92 commercial food products. ELISA results were compared to those obtained in objective (i), and showed that BE95 phage-antibody was able to detect Brazil nut in most products that declared it in the label. However, a cereal bar was negative in ELISA and positive in PCR. This result could be due to the lower sensitivity of the ELISA compared to the real-time PCR technique.

(iv) PD1F6 and PD2C9 phage-antibodies, isolated after screening the Tomlinson I library with a crude almond protein extract, displayed complete scFv. PD1F6 and PD2C9 phage-scFv were used as affinity probes in ELISA assays, being able to specifically detect almond proteins with a detection limit of $110\text{-}120 \text{ mg kg}^{-1}$ in mixtures of raw or roasted almond in a wheat flour matrix. Applicability of the assay was demonstrated by analysing 92 commercial food products. Compared to the real-time PCR results from objective (ii), PD1F6 and PD2C9 phage-scFv were able to detect almond in most of the products that declared it in the label. Nevertheless, almond beverages were negative in ELISA, possibly due to epitope denaturalization after sterilization procedure, which might hamper phage-antibody's ability to detect the target protein. Moreover, some of the samples that declared to contain traces of tree nuts or did not declare to contain tree nuts, but were positive for almond in the real-time PCR, were not detected by ELISA. This is probably due to the higher sensitivity of the real-time PCR technique.

(v) Electrophoretic, chromatographic, immunological and spectrometric techniques allowed identification of the Brazil nut and almond proteins targeted by the phage-antibodies. Brazil nut 11S globulin was recognized by BE95 phage-antibody, and almond 11S globulin (amandin) by PD1F6 and PD2C9 phage-antibodies. A sedimentation coefficient of 11.95S was established for Brazil nut 11S globulin, and 13.3S for almond 11S globulin, using ultracentrifugation analysis. Circular dichroism data showed changes in ellipticity of purified Brazil nut 11S globulin when temperature reached $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$, whereas amandin showed changes when

temperature reached 80 °C, losing tertiary and quaternary structure in the interval 75-97 °C. These results might explain loss of phage-scFv recognition after boiling protein samples.

(vi) *P. pastoris* co-transformed with two expression vectors –one expressing the scFv fused to a biotin accepting peptide, the other expressing BirA enzyme– efficiently produced *in vivo* biotinylated soluble fragments with the scFv sequence of PD1F6 phage-clone. After purification and multimerization with an avidin-HRP core, biotinylated scFv maintained the ability to detect almond protein down to 470 mg kg⁻¹ when used as affinity probes in ELISA.

According to the results obtained, it can be concluded that the genetic techniques developed in this work provide specific and sensitive tools to detect the presence of allergenic Brazil nut and almond in foods, thus allowing compliance with EU labelling regulations. Moreover, synthetic phage-scFv libraries demonstrated to be a reliable source of nut-specific phage-antibodies that could be employed as affinity probes in immunoassays, providing an alternative to antibodies raised in animals, therefore being consistent with the latest European policies on animal welfare. Furthermore, as far as we know, this is the first time that *Pichia pastoris* has been genetically modified to produce *in vivo* biotinylated scFv. This strategy can be used to produce other engineered antibodies to be used as affinity probes in different immunoassay platforms.

CAPÍTULO 1

EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

La legislación alimentaria reconoce a los consumidores el derecho a una elección informada respecto al origen y composición de los alimentos que consumen, del mismo modo que pretende evitar cualquier práctica que pueda inducir a engaño (Reglamento (CE) 178/ 2002). En línea con este propósito, el Reglamento (UE) 1169/2011, establece la obligatoriedad de mencionar en el etiquetado de los alimentos la presencia de cualquier ingrediente o coadyuvante tecnológico recogido en su Anexo II, que sea causante de reacciones alérgicas o intolerancias, que se emplee en la elaboración de alimentos, y que continúe estando presente en el alimento final, aunque sea en una forma modificada. Entre los ingredientes mencionados en el Anexo II del citado reglamento, se incluyen los frutos de cáscara.

La denominación de frutos de cáscara engloba a un grupo heterogéneo de alimentos sin relación botánica entre sí, pero con similitudes en su forma de consumo y en cuanto a su capacidad de desencadenar reacciones alérgicas en individuos sensibles. Contrariamente a la creencia popular, los cacahuets no forman parte de los frutos de cáscara, siendo clasificados dentro del grupo de las leguminosas. En el grupo de los frutos de cáscara se encuentran la almendra (*Prunus dulcis*), la avellana (*Corylus avellana*), el anacardo (*Anacardium occidentale*), la nuez (*Juglans regia*), la nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), la pacana (*Carya illinoensis*), el pistacho (*Pistacia vera*), y la nuez de macadamia (*Macadamia integrifolia*). Sus alérgenos se caracterizan por ser estables al calor y a los procesos digestivos, por lo que con frecuencia las reacciones alérgicas que producen son intensas e inmediatas. De hecho, la alergia a los frutos secos (incluyendo en este término tanto a los frutos de cáscara como a los cacahuets) es una de las alergias alimentarias más frecuentes, aunque su prevalencia varía en función de la edad y de la zona geográfica (Cox y Sicherer, 2015; McWilliam et al., 2015; Roux et al., 2003).

En el marco de la implantación del sistema APPCC (Sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico), la industria alimentaria necesita asegurar una gestión adecuada del riesgo de alergenidad de sus productos, instaurando medidas que minimicen la posibilidad de contaminación accidental en sus líneas de producción, y garantizando la eficacia de los métodos de limpieza de los equipos tras finalizar la elaboración de productos que puedan contener ingredientes alérgicos. Para ello necesitan disponer de técnicas analíticas sensibles y específicas que permitan detectar los alérgenos que se puedan encontrar tanto en materias primas como en el ambiente de procesado y en el producto final. Existen principalmente tres motivos por los que un fruto seco alérgico puede no aparecer indicado en la etiqueta de un producto: 1) contaminación o presencia no declarada del alérgeno en un ingrediente o materia prima adquiridos por la empresa elaboradora; 2) contaminación accidental de un producto elaborado en la misma planta procesadora que otro que contiene el alérgeno y 3) sustitución de un fruto seco más valorado por otro de precio inferior en productos en los que no es posible reconocer las características morfológicas del fruto.

Las técnicas analíticas empleadas con mayor frecuencia para la detección de frutos secos en alimentos están basadas en el análisis de proteínas o en el análisis de ADN. Entre las primeras destacan, por su rapidez, sencillez, precisión y fácil automatización, las técnicas de ELISA sándwich, ELISA competitivo indirecto y las técnicas inmunocromatográficas (Hlywka et al., 2000; Doi et al., 2008; Acosta et al., 1999; Roux et al., 2001; Ben Rejeb et al., 2005; Sharma et al., 2009). Cabe señalar que todas ellas dependen de la utilización de anticuerpos producidos en animales, presentando los inconvenientes inherentes a estos, de disponibilidad limitada, así como de variabilidad entre diferentes lotes. En lo que respecta a los métodos basados en el análisis de ADN, la técnica de PCR en tiempo real con sondas específicas es la más empleada y permite la detección simultánea de varios alérgenos.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, los objetivos de esta Tesis Doctoral han consistido en (1) el desarrollo y aplicación de técnicas de PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis para la detección de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*) y de almendra (*Prunus dulcis*) en alimentos; (2) la obtención y caracterización de anticuerpos recombinantes (scFv) a partir de genotecas comerciales para la detección de nuez de Brasil y de almendra en alimentos mediante técnicas inmunoenzimáticas (ELISA); (3) la identificación de las dianas moleculares reconocidas por los fago-anticuerpos recombinantes aislados frente a extractos proteicos totales de nuez de Brasil y almendra; (4) la clonación, expresión y biotilación *in vivo* en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* de los scFv específicos frente a almendra. Para llevar a cabo estos objetivos ha sido necesario:

1. Detección de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*) y almendra (*Prunus dulcis*) en alimentos mediante PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis.

- 1.1. Diseñar cebadores y sondas de hidrólisis empleando como marcadores genéticos el gen de la albúmina 2S en el caso de la nuez de Brasil, y la región ITS en el caso de la almendra.

- 1.2. Desarrollar y validar sistemas de PCR en tiempo real empleando los cebadores y sondas de hidrólisis diseñados para la detección específica de las especies diana en alimentos.

- 1.3. Evaluar la aplicabilidad de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas para la detección de nuez de Brasil y almendra en alimentos comerciales.

2. Selección de anticuerpos recombinantes (scFv) mediante la tecnología de *phage display* para la detección de nuez de Brasil y de almendra en alimentos.

- 2.1. Preparar los extractos proteicos totales y proteínas purificadas de nuez de Brasil y de almendra para tapizar las superficies de soporte sobre las que llevar a cabo el proceso de selección por afinidad.

- 2.2. Seleccionar por afinidad fragmentos de anticuerpos recombinantes frente a cada una de las especies estudiadas mediante la técnica de expresión heteróloga en fagos (*phage display*) a partir de las genotecas Tomlinson I + J.

2.3. Caracterizar los clones de fagos aislados en el proceso de selección, para conocer su secuencia nucleotídica, la integridad de los scFv, y la capacidad para reconocer exclusivamente a la especie diana.

2.4. Poner a punto técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) que permitan la detección de almendra y de nuez de Brasil en alimentos, utilizando como sondas de afinidad los anticuerpos recombinantes seleccionados.

3. Identificación y caracterización de las dianas moleculares reconocidas por los fago-anticuerpos recombinantes aislados frente a extractos de nuez de Brasil y de almendra.

3.1. Identificar mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas, inmunológicas y espectrométricas las proteínas diana reconocidas por cada uno de los scFv aislados en el presente trabajo.

3.2. Estudiar cómo afecta el tratamiento térmico a la estructura secundaria y terciaria de las proteínas diana reconocidas por los scFv, empleando sus espectros de dicroísmo circular y técnicas inmunoenzimáticas.

4. Producción, en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, de scFv biotinilados *in vivo* específicos frente a las proteínas de almendra.

4.1. Clonar en *P. pastoris*, empleando vectores de expresión proteica adecuados, la enzima biotín ligasa y la secuencia codificadora de un scFv seguida de la de un péptido aceptor de biotina, con el fin de conseguir un clon que produzca scFv biotinilados *in vivo*.

4.2. Purificar los scFv biotinilados mediante cromatografía de afinidad, empleando una columna empaquetada con proteína L.

4.3. Multimerizar los scFv purificados mediante la adición de un núcleo de avidina-peroxidasa, y comprobar su funcionalidad para la detección de almendra mediante técnicas de ELISA.

Con el desarrollo de esta tesis doctoral se pretende, en última instancia, desarrollar herramientas que contribuyan a mejorar la trazabilidad de los alimentos y la información facilitada al consumidor, con el fin de posibilitar la comercialización de alimentos seguros y saludables.

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN

2.1 REACCIONES ADVERSAS A LOS ALIMENTOS

La reacción adversa a los alimentos hace referencia a cualquier respuesta anormal desde el punto de vista clínico, producida tras la ingestión, contacto o inhalación de un alimento o de un aditivo alimentario contenido en el mismo. La Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI, *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) clasifica las reacciones adversas a los alimentos como tóxicas y no tóxicas (**Figura 2.1**). Las reacciones tóxicas están producidas por alimentos que contienen toxinas, contaminantes microbianos o sustancias con actividad farmacológica, y pueden aparecer en cualquier individuo que consuma el alimento, siempre y cuando la cantidad ingerida de este sea lo suficientemente elevada, puesto que no dependen de la susceptibilidad individual. Por el contrario, las reacciones no tóxicas, o de hipersensibilidad a alimentos, solo ocurren en individuos susceptibles. A su vez, las reacciones no tóxicas pueden clasificarse en intolerancias alimentarias, si no están mediadas por mecanismos inmunitarios, y alergias alimentarias, cuando hay un mecanismo de tipo inmunitario de base. Las intolerancias alimentarias se dividen a su vez en metabólicas (como la deficiencia en lactasa que afecta a gran parte de los adultos en la población mundial), farmacológicas (como las producidas por aminas vasoactivas) y las ocasionadas por mecanismos desconocidos. En el grupo de alergias alimentarias podemos distinguir las mediadas por IgE y las no mediadas por IgE (Johansson *et al.*, 2001; Uzzaman y Komarow, 2013; Villaño *et al.*, 2012).

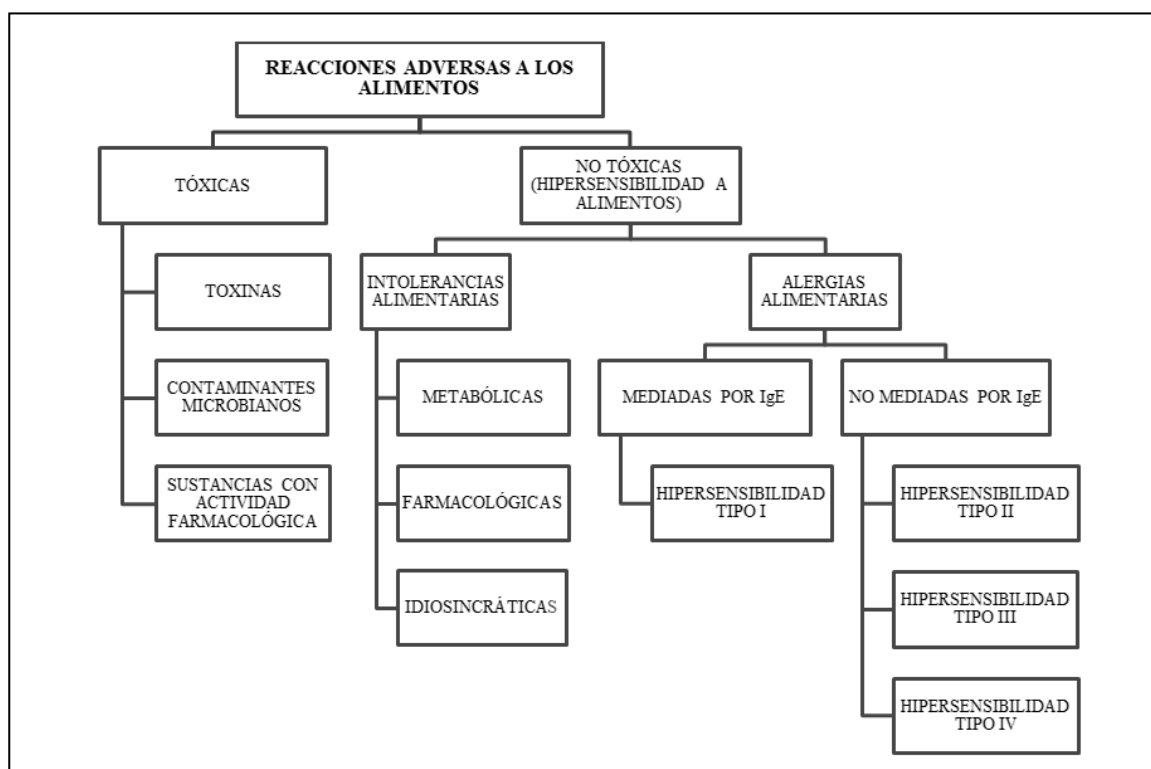


Figura 2.1. Clasificación de reacciones adversas a los alimentos según la EAACI.

2.1.1 Alergia alimentaria

La alergia alimentaria se define como una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos que se produce tras la ingestión, contacto o inhalación de un alimento o de un aditivo alimentario contenido en el mismo, y que engloba un espectro de síntomas que comprende desde urticaria hasta reacciones anafilácticas severas.

Los alérgenos son los antígenos desencadenantes de la alergia. Aunque en teoría cualquier proteína presente en el alimento puede sensibilizar el sistema inmune, la mayor parte de los alérgenos que reaccionan con inmunoglobulinas IgE e IgG son proteínas o glicoproteínas relativamente resistentes a la digestión y al cocinado. Los alérgenos alimentarios se engloban en un número limitado de familias proteicas, cada una de ellas con propiedades moleculares diferentes, lo que conlleva la existencia de diversas rutas de sensibilización en función de la familia de alérgenos de la que se trate. Aquellos alérgenos alimentarios frente a los cuales la sensibilización tiene lugar a través del tracto gastrointestinal, presentan características moleculares que tienden a incrementar su estabilidad térmica así como su resistencia a la desnaturalización por proteasas. En este sentido, cabe señalar a dos familias de alérgenos: las caseínas y las cupinas, las cuales mantienen su alergenicidad aún después de haber sido digeridas. Por el contrario, los alérgenos vegetales relacionados con el polen normalmente no poseen características moleculares que incrementen su estabilidad, por lo que solo inducen síndrome de alergia oral (OAS, *oral allergy syndrome*) como reacción secundaria a una sensibilización primaria al polen. En el caso particular de los alérgenos alimentarios, alrededor del 65 % de los alérgenos de plantas pertenecen a cuatro familias proteicas: prolaminas, cupinas, homólogos de Bet v 1 y profilinas. De igual manera, los alérgenos alimentarios animales pueden clasificarse en tres familias principales: tropomiosina, proteínas mano EF y caseínas (Breiteneder y Mills, 2008; Jenkins *et al.*, 2007; Masilamani *et al.*, 2012; Roux *et al.*, 2003).

La sensibilización a los alérgenos alimentarios puede ocurrir a través del tracto gastrointestinal (en el caso de los verdaderos alérgenos alimentarios) o vía pulmonar (en el caso de los aeroalérgenos con reactividad cruzada). La mucosa intestinal constituye una barrera defensiva primaria frente a los alérgenos, así como frente a los microorganismos, gracias a los mecanismos defensivos que posee: ácido gástrico, mucus, un epitelio intestinal íntegro, enzimas digestivas, peristaltismo intestinal, así como otros factores inespecíficos que constituyen la barrera no inmunológica. Por su parte, la barrera inmunológica engloba a los mecanismos de respuesta innatos (péptidos antimicrobianos, células inmunes que expresan receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, etc.) y a los mecanismos adaptativos (linfocitos, IgA). En determinadas ocasiones, macromoléculas intactas o bacterias penetran la barrera mucosa o incluso son captadas activamente por el epitelio intestinal. Este fenómeno puede resultar beneficioso a la hora de capturar factores de crecimiento esenciales, así como para muestrear el ambiente antigénico del tracto gastrointestinal, lo que permite la

inducción de tolerancia inmunitaria frente a los antígenos ambientales. Sin embargo, en los casos de alergia alimentaria, determinados alimentos producen una respuesta adaptativa intensa, que conlleva la aparición de células T productoras de citoquinas Th2, IgE específicas del alérgeno, y en casos de reiteradas exposiciones a este, degranulación de basófilos y mastocitos (Bischoff y Sellge, 2013; Steele *et al.*, 2012).

2.1.2. Alergia a los frutos de cáscara

El consumo de frutos de cáscara ha demostrado producir efectos beneficiosos para la salud, atribuibles al elevado contenido en ácidos grasos insaturados, así como a la presencia de otros compuestos bioactivos, como tocoferoles, fitosteroles, y compuestos fenólicos. Esto se traduce en la frecuente incorporación de frutos de cáscara a distintos alimentos, con el fin de incrementar sus características nutricionales. Sin embargo, para aquellos consumidores alérgicos, su consumo puede desencadenar reacciones fatales. Los frutos de cáscara están dentro del grupo de los "ocho grandes" alimentos responsables del 90 % de las alergias alimentarias. Entre los frutos de cáscara de mayor consumo se encuentran las almendras, nueces, anacardos, pacanas, pistachos, avellanas, nuez de Brasil, macadamia, piñones y castañas (Mandić e Ilić, 2011; Ros, 2010; Ros *et al.*, 2010).

Los alérgenos principales de los frutos de cáscara se clasifican en dos grupos: proteínas metabólicas y proteínas de almacenamiento. Las proteínas metabólicas se suelen identificar como panalérgenos, debido a que contribuyen a la alergenicidad de una gran cantidad de frutos de cáscara, semillas, polen, frutas y verduras. Se caracterizan por provocar casos de reactividad cruzada mediada por IgE. En este grupo encontramos a las proteínas transportadoras de lípidos (LTPs, *Lipid transfer proteins*), que son un grupo de proteínas asociadas a mecanismos de defensa de la planta, extremadamente estables al calor, a las profilinas y a las heveinas. En lo que se refiere a las proteínas de almacenamiento, en este grupo se encuentran las albúminas 2S, pertenecientes a la superfamilia de las prolaminas, y el grupo de las leguminas (globulinas 11S), y las vicilinas (globulinas 7S), pertenecientes a la superfamilia de las cupinas. Estas proteínas han sido reconocidas como alérgenos alimentarios mayores, debido a que están implicadas en un gran número de casos severos de alergias desencadenados tras el consumo de frutos de cáscara (Roux *et al.*, 2003; Teuber *et al.*, 2003).

2.1.3 Alergia alimentaria mediada por IgE (Hipersensibilidad tipo I)

La alergia alimentaria comienza con un proceso de sensibilización del organismo, durante el cual se produce el contacto con un alérgeno alimentario de manera repetitiva. La primera etapa de la enfermedad, denominada fase de inducción o de sensibilización, transcurre sin sintomatología, y en ella los linfocitos B producen IgE específicas que se distribuyen por todo el organismo a través del torrente sanguíneo. La exposición del individuo sensible al alérgeno resulta en la unión de las IgE a los mastocitos tisulares y a los granulocitos basófilos circulantes.

La posterior exposición a ese mismo alérgeno (en la denominada fase de provocación) activa la liberación de mediadores pro-inflamatorios por parte de los mastocitos y los basófilos sensibilizados, lo que se traduce en el desencadenamiento del cuadro clínico de la alergia. Por lo tanto, para que tenga lugar una reacción alérgica de tipo I, es necesaria la aparición de IgE específicas de antígeno producidas por linfocitos B (Bischoff y Sellge, 2013; Sicherer y Sampson, 2010).

La alergia alimentaria mediada por IgE es la que tiene mayor repercusión desde el punto de vista clínico, ya que puede conllevar la aparición fulminante de reacciones graves o fatales. Este tipo de reacción presenta manifestaciones clínicas bien definidas, y cursa con síntomas que implican a los sistemas respiratorio, digestivo, cardiovascular o la piel (Boyce *et al.*, 2011). La severidad de los síntomas puede variar desde moderada (erupción, urticaria, picor, lagrimeo, enrojecimiento ocular, irritación labial y ocular, náuseas, vómitos, diarreas, etc.) a severa (dificultad respiratoria, hipotensión, choque anafiláctico, etc.), y su gravedad dependerá de la edad, la sensibilidad individual, el nivel de exposición (*i.e.* cantidad de alimento consumido) y la existencia de otros factores concomitantes, como el asma o el uso de determinados medicamentos, como esteroides o antihistamínicos. Existen estudios clínicos que muestran que el nivel de sensibilidad dentro de una población alérgica puede variar en órdenes de magnitud (Taylor *et al.*, 2010). Esto significa que una misma exposición a un alérgeno puede tener diferentes consecuencias en función del individuo.

2.1.4 Prevalencia de la alergia alimentaria

La alergia alimentaria es un problema de salud pública que afecta a la calidad de vida de los consumidores, y cuya prevalencia se ha visto incrementada de manera significativa en los últimos años, observándose un aumento en la demanda de prestaciones sanitarias (Burks *et al.*, 2012; Cianferoni y Spergel, 2009; Lieberman y Sicherer, 2010; Prescott y Allen, 2011). De hecho, en Europa se ha observado un incremento de los casos de alergias alimentarias en niños de aproximadamente el 50 % entre los años 1997 y 2011, mientras que las hospitalizaciones debidas a reacciones alérgicas severas han aumentado siete veces durante la pasada década. Diversos estudios sobre la prevalencia de la alergia alimentaria estiman que afecta en torno al 2-4 % de la población (Madsen *et al.*, 2009; Prescott y Allen, 2011; Rona *et al.*, 2007; Zuidmeer *et al.*, 2008), observándose un repunte del 6-8 % en niños de 1 año de edad, y disminuyendo de manera gradual hasta el 2-4 % en niños de mayor edad y adultos. Esta disminución es un reflejo del hecho de que muchas de las alergias que aparecen en edades tempranas se resuelven. El porcentaje, así como la probabilidad de resolución varían significativamente entre alimentos. Normalmente las alergias al huevo, leche, trigo y soja se resuelven en la infancia, mientras que la alergia a los cacahuets, frutos de cáscara, sésamo, pescado, crustáceos y marisco tienden a persistir (Allen *et al.*, 2006). El motivo de por qué ciertos individuos terminan desarrollando una tolerancia natural todavía no se conoce. Existen estudios que indican que el 75 % de las

reacciones alérgicas que se desencadenan en niños lo hacen frente a un número limitado de alimentos, entre los que se incluyen el huevo, cacahuete, leche, pescados y ciertos frutos de cáscara, mientras que en adultos, frutas del grupo del látex (*v.g.* kiwi, plátano), frutas de la familia *Rosaceae* (*v.g.* manzanas, peras, ciruelas), vegetales de la familia *Apiaceae* (*v.g.* zanahoria, apio), el cacahuete y varios frutos de cáscara, son responsables del 50 % de las reacciones alérgicas (Dupont, 2011; Gadermaier *et al.*, 2011; Kanny *et al.*, 2001; Sastre, 2010). También existen variaciones geográficas en la prevalencia de las alergias, puesto que estas son reflejo de la variación de la dieta entre diferentes culturas. Por otra parte, ciertas diferencias observadas pueden explicarse por la variación genética de la población, o por la exposición a determinados factores ambientales, como la luz solar (que se relaciona con los niveles de vitamina D), o con elementos relacionados con la denominada "hipótesis de la higiene". No obstante, todavía se desconoce la causa responsable del aumento observado en el número de casos de alergia. El hecho de que este aumento se haya producido en un corto espacio de tiempo sugiere que no solo están implicados factores genéticos, si no que los ambientales han jugado también un papel importante. Además, la alergia alimentaria presenta mayor prevalencia en países desarrollados, observándose que personas que migran de un país en vías de desarrollo a otro desarrollado adquieren el mismo riesgo de padecer alergia que posee el país de adopción. Esto induce a pensar que la causa del aumento de los casos de alergia puede estar relacionada con el estilo de vida moderno. Si bien los factores medioambientales parecen estar asociados con el desarrollo de atopías y eccemas, se desconoce si estos mismos están implicados en el desarrollo de alergias alimentarias. También parece ser que existen otros factores involucrados, como son la modificación de los métodos de procesado de alimentos, el uso indiscriminado de antiácidos e inhibidores de la bomba de protones, el empleo de ungüentos que contienen alérgenos alimentarios, o la introducción de forma tardía de ingredientes alergénicos en la dieta de los niños. De hecho, el reciente incremento en casos de alergia infantil se atribuye a modificaciones ambientales, como variaciones en la dieta y reducción de las exposiciones a enfermedades durante la infancia temprana. Una de las hipótesis barajadas es que la reducción de infecciones y la menor exposición a microorganismos puede impedir que se desarrollen respuestas inmunorreguladoras tempranas, lo que hace que el sistema inmune sea más susceptible a reacciones inadecuadas frente a antígenos en principio inocuos, resultando en el desencadenamiento de reacciones alérgicas (Allen y Koplin, 2012; EFSA, 2014).

Para finalizar, hay que señalar que los estudios sobre prevalencia de alergias alimentarias basados en cuestionarios personales son imprecisos, ya que existen múltiples razones que hacen pensar que el número de casos de alergia puede estar sobrestimado, como la dificultad por parte de los individuos estudiados de diferenciar entre intolerancia alimentaria y alergia. El método idóneo para la realización de un estudio de prevalencia de alergias alimentarias mediadas por IgE es la provocación oral a doble ciego controlada con placebo. No obstante, este tipo de estudio también se encuentra limitado por diferencias metodológicas existentes entre distintos estudios,

como la elección de alérgenos alimentarios, y el criterio que define una reacción positiva. Además, los estudios a gran escala no son siempre posibles por problemas de conformidad, riesgo para los pacientes y elevado coste. En estos casos se suele emplear la detección de IgE específicas como marcador indirecto de la alergia, en ocasiones en combinación con los síntomas que aparecen tras la ingestión del alimento (Allen y Koplin, 2012; Niggemann y Beyer, 2007).

2.1.5 Dosis umbral

La concentración mínima de alérgeno que es capaz de desencadenar una reacción alérgica se conoce como dosis umbral. A pesar de la dificultad de determinar dicho valor, existe cierto consenso científico en establecer los límites de detección para diferentes ingredientes alergénicos entre 1 y 100 mg kg⁻¹, dependiendo del alimento (Buchanan *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2011; Poms *et al.*, 2004b; Taylor *et al.*, 2010). Sin embargo, otros estudios evidencian la existencia de grandes diferencias en los valores umbral existentes entre individuos. Es muy difícil proponer un valor de concentración máxima de alimento que no sea capaz de causar ningún efecto adverso, puesto que incluso cantidades traza del alérgeno son capaces de inducir reacciones anafilácticas severas en individuos sensibles. En este sentido, se ha comprobado que 30 µg de avellana, 0.07 µg de leche, 0.003 µg de huevo, o de 0.5 µg de cacahuete son cantidades capaces de provocar reacciones alérgicas en individuos sensibles (Bindslev-Jensen *et al.*, 2002; Cochrane *et al.*, 2012). La excepción la podemos observar en el caso del gluten (ingrediente responsable de la enfermedad celiaca), cuya ausencia sí se puede declarar, según lo establecido por el Reglamento (UE) 828/2014, en aquellos alimentos que lo contengan en concentraciones inferiores a 20 mg kg⁻¹.

2.1.6 Información alimentaria facilitada al consumidor

En los últimos años ha mejorado significativamente la cantidad de información disponible para el consumidor sobre la presencia de ingredientes alergénicos que se emplean de manera voluntaria en los alimentos. Inicialmente, fue en el *Codex Alimentarius* donde, en 1999, se publicó una lista de alérgenos prioritarios. Esta lista se tomó posteriormente como punto de partida por la Comisión Europea y otros organismos oficiales para promulgar una legislación específica obligando a declarar en el etiquetado de los alimentos aquellos ingredientes alergénicos incluidos en un listado (Gendel, 2012). Aunque se ha demostrado que muchos alimentos tienen el potencial de provocar reacciones alérgicas en individuos sensibles, en términos prácticos únicamente un número limitado de alimentos se han identificado como alérgenos prioritarios atendiendo a su prevalencia y severidad. En la actualidad, los principales criterios para identificar un alimento como alergénico son su prevalencia en la población, la gravedad de las reacciones que provoca, y su dosis umbral cuándo esta está disponible. De hecho, la prevalencia en la población es un indicador crítico que concierne a la salud pública, y es un criterio obligatorio para clasificar un alérgeno como importante. El Reglamento (UE)

1169/2011, sobre información alimentaria facilitada al consumidor recoge, en su Anexo II, 14 grupos de alimentos alergénicos que han de ser declarados de forma obligatoria en el etiquetado de los alimentos si se emplean como ingredientes, con independencia de la cantidad empleada. Esta lista incluye cereales que contienen gluten, crustáceos, huevos, pescado, cacahuete, soja, leche, frutos de cáscara (almendra, avellana, nuez, anacardo, pacana, nuez de Brasil, pistacho y macadamia), apio, mostaza, sésamo, altramuza y moluscos. Además, los sulfitos o el dióxido de azufre también se tienen que declarar cuando sus niveles superen los 10 mg kg⁻¹. La presencia de ingredientes alergénicos es también de declaración obligatoria en alimentos que se presenten sin envasar al consumidor final y a las colectividades, en los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, en los envasados por los titulares del comercio al por menor para su venta inmediata en un establecimiento de su propiedad, y en los contemplados en los supuestos anteriores y ofrecidos para la venta mediante comunicación a distancia (Real Decreto 126/2015).

Si bien la declaración de ingredientes alergénicos en el etiquetado de alimentos proporciona una información útil a los consumidores alérgicos, la industria alimentaria se enfrenta al reto de detectar la presencia de alérgenos no declarados u ocultos. Un alimento puede contener alérgenos ocultos como resultado de la presencia involuntaria o no declarada de estos en las materias primas empleadas en su elaboración, y también como resultado de la contaminación cruzada producida por el empleo de la misma maquinaria de procesado, por mezcla de ingredientes por parte de proveedores, o por adulteración fraudulenta. Los problemas de contaminación alimentaria pueden producirse ocasionalmente a pesar de los esfuerzos de las industrias de eliminar los restos de ingredientes alergénicos (Alvarez y Boye, 2012). En este sentido, la industria alimentaria trata de minimizar este riesgo mediante el desarrollo de planes de control de alérgenos y procedimientos de limpieza validados. No obstante, con objeto de asegurar que el producto final no contiene alérgenos, se han de implementar diferentes métodos analíticos. Por lo tanto, para poder proporcionar una correcta información a los consumidores alérgicos, se necesitan métodos fiables para la detección y cuantificación de alérgenos. Hasta la fecha, se han diseñado diferentes estrategias para la detección de la presencia de ingredientes alergénicos en productos alimentarios, que están encaminados bien a la detección de una o varias proteínas alergénicas específicas (análisis directo) o bien a la detección de una proteína no alergénica o de ADN del ingrediente alergénico (análisis indirecto) (Poms *et al.*, 2004b).

2.1.7 Planes de control de alérgenos

Debido a la falta de consenso existente para determinar cuál es la dosis umbral de los alérgenos, se ha producido cierto abuso por parte de la industria alimentaria en lo que al etiquetado preventivo se refiere, con el empleo de advertencias del tipo "puede contener". Sin embargo, en un entorno en el que no se dispone de directrices homologadas encaminadas a la confirmación y el manejo del riesgo de alérgenos, se desconoce cuál es el mejor método para controlar el riesgo causado por la presencia de alérgenos. Esto se traduce en que cada fabricante

tiene diferentes métodos para identificar e interpretar el riesgo de la presencia de alérgenos. Además, el etiquetado de alérgenos varía considerablemente en función del país de que se trate. Por otra parte, la aparición de métodos de detección cada vez más sensibles hace que se incremente el número de alimentos en los que se detectan cantidades traza de alérgenos. Esto provoca que se reduzca el número de alimentos etiquetados como "libres de alérgenos", lo que se traduce en la reducción del abanico de alimentos disponibles para consumidores alérgicos que no obstante, sí serían seguros de consumir.

Entidades como la *European Food Safety Authority* (EFSA), la *Food and Drug Administration* (FDA), la Agencia de Estándares Alimentarios (FSA, *Food Standards Agency*), la Agencia Europea de Alimentos y Bebidas (FDE, *FoodDrink Europe*), el *British Retail Consortium* (BRC) y la Agencia española de Consumo, Seguridad alimentaria y Nutrición (AECOSAN), ofrecen guías para el control de alérgenos.

En el caso de la EFSA, en el año 2014 actualizó su evaluación científica sobre alérgenos alimentarios publicando un dictamen que examina todos los ingredientes con potencial alérgeno de declaración obligatoria según normativa europea. Las industrias registradas en la FDA están obligadas a efectuar controles preventivos adecuados, así como evitar la adulteración de los alimentos con alérgenos no declarados. Además, han de monitorizar que las medidas preventivas se llevan a cabo adecuadamente, y que se establecen medidas correctivas en aquellos casos en los que esto no ocurra. La FSA publicó en el año 2006 el primer documento para el manejo de alérgenos y la información facilitada al consumidor, haciendo hincapié en la necesidad de minimizar la contaminación cruzada con alérgenos y el uso de etiquetado de precaución. Asimismo, la FDE publicó en el año 2013 una guía sobre el manejo de alérgenos orientada a las industrias alimentarias, en la que se recogía la necesidad de llevar a cabo una serie de acciones, como la formación de los empleados, el control de proveedores, la manipulación de ingredientes no procesados, el diseño de la fábrica, procesos de fabricación, el registro de documentación y de datos, y la información a los consumidores. El BRC publicó en el año 2014 una guía de buenas prácticas en el manejo de alérgenos, diseñada para ayudar en el desarrollo de sistemas robustos de gestión de alérgenos. Finalmente, la AECOSAN publicó en 2015 una guía cuyo objetivo era ayudar a los operadores de empresas alimentarias y a las autoridades encargadas del control oficial a entender y aplicar el Real Decreto 126/2015.

2.2 MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS EN ALIMENTOS

El peligro que supone la presencia de alérgenos a lo largo de la cadena alimentaria ha generado una gran demanda de métodos sensibles que sean capaces de detectar y cuantificar alérgenos en diferentes alimentos incluso en cantidades traza. Existen diferentes estrategias para la detección de ingredientes alergénicos. Unos métodos se basan en la detección directa de las proteínas alergénicas, mientras que otros se basan en la detección de otras proteínas o de los

ácidos nucleicos (ADN o ARN) de dicho alimento, como marcadores indirectos de la presencia del alérgeno. Entre los métodos para la detección de proteínas alergénicas o marcadores proteicos se encuentran el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), los biosensores de proteínas, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la electroforesis y la espectrometría de masas (MS) (Bremer *et al.*, 2009; Pollet *et al.*, 2011; Trashin *et al.*, 2011). Sin embargo, hay que tener en cuenta que muchas proteínas se desnaturalizan por calor y, dependiendo de la diana elegida, los métodos basados en su detección pueden ser solo aplicables cuando el alimento está crudo o ligeramente procesado (Kerbach *et al.*, 2009). Por el contrario, la mayor estabilidad de los ácidos nucleicos permite aplicar técnicas basadas en el análisis de ADN también en alimentos procesados. La mayoría de los métodos genéticos se basan en la amplificación de una secuencia diana de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) o PCR en tiempo real (Lockley y Bardsley, 2000; Mafra *et al.*, 2008). Los métodos analíticos empleados para la detección de alérgenos en alimentos han de ser específicos, sensibles, reproducibles y lo suficientemente robustos para ser aplicados en matrices alimentarias. Además, para proteger la salud de las personas alérgicas, deben alcanzar niveles de detección de menos de 100 partes por millón (mg kg^{-1}).

Debido a la diversidad de alérgenos alimentarios conocidos y de matrices alimentarias que pueden albergarlos, la elección del método de detección y la obtención de resultados fiables puede convertirse en todo un reto.

2.2.1 Técnicas basadas en la detección de proteínas

2.2.1.1 Inmunoensayos

Los inmunoensayos son un conjunto de técnicas que emplean anticuerpos que reconocen y se unen a una diana proteica conocida como antígeno. Los anticuerpos empleados en inmunoensayos se clasifican en dos categorías: policlonales, cuando el antisuero contiene inmunoglobulinas secretadas por diferentes clones de linfocitos B que reconocen distintos epítopos, y monoclonales, si las inmunoglobulinas son secretadas por clones de un único hibridoma de células B, que por lo tanto reconocen un único epítipo. Los anticuerpos policlonales y monoclonales se producen principalmente en animales, y mayoritariamente se engloban dentro de las IgG, aunque cuando se producen en yema de huevo se denominan IgY. Una estrategia diferente implica el uso de suero procedente de individuos alérgicos. En este caso, los anticuerpos son del tipo IgE, y son altamente específicos frente a la proteína particular que es la causante de la reacción alérgica del donante. Sin embargo, debido a su elevada variabilidad y escasa disponibilidad, estos sueros no pueden emplearse en los análisis de rutina llevados a cabo en las industrias alimentarias (Ćirković Veličković y Gavrović-Jankulović, 2014; Rice y Lupo, 2014; Taylor *et al.*, 2009). Existe otra estrategia para superar los inconvenientes de los anticuerpos

tradicionales (como la variación entre diferentes lotes, el uso de animales vivos, etc.), que implica su sustitución por anticuerpos recombinantes, como los scFv y los Fab. La tecnología de los anticuerpos recombinantes hace posible crear genotecas de fragmentos de anticuerpos derivados de células del sistema inmune, y emplear la tecnología de *phage display* para enriquecer la genoteca en aquellas variantes de anticuerpo con mayor afinidad por el antígeno (Smith *et al.*, 2004). Los anticuerpos también pueden reemplazarse por aptámeros, que son ligandos seleccionados a partir de genotecas de oligonucleótidos combinatoriales, o péptidos que reconocen a su diana con gran afinidad (Szeto *et al.*, 2013; Toh *et al.*, 2015). Los anticuerpos pueden reconocer una secuencia corta dentro de la cadena aminoacídica (epítomos lineales), o una determinada región de la estructura tridimensional de la proteína (anticuerpos conformacionales) (Mills *et al.*, 2003; van Hengel, 2007). Aunque los alimentos pueden consumirse crudos, lo normal es que sufran diferentes operaciones de procesado (hervido, fritura, tostado, etc.) que pueden romper o modificar la estructura de la proteína, destruyendo los epítomos, o exponiendo nuevos epítomos anteriormente ocultos, afectando por lo tanto a la capacidad de los anticuerpos para reconocer su molécula diana (Paschke, 2009; Sathe *et al.*, 2005). Por ello, siempre que sea posible, las dianas moleculares reconocidas por los anticuerpos deben seleccionarse teniendo en cuenta su termoestabilidad. En este sentido, proteínas como la tropomiosina o la parvalbúmina son buenos candidatos debido a su estabilidad térmica (Arif *et al.*, 2007; Fuller *et al.*, 2006). Pero el procesado de los alimentos afecta no solo a la capacidad del anticuerpo para reconocer su epítomo, sino también a la solubilidad de las proteínas, reduciendo la cantidad total de proteína extraída cuando se compara con extractos crudos, lo que puede llevar a subestimar el contenido del alérgeno (Sathe *et al.*, 2005).

Un aspecto a considerar en el desarrollo de métodos inmunológicos en los que no se produce la separación física de las proteínas de la muestra es que en ocasiones los anticuerpos pueden sufrir reacciones cruzadas con componentes de la matriz alimentaria, ocasionando falsos positivos. La técnica de SDS-PAGE seguida por *immunoblotting* permite la separación de las proteínas en función de su peso molecular y la posterior detección del alérgeno, evitando en algunas ocasiones los problemas de reactividad cruzada (van Hengel, 2007).

A pesar de las limitaciones mencionadas, debido a su elevada sensibilidad y especificidad, los inmunoensayos son los métodos analíticos empleados con mayor frecuencia para la detección de alérgenos alimentarios, proporcionando un análisis exacto de las muestras a analizar. Entre los métodos más empleados, destacan los de ELISA y los dispositivos de flujo lateral (DFL, o inmunocromatografía).

i) ELISA

La técnica de ELISA es la más extendida para la detección de alérgenos por parte de las industrias alimentarias y las agencias reguladoras. Es rápida, sencilla, fiable, no requiere de

ningún equipo, y permite el análisis simultáneo de varias muestras (Ćirković Veličković y Gavrović-Jankulović, 2014; Diaz-Amigo, 2009; Paschke, 2009; Sathe *et al.*, 2005). Por todas estas razones, varias compañías han desarrollado kits comerciales que han alcanzado gran popularidad en la industria alimentaria (**Tabla 2.1**).

Una de las mayores ventajas del ELISA es que también permite la cuantificación de los analitos cuando se comparan los valores de absorbancia obtenidos para las muestras con una serie de estándares del analito diana de concentración conocida. No obstante, dado que los métodos de procesado pueden afectar a la eficacia de la extracción proteica (Paschke, 2009; Sathe *et al.*, 2005), la curva estándar puede no ser completamente representativa del tipo de muestra analizada. Este problema puede solventarse si se dispone de materiales de referencia para desarrollar estándares de referencia comunes (Lutter *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2002). La eficiencia del método de extracción también desempeña un papel importante en los resultados del ELISA. Se ha demostrado que ciertos componentes de la matriz pueden inhibir la extracción de las proteínas o interferir en la detección de los analitos. Para optimizar la extracción de los alérgenos es recomendable el uso de aditivos de extracción, tales como la gelatina de pescado, la leche desnatada en polvo, o la albúmina sérica bovina (Lee y Taylor, 2011).

Las técnicas de ELISA empleadas en la industria alimentaria normalmente se presentan en formato tipo sándwich. En este diseño, un anticuerpo de captura, cuyo propósito es retener los antígenos presentes en la muestra, recubre la superficie de la placa. Los antígenos capturados son revelados posteriormente por un anticuerpo secundario (anticuerpo de detección) que está conjugado con una enzima que convierte el sustrato cromogénico en un producto detectable, manifestándose la presencia de las proteínas diana mediante una reacción colorimétrica. No obstante, cuando lo que se quiere detectar son proteínas de pequeño tamaño, el formato favorito es el ELISA competitivo. En este diseño, los antígenos recubren la superficie de la placa, y el anticuerpo se incuba con un extracto diluido de la muestra (inhibidor) antes de añadirse a la placa tapizada con el antígeno. Si en la muestra no se encuentra el antígeno, el anticuerpo marcado con la enzima muestra la máxima unión al antígeno unido en la fase sólida. Los antígenos presentes en la muestra inhiben la unión del anticuerpo marcado con la enzima al antígeno inmovilizado, por lo tanto, la absorbancia es inversamente proporcional a la concentración del antígeno en la muestra (Rice y Lupo, 2014; van Hengel, 2007). Como los resultados de ELISA pueden verse afectados por problemas de reactividad cruzada, los resultados positivos pueden requerir un análisis de confirmación mediante una técnica no inmunológica, para corroborar los datos y mejorar la especificidad de la detección. Por ello es importante incluir controles durante el análisis de las muestras, y también disponer de material de referencia con las matrices apropiadas y concentraciones adecuadas del analito (Thompson *et al.*, 2002).

2. INTRODUCCIÓN

Tabla 2.1. Kits de ELISA comerciales para la detección de alérgenos alimentarios.

| Nombre de la Compañía | | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| ELISA Technologies | BioCheck | Crystal Chem | BioFront | ELISA Systems | Neogen | R-Biofarm | Romer Labs | Elution Technologies |
| Altramuz Gluten | Almendra | Alforfón | Almendra | Alforfón | Almendra | Almendra | Almendra | Almendra |
| | Altramuz | β -lactoglobulina | Anacardo | Almendra | Altramuz | Altramuz | Altramuz | Altramuz |
| | Anacardo | Caseína | Avellana | Altramuz | Avellana | β -lactoglobulina | Avellana | Cacahuete |
| | Avellana | Cacahuete | Cacahuete | Avellana | β -lactoglobulina | Cacahuete | β -lactoglobulina | Caseína |
| | β -lactoglobulina | Gliadina | Pacana | β -lactoglobulina | Cacahuete | Caseína | Cacahuete | Coco |
| | Cacahuete | Gluten | Pistacho | Cacahuete | Caseína | Crustáceos | Caseína | Crustáceos |
| | Caseína | Huevo | Sésamo | Caseína | Crustáceos | Gliadina | Clara de | Huevo |
| | Crustáceos | | Soja | Crustáceos | Gliadina | Gluten | huevo | Leche |
| | Huevo | | | Gliadina | Gluten | Huevos | Crustáceos | Macadamia |
| | Leche | | | Mostaza | Mostaza | Leche | Gluten | Moluscos |
| | Mostaza | | | Sésamo | Sésamo | Lisozima | Leche | Mostaza |
| | Nuez | | | Soja | Soja | Macadamia | Lisozima | Nuez |
| | Pescado | | | | | Mostaza | Mostaza | Nuez de Brasil |
| | Pistacho | | | | | Sésamo | Nuez | Pescado |
| | Sésamo | | | | | Soja | Soja | Pacana |
| | Soja | | | | | | | Piñón |
| | | | | | | | | Sésamo |
| | | | | | | | Soja | |

ELISA Technologies: <https://www.elisa-tek.com/>

BioCheck: <http://www.biocheck.uk.com/allergens/lab-test-kits>

Crystal Chem: <http://www.crystalchem.com>

BioFront: <http://www.biofronttech.com/products/food-safety-monotracer-elisa-kits/1/3/>

ELISA Systems: <http://www.elisasystems.com/>

Neogen: <http://foodsafety.neogen.com/en/allergens>

R-Biofarm: <http://www.r-biopharm.com/>

Romer Labs: <http://www.romerlabs.com/en/products/food-allergens/>

Elution Technologies: <http://elutiontechnologies.com/product/elisa-almond/>

ii) Dispositivos de flujo lateral (DFL)

Se trata de inmunoensayos rápidos y fáciles de usar que se emplean de manera rutinaria en las industrias alimentarias para la detección de alérgenos y diversos contaminantes (Tabla 2.2). Consisten en una membrana con un depósito en el que se aplica la muestra líquida que contiene los anticuerpos o el antígeno. La mayor ventaja de este dispositivo es que no requiere de ningún tipo de instrumentación específica. No obstante, este tipo de dispositivos únicamente sirven para determinar la presencia o ausencia del analito, no siendo adecuados para su cuantificación en la muestra (Rice y Lupo, 2014; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

Como sucede en la técnica de ELISA, los DFL se presentan en dos formatos diferentes: sándwich y competitivo. Los DFL tipo sándwich son los más utilizados en el análisis de alérgenos. En este diseño, la muestra se carga en una tira de membrana que contiene los anticuerpos específicos frente a la diana que permanecen sin unir en la membrana. Estos anticuerpos de detección están marcados con partículas coloreadas (látex o nanopartículas de oro), enzimas o moléculas fluorescentes. Si la muestra contiene el analito, el anticuerpo se unirá a él resultando en un complejo antígeno-anticuerpo marcado. En el siguiente paso, el complejo antígeno-anticuerpo migrará a través de la membrana por capilaridad hasta alcanzar una región que contiene un anticuerpo de captura inmovilizado (línea test), que atrapará el complejo antígeno-

Tabla 2.2. Kits de DFL comerciales para la detección de alérgenos alimentarios.

| Nombre de la Compañía | | | |
|-----------------------|----------------|-------------------------|----------------------|
| Crystal Chem | R-biofarm | Romer Labs | Elution Technologies |
| Caseína | Almendra | Almendra | Almendra |
| Gliadina | Anacardo | Altramuz | Anacardo |
| Gluten | Avellana | Anacardo/pistacho | Cacahuete |
| Huevo | Cacahuete | β -lactoglobulina | Coco |
| | Coco | Cacahuete | Gluten |
| | Crustáceos | Caseína | Huevo |
| | Gliadina | Coco | Leche |
| | Gluten | Crustáceos | Nuez |
| | Huevo | Huevo | Pacana |
| | Leche | Leche | Pescado |
| | Lisozima | Macadamia | Pistacho |
| | Macadamia | Mostaza | Soja |
| | Mostaza | Nuez | |
| | Nuez | Nuez de Brasil | |
| | Nuez de Brasil | Sésamo | |
| | Pistacho | Soja | |
| | Sésamo | | |

Crystal Chem: <http://www.crystalchem.com>

R-Biofarm: <http://www.r-biopharm.com/>

Romer Labs: <http://www.romerlabs.com/en/products/food-allergens/>

Elution Technologies: <http://elutiontechnologies.com/product/elisa-almond/>

anticuerpo marcado, y aparecerá una línea visible a simple vista. El color de la línea será directamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra, mientras que si no hay molécula diana en la muestra, la línea no se formará. Los DFL contienen una segunda línea (línea de control) para asegurar la validez del ensayo. La línea de control contiene un anticuerpo que se unirá a los anticuerpos marcados. El formato sándwich solo puede emplearse en la detección de alérgenos que posean más de un epítipo. En el diseño competitivo, el analito se une a un anticuerpo marcado con látex o con un metal coloidal (reactivo de detección). Tras cargar la muestra, el reactivo de detección y la muestra que contiene al analito libre migran por la membrana hasta alcanzar la línea test que contiene los anticuerpos de captura (anticuerpos inmovilizados frente al analito diana), que capturarán parte del analito libre y parte del reactivo de detección. Cuanto mayor sea la cantidad de analito presente en la muestra, más competirá con la cantidad limitada de partículas marcadas que conforman el reactivo de detección. La línea test aparecerá como una línea coloreada en aquellas muestras que no contengan la molécula diana. Por el contrario, la línea control aparecerá como una banda, ya que el anticuerpo marcado es capturado por un anticuerpo específico.

2.2.1.2 Biosensores de proteínas

Un biosensor es un dispositivo integrado por un elemento de reconocimiento de naturaleza biológica (cuya función es la detección del analito presente en la muestra), acoplado a un elemento transductor, que transforma la señal biológica en una señal físico-química proporcional a la concentración del analito (Evtugyn, 2014; Narsaiah *et al.*, 2012). En función de la naturaleza del transductor empleado, los biosensores se pueden clasificar en: ópticos, electroquímicos, piezoeléctricos y termométricos.

i) Biosensores ópticos

Por norma general, los biosensores ópticos se basan en la medición del cambio que se produce en la superficie del sensor cuando el analito se une al elemento de reconocimiento del dispositivo. Este tipo de biosensores son especialmente atractivos en el ámbito de la seguridad alimentaria, puesto que permiten la detección del analito en matrices alimentarias complejas con un mínimo procesado de la muestra. A pesar de ello, su empleo en la industria alimentaria no se encuentra muy extendido. Dentro de este grupo cabe destacar los biosensores basados en la resonancia de plasmones superficiales (SPR, *surface plasmon resonance*). Cuando un haz de luz incide con un ángulo específico sobre una capa metálica delgada, y a través de un prisma, interactúa con los electrones libres del metal (plasmones de superficie), generando una onda evanescente, que ocasiona una reducción abrupta en la intensidad de la luz reflejada. El ángulo en el cual tiene lugar esta reducción recibe el nombre de ángulo SPR, y varía en función del índice de refracción del medio dieléctrico (que por lo general es un tampón) existente en el lado opuesto de la capa metálica (que normalmente es de oro). Cuando se produce la interacción del

analito con el elemento de reconocimiento, que se encuentra inmovilizado en la superficie de oro, el ángulo SPR varía, quedando registrada esta variación en el detector (Narsaiah *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2010).

Como ejemplos del uso de este tipo de biosensores para el análisis de alimentos, encontramos en la bibliografía especializada el trabajo de Pollet *et al.*, 2011, quienes describieron un biosensor SPR de fibra óptica que empleaba nanopartículas paramagnéticas acopladas a anticuerpos frente a Ara h 1, que permitía la detección de este alérgeno del cacahuete en muestras de chocolate hasta concentraciones de $0.09 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por su parte, Billakanti *et al.*, 2010 utilizaron un biosensor SPR que permitía la detección simultánea de 5 proteínas de suero de leche mediante el empleo de anticuerpos inmovilizados en un chip ProteOn GLC (Biorad). Mediante la tecnología de SPR, Rebe Raz *et al.*, 2010 detectaron 13 alérgenos en alimentos (cacahuete, leche, altramuz, soja, huevo, avellana, almendra, anacardo, nuez de Brasil, piñón, pacana, macadamia y pistacho), consiguiendo límites de detección inferiores a 5 mg kg^{-1} . Por su parte, Yman *et al.*, 2006 desarrollaron un biosensor para la detección de proteínas de leche, huevo, avellana, cacahuete, crustáceos y sésamo en muestras alimentarias, con límites de detección de 12.5 mg kg^{-1} .

Como ejemplos de biosensores ópticos no basados en la tecnología de SPR, encontramos los trabajos de Godoy-Navajas *et al.*, 2011, quienes desarrollaron un fluoroinmunoensayo orientado a la detección de proteína de soja en muestras de alimentos empleando nanopartículas de sílice teñidas con azul del Nilo, con un límite de detección (LOD, *limit of detection*) de $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por otra parte, Wang *et al.*, 2011 describieron un ensayo que permitía la detección simultánea de ocho alérgenos en alimentos (soja, trigo, cacahuete, anacardo, gamba, pescado, vaca y pollo) empleando un chip de silicio, con el cual podía apreciarse a simple vista el cambio de color, no precisando por tanto de ningún tipo de equipamiento sofisticado.

ii) Biosensores electroquímicos

Este tipo de biosensores por lo general implica la catálisis enzimática de una reacción que produce o consume electrones. En función del tipo de transductor empleado, estos biosensores se clasifican en amperométricos, voltimétricos, potenciométricos y conductimétricos o impedimétricos. Los amperométricos determinan corrientes eléctricas asociadas a procesos rédox que tienen lugar en reacciones bioquímicas. Si la corriente se mide durante variaciones de potencial controladas, se denominan voltimétricos. Los transductores potenciométricos emplean electrodos específicos para determinar la actividad de los iones en una reacción electroquímica, mientras que los conductimétricos o impedimétricos determinan variaciones en la conductancia/impedancia asociados con cambios en el ambiente iónico de las soluciones. Puesto que las reacciones únicamente se detectan en la proximidad de la superficie del electrodo, estos poseen un papel fundamental. Los biosensores electroquímicos están constituidos por tres

electrodos: uno de referencia, uno auxiliar y uno de trabajo. El electrodo de referencia, normalmente fabricado con Ag/AgCl, necesita mantener un potencial estable y conocido, por lo que se mantiene alejado del lugar de reacción. El electrodo de trabajo sirve como el elemento transductor en la reacción, mientras que el electrodo auxiliar se encarga de conectar con la solución electrolítica, de forma que se pueda aplicar una corriente al electrodo de trabajo. Estos electrodos tienen que ser buenos conductores y químicamente estables, por lo que suelen estar fabricados con materiales tales como el platino, oro, grafito o silicio (Evtugyn, 2014; Grieshaber *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012a).

Entre los métodos que emplean biosensores electroquímicos para la detección de alérgenos en alimentos, cabe citar el trabajo de Cao *et al.*, 2011a, en el que detectaron caseína empleando un material compuesto de nanotubos de carbono, poli-(L-arginina) y nanopartículas de oro, alcanzando un LOD de $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$. Eissa y colaboradores (2012) desarrollaron un inmunosensor voltamétrico para la detección de β -lactoglobulina, empleando para ello electrodos serigrafados de grafeno modificado, y consiguiendo detectar 0.85 pg mL^{-1} de la molécula diana. Por su parte, Yang *et al.*, 2011 desarrollaron un biosensor en el que emplearon puntos cuánticos de ZnO para la detección de ovomucoide de pollo, con un LOD de 1 ng mL^{-1} . Jiang *et al.*, 2013 desarrollaron un biosensor electroquímico para la detección del alérgeno tropomiosina de gamba (Pen a 1) en el que empleaban mastocitos de la línea celular RBL-2H3 encapsulados en colágeno tipo 1, inmovilizados en nanopartículas de L-cisteína/oro electrodepositadas sobre electrodos de oro. Con este biosensor consiguieron detectar el alérgeno con un LOD de $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$. Inmovilizando un anticuerpo monoclonal en un electrodo de oro, Huang y colaboradores (2008) desarrollaron un biosensor de impedancia para la detección de la proteína alergénica de cacahuete Ara h 1 con un LOD de 0.3 nM . Posteriormente, reemplazaron el electrodo de oro por un electrodo degenerado de silicio (Huang y Suni, 2008). Finalmente, Singh *et al.*, 2010, desarrollaron un biosensor para detectar el alérgeno Ara h 1 de cacahuete. Para ello emplearon membranas de policarbonato nanoporosas, con poros recubiertos de oro sobre los que inmovilizaron el anticuerpo. Cuando los poros se cubrían parcialmente por la formación de los complejos antígeno-anticuerpo, la conductividad de los electrolitos dentro de la membrana se reducía, lo que permitía la detección del alérgeno.

iii) Biosensores piezoeléctricos (electromecánicos)

Este tipo de biosensores están basados en el efecto piezoeléctrico. Los materiales piezoeléctricos poseen la capacidad acumular carga eléctrica al ser sometidos a tensiones mecánicas. Esta tecnología emplea microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM, *quartz crystal microbalance*) para analizar la unión de moléculas. Cuando una corriente atraviesa un resonador de cristal de cuarzo, induce la aparición de oscilaciones. Si algunas moléculas se unen a los receptores, su frecuencia de resonancia cambia. El cambio en la señal no solo muestra la

presencia de una molécula, sino también la especificidad y la afinidad de la molécula por el receptor.

Un QCM está formado por un disco delgado cortado a partir de un único cristal de cuarzo piezoeléctrico en el cual se han dispuesto los electrodos (normalmente de oro). Cuando un campo eléctrico oscilante se aplica a lo largo de la placa, la onda acústica resultante se transmite a lo largo del cristal en una dirección perpendicular a la superficie del cristal, con una frecuencia dependiente de la masa del cristal, incluyendo cualquier capa fina depositada sobre él. En este tipo de biosensores, el evento de reconocimiento biológico, genera un cambio en la masa de la capa detectora, dando lugar a un cambio en la frecuencia de resonancia de la microbalanza. Esta aplicación requiere normalmente la inmovilización de anticuerpos o de fragmentos de ADN en la superficie del transductor (Thakur y Ragavan, 2013).

Entre los trabajos realizados utilizando este tipo de biosensores cabe señalar el de Xiulan *et al.*, 2010, quienes desarrollaron un inmunosensor de microbalanza de cuarzo para detectar la presencia de alérgenos de camarón de agua dulce (*Macro brachium*) en alimentos, con un LOD de 0.333 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por su parte, Chu y colaboradores (2012), describieron un sensor de microbalanza de cristal de cuarzo para la detección de gliadinas en alimentos. Tras incorporar nanopartículas de oro se logró incrementar la sensibilidad de la técnica, alcanzando un LOD de 8 ppb de gliadina en etanol al 60 %.

2.2.1.3 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*) es una técnica analítica que permite obtener información acerca de la estructura y funcionalidad de proteínas alergénicas, a la vez que sirve como técnica no inmunológica para detectar la presencia de alérgenos alimentarios (Cunsolo *et al.*, 2014). La detección de alérgenos mediante métodos inmunológicos está condicionada por la complejidad de la matriz alimentaria, por la aparición de falsos resultados positivos debido a reacciones cruzadas, y por la variabilidad de los anticuerpos para ELISA distribuidos por las casas comerciales. Además, uno de los grandes problemas que afrontan las técnicas inmunológicas es que la capacidad de detección de los alérgenos puede verse afectada por los cambios estructurales que pueden sufrir las proteínas tras el procesado de los alimentos. La técnica de MS supera este problema, puesto que permite la detección inequívoca de múltiples alérgenos y sus isoformas, incluso en productos procesados donde los cambios químicos o físicos han podido afectar a la estabilidad de las proteínas. Otras ventajas de la técnica son la rapidez de análisis, la facilidad de preparación de las muestras, la robustez y la estabilidad, lo que permite su automatización y estandarización. No obstante, su aplicación requiere el uso de equipos caros, con altos costes de mantenimiento, y que necesitan ser operados por personal cualificado. Por todo ello, la técnica de MS no se aplica para el análisis rutinario de alérgenos en alimentos. Sin

embargo, sí puede emplearse como método auxiliar para confirmar los resultados obtenidos con los ensayos de rutina en la industria alimentaria.

Las técnicas más empleadas en espectrometría de masas para generar iones son las de MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y ESI (ionización por electroespray, *Electrospray Ionization*). Posteriormente, el analizador de masas separa los iones generados en función de su relación masa/carga (m/z). El analizador puede ser de tiempo de vuelo (TOF, *Time of Flight*), cuadrupolo (Q, *quadrupole*) o de trampa iónica (IT, *Ion Trap*). Finalmente, el detector registra el número de iones para cada valor m/z (Domon y Aebersold, 2006; Han *et al.*, 2008). La técnica de espectrometría de masas requiere una etapa de separación previa, que puede ser electroforesis en gel o cromatografía líquida, para simplificar la mezcla compleja de péptidos y proteínas que constituyen la muestra, y que se van a analizar en el espectrómetro. En función del procesamiento de la muestra se distinguen dos estrategias diferentes: de abajo-arriba (*bottom-up*) y de arriba-abajo (*top-down*).

La estrategia *bottom-up* emplea una o varias proteasas para obtener distintos péptidos procedentes de la proteína que se va a analizar mediante MS o espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Mediante MS se identifica la proteína en base a su huella peptídica, que proporciona la identidad más probable. La MS/MS ofrece información estructural de la molécula (su secuencia de aminoácidos, o péptidos detectados), confiriendo a la búsqueda un carácter altamente específico y discriminante. Hay que señalar que la identificación de alérgenos es complicada debido a la escasez de entradas en la base de datos cuando el genoma no está totalmente secuenciado. En estos casos, la secuenciación *de novo* mediante MS/MS es muy útil para identificar alérgenos (Christofakis y Aglaia, 2014; Ćirković Veličković y Gavrović-Jankulović, 2014; Kirsch *et al.*, 2009). Una variante particular dentro de la estrategia *bottom-up* es la proteómica *shotgun*, que emplea como método para la separación de proteínas un sistema de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas. Este método permite la detección de componentes poco abundantes, lo que lo hace muy útil a la hora de detectar alérgenos alimentarios, pero posee peor resolución si se compara con la electroforesis en dos dimensiones (Mattarozzi *et al.*, 2012; Meissner y Mann, 2014; Pedreschi *et al.*, 2012). En la actualidad, gracias a la aparición de las técnicas de cromatografía líquida capilar (CLC, *capillary-liquid chromatography*) y nano-LC, la proteómica *shotgun* tiene un gran potencial en el campo analítico. La reducción en el diámetro interno de las columnas empleadas reduce el tiempo de análisis y el consumo de fase móvil, y facilita el acoplamiento al MS, debido al menor caudal empleado. Sin embargo, como los volúmenes inyectados son muy pequeños, es necesario emplear detectores más sensibles, o preconcentrar previamente la muestra (Fanali *et al.*, 2013).

La estrategia *top-down* analiza directamente proteínas intactas y sus iones de fragmentación generados en el MS, sin necesidad de realizar una digestión previa con proteasas.

Esta aproximación permite la caracterización completa de proteoformas, que son diferentes formas moleculares de una proteína que surgen a partir de un único gen, como consecuencia de la variación genética, el empalme alternativo del ARN y las modificaciones post-traduccionales. Esto es posible gracias a la disponibilidad de espectrómetros de alta resolución que poseen gran precisión de masa (Catherman *et al.*, 2014; Gallardo *et al.*, 2013; Monaci y Visconti, 2009).

Como ejemplos de la aplicación de MS para la detección de alérgenos en alimentos encontramos los trabajos de Weber *et al.*, 2006, que emplearon un sistema de cromatografía líquida capilar acoplado a un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (CLC-Q-TOF MS/MS) para detectar α S1-caseína en alimentos adulterados, utilizando como marcador el péptido de caseína m/z 634.3. Monaci y colaboradores (2010) emplearon un CLC acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con ionización por electrospray (CLC-ESI-MS/MS) para la detección de péptidos derivados de la α y β -caseínas en vino blanco. Pudieron identificar cuatro iones peptídicos específicos (m/z 742.2, 729.2, 634.2 y 692.6) por análisis CLC-ESI-MS/MS seguido de una búsqueda bioinformática, y alcanzaron un LOD de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para los caseinatos añadidos al vino blanco cuando se empleaba el ion m/z 742.2 como marcador. En el artículo publicado por Monaci *et al.*, 2011, se describe la detección de proteína de leche y caseinatos en galletas y en vino blanco, empleando para ello una separación de cromatografía líquida en fase reversa acoplada a un espectrofotómetro de trampa iónica. Heick y colaboradores (2011) desarrollaron un método basado en LC-MS/MS para la detección simultánea de 7 ingredientes alergénicos (leche, soja, huevo, cacahuete, avellana, nuez y almendra) tanto en muestras procesadas como sin procesar. Comprobaron la influencia que ejercía el horneado sobre el método de detección, y compararon los resultados con los obtenidos con kits comerciales de ELISA. Los autores declararon que el método desarrollado mejoraba al ELISA en la detección de estos alérgenos en las muestras procesadas, con la ventaja adicional de permitir el análisis simultáneo de varios alérgenos en la muestra. Chassaigne y colaboradores (2007) describieron un método CLC combinado con Q-TOF MS/MS para identificar marcadores peptídicos de las proteínas alergénicas de cacahuete teniendo en cuenta su estabilidad térmica. Para ello definieron dos marcadores específicos para la proteína alergénica Ara h 1 [VLEENAGGEQEER (m/z 786.88, 2+) y DLAFPGSGEQVEK (m/z 688.85, 2+)], uno para la proteína Ara h 2 [RQQWELQGDR (m/z 439.23, 3+)] y dos para la proteína Ara h 3 [SPDIYNPQAGSLK (m/z 695.35, 2+) y SQSENFYVAFK (m/z 724.84, 2+)]. Pedreschi *et al.*, 2012 emplearon proteómica *shotgun* para detectar la presencia de péptidos proteotípicos (secuencia peptídica que se encuentra únicamente en una proteína conocida, y que por lo tanto sirve para identificar esa proteína) de Ara h 3/4 (m/z 432.5, 3+) y SPDIYNPQAGSLK (m/z 695.4, 2+) en galletas horneadas, empleando como estándar el material de referencia IRMM-481f, que consiste en una mezcla de distintas variedades de cacahuete sometidas a diferentes tratamientos térmicos. Mattarozzi *et al.*, 2012 describieron un método LC-ESI-MS/MS para detectar y cuantificar congulinas de altramuz en pasta y galletas.

2.2.2 Técnicas basadas en la detección de ADN

La tecnología basada en el ADN es un área relativamente nueva en la detección de alérgenos, un campo tradicionalmente dominado por los inmunoensayos. Los análisis de ADN se han empleado para comprobar la autenticidad de alimentos y para la detección de productos procedentes de la biotecnología agraria, asegurando el correcto etiquetado en cumplimiento con la normativa existente. Los métodos basados en el ADN son métodos indirectos para la detección de alérgenos en alimentos, puesto que no detectan la proteína alergénica en sí misma, sino que ponen en evidencia la presencia de fragmentos de ADN del alimento alergénico. Normalmente los métodos genéticos se basan en la amplificación de fragmentos específicos de ADN, bien mediante técnicas de PCR de punto final, que proporciona resultados cualitativos (*i.e.* detecta la presencia de una secuencia determinada de ADN), o mediante PCR en tiempo real, que sí tiene el potencial de proporcionar resultados cuantitativos. En este sentido, las técnicas de PCR pueden ser una valiosa herramienta para determinar la presencia o ausencia de un determinado alérgeno en alimentos por debajo de una concentración de 10 mg kg⁻¹. Además, estas técnicas se caracterizan por ser rápidas, sensibles y específicas. Hay que tener en cuenta que la secuencia diana de ADN no siempre se localiza en genes que codifican una proteína alergénica, y por lo tanto el análisis solo detecta ADN genómico del ingrediente causante de la alergia. Esto no quiere decir que necesariamente la proteína responsable se encuentre presente (Kirsch *et al.*, 2009).

Las ventajas que presentan las técnicas basadas en el ADN con respecto a las basadas en proteínas radican en que el ADN se ve menos afectado por las operaciones de procesado, encontrándose normalmente intacto tras someterse a temperaturas de cocinado. Por el contrario, como hemos indicado anteriormente, el procesado de los alimentos puede afectar tanto a la conformación como a la solubilidad de las proteínas. Además, para el análisis de proteínas no pueden emplearse métodos de extracción agresivos, puesto que estos pueden afectar a los epítopos reconocidos por el anticuerpo, mientras que para el ADN se pueden emplear tampones más agresivos. Por otra parte, el contenido de ADN suele ser más estable que los niveles de proteínas de la muestra, que pueden variar entre distintas especies o variedades. Un inconveniente citado con frecuencia en los métodos genéticos es que ciertos componentes de la matriz alimentaria pueden interferir con los análisis y por lo tanto afectar a la eficiencia de la amplificación. Sin embargo, los inhibidores de PCR pueden eliminarse durante la extracción y purificación del ADN con ayuda de procedimientos de limpieza de ADN adecuados (López-Calleja *et al.*, 2007; Poms *et al.*, 2004a).

Un problema que afecta a la cuantificación de los alérgenos, bien sea mediante métodos inmunológicos o basados en ADN, es el hecho de que apenas existen materiales certificados de referencia (CRMs, *Certified Reference Materials*) disponibles. Los CRMs son materiales cuya composición es lo suficientemente homogénea y bien establecida para ser empleados en el desarrollo y validación de un método, o para probar su resolución, y poseen valores certificados.

El uso de estos CRMs ha contribuido a facilitar el cumplimiento de la normativa relacionada con el etiquetado de alérgenos, así como para mejorar la exactitud de los métodos analíticos.

A pesar de todo ello, actualmente hay una falta de materiales de referencia para el desarrollo de métodos de detección de alérgenos. En este sentido, existen varias redes de investigación que en la actualidad están implicadas en la producción de materiales de referencia para alérgenos de alimentos, como el huevo en polvo y la leche en polvo proporcionada por el NIST (*National Institute of Standards and Technology*) (Kerbach *et al.*, 2009). Aunque existen materiales de referencia (sin certificar) para los alérgenos alimentarios más importantes, los resultados obtenidos con ellos no pueden ser comparables puesto que no están certificados. A día de hoy, en lo que a detección de alérgenos alimentarios se refiere, solo el cacahuete posee CRM (proporcionado por el *Institute for Reference Materials and Measurements*, IRMM).

2.2.2.1 PCR y PCR en tiempo real

Los métodos de PCR para la detección de ADN en productos alimentarios comprenden tres etapas:

- 1) Extracción y purificación del ADN
- 2) Amplificación de secuencia(s) específica(s) de ADN
- 3) Detección del ADN amplificado

La metodología de PCR consiste en la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN. Para ello se requiere de una enzima, la polimerasa Taq, que cataliza la síntesis de la nueva cadena de ADN, y una pareja de oligonucleótidos cuidadosamente seleccionados, que sirven como cebadores para la reacción e hibridan con las cadenas complementarias que flanquean la región de interés en el ADN diana. La técnica de PCR necesita una serie de ciclos repetitivos de calentamiento y enfriamiento, que implican la desnaturalización de la cadena molde, el alineamiento de los cebadores, y la extensión de los cebadores alineados por la polimerasa de ADN. Este proceso tiene como resultado la acumulación exponencial de un fragmento específico cuyo inicio y final están definidos por los extremos 5' de los cebadores. Los ciclos de amplificación se repiten unas 20-40 veces. Puesto que los productos sintetizados durante un ciclo sirven de molde para el siguiente, el número de copias de ADN aproximadamente se duplica tras cada ciclo de amplificación, hasta llegar a niveles detectables después de 20-30 ciclos. Los productos de amplificación pueden visualizarse mediante tinción fluorescente del gel de electroforesis en agarosa, proporcionando información acerca del tamaño del producto de amplificación.

La técnica de PCR en tiempo real también consiste en la sucesión de ciclos de desnaturalización, unión de los cebadores y elongación de la cadena de ADN, a los que se somete una molécula de ADN molde, y que producen un incremento exponencial de los productos de amplificación (amplicones). Pero además de la tecnología termocicladora tradicional, los equipos

de PCR en tiempo real incorporan fluorímetros y detectores que permiten tanto la excitación de los fluorocromos presentes en la reacción como la detección de la luz emitida. Al contrario de lo que sucede con la técnica de PCR convencional, el proceso de amplificación del ADN se monitoriza en cada ciclo (esto es, a tiempo real) cuando la reacción se encuentra en la fase exponencial. Para ello se requiere de una molécula fluorescente denominada donador o *reporter*. Conforme el número de copias del amplicón aumenta, la fluorescencia también lo hace. Si posteriormente se representa el incremento en la fluorescencia frente al número de ciclo, se genera la curva de amplificación, de la cual se puede extraer el valor Cq (*quantification cycle*). Este valor se conoce también como Ct (*threshold cycle*), Cp (*crossing point*), o TOP (*take-off point*) —términos todos ellos acuñados por diferentes empresas fabricantes de los equipos. El valor Cq corresponde al número de ciclos para los cuales la cantidad de fluorescencia (y por extensión, de ADN molde), es significativamente superior a la fluorescencia de fondo. Por lo tanto, el valor Cq puede asociarse a la concentración inicial del ADN diana, y sirve como base para la cuantificación absoluta o relativa de este (Postollec *et al.*, 2011; Wilhelm y Pingoud, 2003).

La tecnología de PCR en tiempo real presenta una serie de ventajas con relación a la técnica de PCR convencional, entre las que destacan una mayor velocidad de análisis, ya que no es necesario realizar una electroforesis para detectar los productos finales, y una mayor sensibilidad de los fluorocromos empleados para detectar el amplicón. Sin embargo, esta técnica presenta el inconveniente de precisar de un equipo más caro y complejo (Valasek y Repa, 2005).

En la bibliografía se encuentran numerosas referencias de la aplicación de técnicas de PCR y PCR en tiempo real para la detección de ingredientes alergénicos en alimentos (**Tabla 2.3**) y también se dispone de algunos kits comerciales que se basan en estas tecnologías (**Tabla 2.4**). Los kits comerciales basados en la detección de ADN incluyen tanto métodos de PCR convencional como de PCR en tiempo real, que se emplean como ensayos cualitativos y semicuantitativos, respectivamente, y que permiten realizar en algunas ocasiones análisis multiplex. Estos kits comerciales suelen proporcionar la mezcla de reacción, un control positivo de amplificación, un control negativo, la enzima Taq polimerasa, y en el caso de tratarse de ensayos de PCR en tiempo real, un marcador fluorescente. No obstante, estos test no suelen incluir los reactivos necesarios para realizar la extracción de ADN. En el caso de los kits de PCR de punto final, estos suelen incluir un tampón de carga coloreado en la mezcla de reacción, lo que evita una mayor manipulación de las muestras (Diaz-Amigo y Popping, 2009; Robert, 2009). Otra alternativa posible es el uso de kits comerciales de PCR-ELISA, que permiten la detección de la secuencia diana de ADN mediante una técnica inmunoenzimática. Para ello, el gen de interés se amplifica mediante PCR en presencia de desoxiuridina trifosfato (dUTP) marcada con digoxigenina. Posteriormente, los productos de PCR se unen a sondas oligonucleotídicas

Tabla 2.3. Métodos publicados basados en la detección de ADN para la detección de frutos de cáscara y cacahuete.

| Método | Gen diana | LOD | Matrices alimentarias en las que se ha ensayado | Referencia |
|----------------------------|-------------------------------|------------------------|--|--|
| Cacahuete | | | | |
| PCR | <i>Ara h 7</i> <i>trnL</i> | 10 ppm no declarado | Productos comerciales no declarado | Watanabe <i>et al.</i> , 2006 James y Schmidt, 2004 |
| PCR en tiempo real | <i>Ara h 1</i> | 50 ppm | Productos comerciales | Zhang <i>et al.</i> , 2015 |
| | <i>ITS1</i> | 0.1 ppm | Productos comerciales | López-Calleja <i>et al.</i> , 2013a* |
| | <i>Ara h 2</i> | 10 ppm | | |
| | <i>Ara h 3</i> | 10 ppm | Galletas | Scaravelli <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>Ara h 2</i> | 10 ppm | Productos comerciales | Stephan y Vieths, 2004 |
| PCR en tiempo real anidada | <i>Ara h 2</i> | 2 ppm | Galletas | Hird <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>Ara h 3</i> | 0.375 pg | Trigo, soja, maíz, cebada, centeno, arroz, otros frutos de cáscara | Bergerová <i>et al.</i> , 2011 |
| Almendra | | | | |
| PCR en tiempo real | <i>ITS1</i> | 0.1 ppm | Productos comerciales | López-Calleja <i>et al.</i> , 2014b* |
| | <i>Pru du 1</i> | 1 ppm | Productos comerciales | Prieto <i>et al.</i> , 2014 |
| | <i>Pru du 3</i> | | | |
| | <i>Pru du 4</i> | | | |
| | <i>Pru du 6</i> | | | |
| PCR en tiempo real anidada | <i>Pru du 3</i> | 5 ppm | Productos comerciales | Röder <i>et al.</i> , 2011 |
| | <i>Pru 1</i> | no declarado | Galletas | Pafundo <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>Pru du 6</i> | 50 ppm | Trigo, soja, maíz, cebada, centeno, arroz, otros frutos de cáscara | Costa <i>et al.</i> , 2013b |
| PCR en tiempo real + HRM | <i>Pru du 5</i> | 50 ppm | Productos comerciales | Costa <i>et al.</i> , 2012b |
| Nuez de Brasil | | | | |
| PCR en tiempo real | <i>Ber e 1</i> | 2.5 ppm | Productos comerciales | de la Cruz <i>et al.</i> , 2013* |
| | <i>Ber e 2</i> | 1000 ppm | Productos comerciales | Brezná <i>et al.</i> , 2010 |
| | <i>Ber e 1</i> | 5 ppm | Productos comerciales | Röder <i>et al.</i> , 2010 |
| Avellana | | | | |
| PCR | <i>Cor a 1</i> | 5 pg | Productos comerciales | Germini <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>nad1</i> | 10 ppm | Chocolate | Herman <i>et al.</i> , 2003 |
| PCR en tiempo real | <i>Cor a 1</i> | 10 ppm | Productos comerciales | Holzhauser <i>et al.</i> , 2000 |
| | <i>Cor a 9</i> | 1 ppm | Productos comerciales | Iniesto <i>et al.</i> , 2013 |
| | <i>Cor a 11</i> | | | |
| | <i>Cor a 13</i> | | | |
| | <i>ITS1</i> | 0.1 ppm | Productos comerciales | López-Calleja <i>et al.</i> , 2013b* |
| | <i>Cor a 8</i> | 10 ppm | Productos comerciales | D'Andrea <i>et al.</i> , 2011 |
| | <i>Cor a 1</i> | 3.2 pg de ADN | no declarado | Platteau <i>et al.</i> , 2011 |
| | <i>Cor a 8</i> | | | |
| | <i>Cor a 8</i> | 20 copias de ADN | Productos comerciales | D'Andréa <i>et al.</i> , 2009 |
| PCR en tiempo real anidada | <i>hsp1</i> | 100 ppm | Productos comerciales | Piknová <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>Cor a 1.04</i> | 0.1 ng de ADN | Productos comerciales | Arlorio <i>et al.</i> , 2007 |
| | <i>HSP1</i> | 50 ppm | Productos comerciales | Costa <i>et al.</i> , 2012c |
| Anacardo | | | | |
| PCR en tiempo real | <i>ITS1</i> | 0.1 ppm | Productos comerciales | López-Calleja <i>et al.</i> , 2015a* |
| | <i>Ana o 3</i> | 2 ppm | Salsa pesto | Ehlert <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>Ana o 3</i> | 100 ppm | Productos comerciales | Piknová y Kuchta, 2007 |
| | <i>Ana o 3</i> | 100 ppm | Galletas | Brzezinski, 2006 |
| Nuez | | | | |
| PCR | <i>matK</i> | 10 ppm | Productos comerciales | Yano <i>et al.</i> , 2007 |
| PCR en tiempo real | <i>Jug r 3</i> | 100 ppm | Productos comerciales | Linacero <i>et al.</i> , 2016 |
| | <i>ITS1</i> | 0.1 ppm | Productos comerciales | López-Calleja <i>et al.</i> , 2015b* |
| | <i>Jug r 2</i> | 100 ppm | Productos comerciales | Brezná <i>et al.</i> , 2006 |
| | <i>Jug r 2</i> | 10 ppm | Productos comerciales | Wang <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>Jug r 3</i> | 50 ppm | Bizcocho | Costa <i>et al.</i> , 2013a |
| Pistacho | | | | |
| PCR | <i>Rbcl</i> | 100 ppm | Mortadela | Barbieri y Frigeri, 2006 |
| PCR en tiempo real | <i>ITS1</i> | 0.1 ppm | Productos comerciales | López-Calleja <i>et al.</i> , 2014a* |
| | <i>ITS1</i> | 4 ppm | Productos comerciales | Brezná <i>et al.</i> , 2008 |
| Pacana | | | | |
| PCR en tiempo real | <i>ITS1</i> | 0.1 ppm | Productos comerciales | López-Calleja <i>et al.</i> , 2015b* |
| | <i>Car i 2</i> | 100 ppm | Productos comerciales | Brezná y Kuchta, 2008 |
| Macadamia | | | | |
| PCR en tiempo real | <i>ITS1</i> | 0.1 ppm | Productos comerciales | López-Calleja <i>et al.</i> , 2015a* |
| | <i>Vicilina</i> | 200 ppm | Productos comerciales | Brezná <i>et al.</i> , 2009 |

* Métodos desarrollados por nuestro grupo.

2. INTRODUCCIÓN

Tabla 2.3. (Continuación)

| Alérgeno | Método | Gen diana | LOD | Matrices alimentarias en las que se ha ensayado | Referencia | | | | |
|------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------|---|------------------------------|----------------|--------|-----------------------|------------------------------------|
| Multiplex | | | | | | | | | |
| Avellana | PCR – electroforesis capilar | <i>Cor a 1</i> | 50 ppm | Productos comerciales | Cheng <i>et al.</i> , 2016 | | | | |
| Pistacho | | <i>Pis v 1</i> | | | | | | | |
| Avena | | <i>Avenin</i> | | | | | | | |
| Sésamo | | <i>Ses i 1</i> | | | | | | | |
| Cacahuete | | <i>Ara h 2</i> | | | | | | | |
| Anacardo | | <i>Ana o 3</i> | | | | | | | |
| Cebada | | <i>B1 hordein</i> | | | | | | | |
| Trigo | | <i>Gliadin</i> | | | | | | | |
| Soja | | <i>Gly m Bd 28K</i> | | | | | | | |
| Pacana | | <i>Car i 4</i> | | | | | | | |
| Cacahuete | Multiplex PCR | <i>Ara h 1</i> | 10 ppm | Harina de trigo | Renčová <i>et al.</i> , 2014 | | | | |
| Avellana | | <i>Cor a 1</i> | | | | | | | |
| Nuez de Brasil | Multiplex PCR | <i>Ber e 1</i> | 1000 ppm | Productos comerciales | Hubalkova y Rencova, 2011 | | | | |
| Pecana | | <i>Vicilin-like protein</i> | | | | | | | |
| Cacahuete | Multiplex PCR | <i>Ara d 2</i> | 100 ppm | Productos comerciales | Köppel <i>et al.</i> , 2010 | | | | |
| Avellana | | <i>Cor a 1</i> | | | | | | | |
| Apio | | <i>Mtd</i> | | | | | | | |
| Soja | | <i>Le1</i> | | | | | | | |
| Huevo | | <i>TGFB3</i> | | | | | | | |
| Leche | | <i>tRNA-Lys</i> | | | | | | | |
| Almendra | | <i>Pru av 1</i> | | | | | | | |
| Sésamo | | <i>Ses i 4</i> | | | | | | | |
| Avellana | | Multiplex PCR | | | | <i>Cor a 1</i> | 50 ppm | Productos comerciales | Schöringhumer <i>et al.</i> , 2009 |
| Sésamo | | | | | | <i>Ses i 1</i> | | | |
| MLPA | | | | | | | | | |
| Sésamo | LPA | <i>Ses i 1</i> | 40 ppm | Productos comerciales | Mustorp <i>et al.</i> , 2011 | | | | |
| Soja | | <i>Le1</i> | | | | | | | |
| Avellana | | <i>Cor a 1.04</i> | | | | | | | |
| Cacahuete | | <i>Ara h 2</i> | | | | | | | |
| Altramuz | | <i>ITS1</i> | | | | | | | |
| Gluten | | <i>Glud 1</i> | | | | | | | |
| Mostaza | | <i>Sin a 1</i> | | | | | | | |
| Apio | | <i>Mtd</i> | | | | | | | |
| Cacahuete | | LPA | | | | <i>Ara h 2</i> | 5 ppm | Productos comerciales | Ehlert <i>et al.</i> , 2009 |
| Anacardo | | | | | | <i>Ana o 3</i> | | | |
| Pacana | <i>Car i 2</i> | | | | | | | | |
| Pistacho | <i>Cor gene</i> | | | | | | | | |
| Avellana | <i>Cor a 1.0401</i> | | | | | | | | |
| Sésamo | <i>Ses i 3</i> | | | | | | | | |
| Macadamia | <i>AMP2</i> | | | | | | | | |
| Almendra | <i>Extensin</i> | | | | | | | | |
| Nuez | <i>Jug r 2</i> | | | | | | | | |
| Nuez de Brasil | <i>Ber e 1</i> | | | | | | | | |

Tabla 2.4. Kits de PCR comerciales para la detección de alérgenos alimentarios.

| Nombre de la Compañía | | | | | | |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|------------|----------|-------------------------|
| R-Biopharm | 4Lab Diagnostics | Biotecon Diagnostics | Innosieve Diagnostics | Kogene | Gen-ial | Mayflower Bioscience |
| Almendra | Almendra | Apio | Apio | Cacahuete | Almendra | Almendra |
| Altramuz | Altramuz | Avellana | Avellana | Crustáceos | Altramuz | Anacardo |
| Apio | Anacardo | Cacahuete | Cebada | Huevos | Anacardo | Apio |
| Avellana | Apio | Gluten | Centeno | Leche | Apio | Avellana |
| Cacahuete | Avellana | Soja | Mostaza | Soja | Avellana | Cacahuete |
| Crustáceos | Cacahuete | | Nuez | | Mostaza | Macadamia |
| Gluten | Crustáceos | | Soja | | Sésamo | Nuez |
| Leche | Gluten | | Trigo | | Soja | Nuez de Brasil |
| Macadamia | Moluscos | | | | | Pacana |
| Moluscos | Mostaza | | | | | Pistacho |
| Mostaza | Nuez | | | | | |
| Pescado | Pacana | | | | | |
| Sésamo | Pistacho | | | | | |
| Soja | Sésamo | | | | | |
| | Soja | | | | | |

R-Biofarm: <http://www.r-biopharm.com/>

4Lab Diagnostics: <http://www.4labdiagnostics.com>

Biotecon Diagnostics: <http://www.bc-diagnostics.com/products/kits/real-time-pcr/>

Innosieve Diagnostics: <http://www.innosieve.com/>

Kogene: <http://www.kogene.co.kr/eng/productlist/real.php>

Gen-ial: <http://www.gen-ial.de/index.php/en/products/pcr-detection-kits/gencontrol-kits/>

Mayflower Bioscience: <http://www.mayflowerbio.com/home>

específicas que están marcadas con biotina en su extremo 5'. Una etapa posterior implica la inmovilización de la secuencia de interés a una superficie de soporte tapizada con estreptavidina. La biotina del extremo 5' formará un complejo con la estreptavidina, por lo que únicamente se unirán los productos de PCR que posean la secuencia de interés, mientras que el resto de productos inespecíficos se eliminarán mediante lavados. Los amplicones se detectan empleando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con una enzima. La adición del sustrato cromogénico permitirá el desarrollo de color cuya absorbancia podrá leerse en un espectrofotómetro (Sue *et al.*, 2014; Robert, 2009).

2.2.2.2 MLPA

La amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) fue descrita por Schouten *et al.*, 2002, y como su nombre indica, la amplificación de las sondas está condicionada por un paso previo de ligación, que solo tiene lugar si la secuencia de ADN diana está presente en la muestra. Para una secuencia determinada de ADN diana, se diseñan dos hemi-sondas adyacentes de modo que una contenga el cebador directo y la otra el inverso. Uno de los cebadores estará marcado con un fluoróforo que permite su detección mediante electroforesis capilar. Además del oligonucleótido correspondiente al cebador, las sondas poseen otro oligonucleótido que será responsable de hibridar con la secuencia diana. Asimismo, una de las dos hemi-sondas posee un fragmento de relleno (*stuffer sequence*), que permite modificar la longitud de la sonda en función de las necesidades del experimento.

La reacción de MLPA se divide en 5 etapas: 1) Desnaturalización del DNA e hibridación con las hemi-sondas MLPA; 2) reacción de ligación; 3) PCR; 4) separación de los productos amplificados mediante electroforesis; 5) análisis de los datos. Durante la primera etapa, el DNA se desnaturaliza e incuba toda la noche con una mezcla de hemi-sondas MLPA. Si la secuencia diana está presente en la muestra, los oligonucleótidos de las sondas hibridan con esta. Únicamente cuando las dos hemi-sondas han hibridado puede producirse la ligación en una etapa posterior, y solo las sondas ligadas se amplificarán durante la reacción de PCR, por lo que el número de productos de ligación de sonda es una medida del número de secuencias diana presentes en la muestra. Posteriormente los productos se separan mediante electroforesis capilar. Puesto que cada hemi-sonda solo posee la secuencia de un cebador, cuando no se produce la ligación de las sondas, no se pueden amplificar, por lo que no se genera señal. La cantidad de producto de PCR es por tanto proporcional a la cantidad de ADN diana presente en la muestra. En esta técnica es posible emplear múltiples pares de hemi-sondas simultáneamente que se amplifican con el mismo par de cebadores, y para llevarla a cabo solo se precisa de un termociclador y de un equipo de electroforesis capilar.

Si bien la técnica de MLPA inicialmente se desarrolló para la detección de deleciones, duplicaciones, trisomías, aberraciones cromosómicas, SNP y mutaciones en el genoma humano, recientemente se ha aplicado al análisis de alimentos. Ehlert *et al.*, 2009 y Mustorp *et al.*, 2011, en sendas publicaciones, abordaron la detección simultánea mediante MLPA de varios alérgenos alimentarios de declaración obligatoria. Los primeros aplican la técnica de MLPA a la detección de cacahuete, anacardo, pacana, pistacho, avellana, sésamo, macadamia, nuez, almendra y nuez de Brasil, alcanzando un LOD de 5 mg kg⁻¹, mientras que los segundos la emplean en la detección de sésamo, soja, avellana, cacahuete, altramuz, gluten, mostaza y apio, con un LOD de alrededor de 10 mg kg⁻¹, en función del ingrediente analizado.

2.2.2.3 Biosensores de ADN

La tecnología de los biosensores se ha empleado mayoritariamente en aplicaciones basadas en el uso de anticuerpos, sin embargo los biosensores también poseen el potencial de detectar ADN o productos de PCR. En este sentido, Sun *et al.*, 2012 desarrollaron un biosensor electroquímico de ADN para detectar el alérgeno de cacahuete Ara h 1 en bebida de cacahuete. Para ello, ensamblaron en un electrodo de oro una sonda *stem-loop* marcada de forma dual en 5'-SH y 3' -biotina. Cuando la diana estaba ausente, la sonda *stem* estaba en posición "cerrada", y tras hibridar con el oligonucleótido diana, la conformación cambiaba a "abierta". Este cambio en la sonda modificaba la eficiencia en la transferencia de electrones. Tortajada-Genaro *et al.*, 2012, desarrollaron un método de microarray de ADN sobre un DVD para detectar de manera simultánea la presencia de avellana, cacahuete y soja en alimentos, con LOD de 1 mg kg⁻¹. Para ello imprimieron la superficie del DVD con estreptavidina, a la que unieron las sondas biotiniladas en posición 5'. Estas sondas hibridaron con los productos de PCR marcados con digoxina, y se detectaron posteriormente con un anticuerpo frente a digoxigenina marcado con peroxidasa. Por su parte, D'Agata *et al.*, 2010, desarrollaron un biosensor SPR empleando una sonda de ácido peptidonucleico inmovilizada como receptor, que fue capaz de detectar ADN de soja sin amplificar hasta 4.1·10⁻²⁰ M. Berti *et al.*, 2009, emplearon una plataforma microfluídica para el desarrollo de un ensayo genomagnético ligado a enzimas de detección electroquímica para detectar la presencia del alérgeno Cor a 1.04 de avellana, con un LOD de 0.2 nM. Sánchez-Paniagua *et al.*, 2014 desarrollaron un genosensor electroquímico para la detección de una secuencia nucleotídica específica de ADN que codifica el alérgeno de cacahuete Ara h 2, alcanzando un LOD de 10 pM. Finalmente, Martín-Fernández *et al.*, 2016 utilizan un genosensor electroquímico para detectar y cuantificar la presencia de gluten en muestras de alimentos con un LOD de 10 mg kg⁻¹.

2.3 GENOTECAS DE FAGOS RECOMBINANTES

Las técnicas inmunológicas disponibles para la detección de alérgenos en alimentos emplean anticuerpos, policlonales o monoclonales, obtenidos mediante la inmunización de animales con extractos de proteínas solubles totales o proteínas purificadas, alergénicas o no, de

la especie de interés. En el caso particular de los anticuerpos monoclonales, estos se obtienen a través de la tecnología de producción de hibridomas de ratón, desarrollada en 1975 por Georges Köhler y Cesar Milstein del *Medical Research Council (MRC) Laboratory of Molecular Biology*, de Cambridge (Reino Unido). Esta estrategia precisa de la inmunización previa de los animales, su posterior eutanasia y recogida del bazo, del cual se obtienen los linfocitos B productores de anticuerpos, que se fusionan con células de mieloma para formar células híbridas (hibridomas), que pueden propagarse de manera indefinida en cultivo. De entre todos los hibridomas, se seleccionan los mejores clones para producir los anticuerpos monoclonales (Köhler y Milstein, 1975). No obstante, la tecnología de los hibridomas presenta una serie de inconvenientes asociados a la falta de inmunogenicidad de algunos antígenos, a su limitación al conjunto de isotipos naturales de anticuerpos, a la aparición de respuestas inmunes inadecuadas provocadas por los monoclonales murinos (Ascione *et al.*, 2005; Hwang y Foote, 2005; Rahman *et al.*, 2003; Srinivas *et al.*, 1994), así como otros problemas asociados a la expresión de anticuerpos completos, como son el coste, los patrones de glicosilación, y la falta de etiquetas que permitan su posterior purificación (Birch y Racher, 2006).

En la actualidad, la bioética trata de reducir, en la medida de lo posible, el empleo de animales con fines experimentales, y en todos los casos, evitar las prácticas que puedan provocarles sufrimiento innecesario. Esto se ha visto reflejado en la Directiva Europea 2010/63/EU (transpuesta a la legislación española mediante el Real Decreto 53/2013) que, en cumplimiento del principio de las Tres Rs de Russel y Burch (Russell y Burch, 1959), promueve el reemplazo de los animales vivos utilizados en procedimientos experimentales por métodos alternativos que no conlleven su uso. En este sentido, la tecnología de *phage display* o de expresión en fagos, basada en la expresión de miles de millones de diferentes fragmentos de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos, se presenta como una alternativa a la producción de anticuerpos monoclonales. En la actualidad existen varias genotecas comerciales de fagos recombinantes que expresan fragmentos de anticuerpos humanos o murinos de diversos tipos, como los scFv (VL-VH), Fab (VL-CL+VH-CH1) y scFab (VL-CL-VH-CH1), y también se dispone de genotecas de fagos que expresan péptidos de secuencia aleatoria y longitud determinada (Davies *et al.*, 2000). A partir de una genoteca de fago-anticuerpos (repertorios de fragmentos de anticuerpos expresados en la superficie del fago) se pueden seleccionar, mediante un procedimiento de selección por afinidad denominado *biopanning*, las poblaciones de fagos que expresen ligandos con afinidad por una determinada molécula diana. La principal ventaja que ofrece la técnica de expresión en fagos radica en la facilidad y rapidez con la que se pueden seleccionar fragmentos de anticuerpos específicos a partir de un gran número de clones diferentes. Además, debido a que los fagos seleccionados se pueden amplificar por propagación en *E. coli*, es posible realizar múltiples rondas de *biopanning*, con la finalidad de reducir la selección a aquellas secuencias que tengan una unión más fuerte y específica con la molécula diana.

2.3.1 Tecnología de *phage display*

La tecnología de *phage display* fue descrita por primera vez por Smith *et al.*, 1985, y consiste en la expresión de proteínas recombinantes, como puede ser un fragmento de anticuerpo, en la superficie de un fago filamentoso que contiene en su interior la secuencia del gen codificante de la proteína expresada. La principal ventaja que presenta esta tecnología es la unión existente entre el fenotipo del fago (la proteína expresada en superficie) y su genotipo (la secuencia de ADN que la codifica).

A diferencia de la tecnología de hibridomas, el *phage display* permite la selección de anticuerpos frente a un gran abanico de dianas moleculares, tanto biológicas como no biológicas, incluyendo auto-antígenos y toxinas, a la par que evita por completo el uso de animales vivos. Además, al realizarse *in vitro*, esta tecnología permite un mayor control sobre las condiciones de selección y cribado, posibilitando por ejemplo la inclusión de moléculas competidoras que puedan dirigir la selección hacia dianas específicas, y puesto que emplea cultivos de microorganismos, los protocolos son más sencillos. Una ventaja adicional del empleo de moléculas seleccionadas por expresión en fagos es la posibilidad de manipularlas genéticamente para añadirles nuevos dominios que les confieran propiedades específicas, como diversos tipos de marcaje que favorezcan su purificación, detección o utilización en diversas técnicas analíticas, o aplicaciones terapéuticas (De Genst *et al.*, 2015).

La tecnología del *phage display* requiere de la existencia de una genoteca de partículas víricas que expresen en su superficie una gran diversidad de péptidos o fragmentos de anticuerpos, para poder seleccionar aquellos que muestren mayor afinidad de unión a la molécula diana. El fago filamentoso M13 ha sido el vector más comúnmente utilizado para la creación de este tipo de genotecas (Ståhl *et al.*, 2013).

2.3.2 Fago filamentoso M13

El bacteriófago (fago) filamentoso M13 es un virus que infecta específicamente a células de *E. coli* portadoras del factor F. Tiene un tamaño de alrededor de 1-2 μm de longitud y unos 6-7 nm de anchura, y está constituido por una molécula de ADN monocatenaria y circular de aproximadamente 6400 nucleótidos de longitud. El genoma del fago M13 posee cinco genes, y se encuentra contenido en una cápside de estructura tubular, en cuya composición intervienen cinco proteínas diferentes. El producto del gen VIII es la proteína estructural principal del fago (pVIII), y es la que conforma la estructura que alberga al genoma vírico (constituida por unas 2700 copias de esta proteína). Uno de los extremos del fago está recubierto por cinco copias de cada una de las llamadas proteínas menores: pIII y pVI. El otro extremo posee de tres a cinco copias de las proteínas pVII y pIX (**Figura 2.2**). Las proteínas que con más asiduidad se utilizan para la fusión de las proteínas heterólogas son la pIII (para expresión de bajo nivel, con 1-5 copias de la proteína por fago) y la pVIII (para expresión de alto nivel, con más de 1000 copias de la proteína

recombinante por fago). No obstante, existe una limitación en el tamaño de la proteína recombinante a expresar, puesto que péptidos de gran tamaño pueden interferir con la función de la proteína de recubrimiento durante el empaquetado de los viriones o la infección de la bacteria. Debido a su accesibilidad al solvente, el péptido expresado por el fago se comportará, de manera general, como si no estuviese ligado a la superficie del virión (Adda *et al.*, 2002; Casali y Preston, 2003; Sidhu, 2001; Smith y Petrenko, 1997).

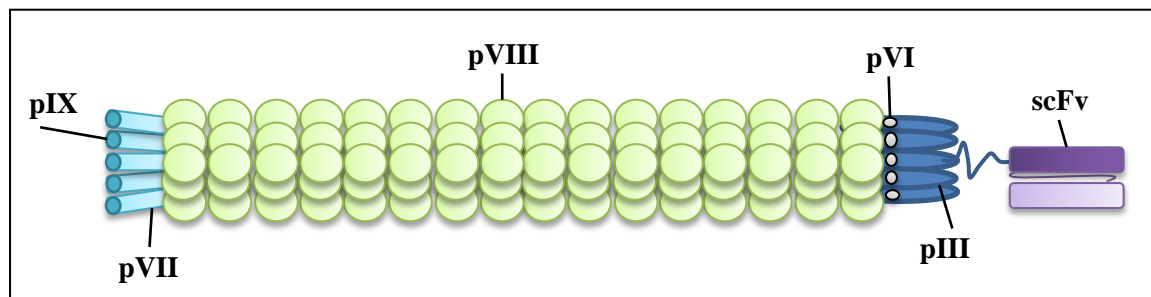


Figura 2.2. Representación esquemática del fago M13 en la que se muestran sus cinco proteínas de superficie (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX) y un scFv expresado como fusión a la proteína pIII.

La proteína pIII posee unos 406 aminoácidos, y está implicada en el proceso de adsorción del virus al pilus bacteriano que tiene lugar durante la infección. Tras la penetración del virus en el hospedador bacteriano, la proteína estructural del fago se elimina, y el ADN vírico, así como la proteína pIII, penetran en el interior de la bacteria. Una vez allí, el ADN monocatenario del virus se convierte en una doble hebra circular, denominada forma replicativa. Durante los 15-20 primeros minutos que transcurren tras la infección, las hebras de ADN monocatenario hijas se convierten a la forma replicativa para servir de molde para más fases de transcripción y síntesis de hebras hijas adicionales. Después de alcanzar las 100-200 copias de ADN, se detiene el proceso, y se comienza con el ensamblaje de las nuevas partículas víricas. Este tiene lugar en la membrana bacteriana, y en él el genoma viral se recubre con la cápside proteica mientras se extruye a través de la membrana bacteriana. Hay que tener en cuenta que en la infección por este tipo de fagos no se produce la lisis de las células bacterianas, por lo que el crecimiento de estas continúa, aunque a una velocidad inferior a la normal, mientras se producen varios cientos de partículas víricas por célula. Esto se traduce en una gran acumulación de partículas víricas en el medio, con títulos de fagos que exceden con facilidad las 10^{12} ufp mL⁻¹ (Pande *et al.*, 2010; Sambrook y Russell, 2006; Sergeeva *et al.*, 2006).

2.3.3 Fagémidos

Cuando se desea expresar un único polipéptido de tamaño considerable (como puede ser un fragmento de anticuerpo) mediante *phage display*, se suele recurrir al uso de fagémidos. El fagémido es un plásmido que posee el origen de replicación y la señal de empaquetamiento del

fago, así como la secuencia nucleotídica de la proteína recombinante que se va a expresar como fusión a la proteína estructural del fago, y un gen de resistencia a antibióticos. El fagémido produce grandes cantidades de la proteína recombinante expresada, pero es incapaz de construir un fago a menos que la bacteria portadora del fagémido también contenga un fago ayudante que proporcione el resto de proteínas necesarias para conformar un fago funcional. Los fagos ayudantes presentan una serie de modificaciones con respecto a la secuencia nucleotídica de un fago "normal", y es que estos poseen una señal de empaquetamiento defectiva, así como un gen de resistencia a antibióticos (diferente al del fagémido). El hecho de que el fago ayudante posea una señal de empaquetamiento defectiva no implica que este no pueda producir más viriones cuando se encuentra infectando una bacteria. No obstante, cuando se encuentra presente el fagémido, que sí contiene una señal de empaquetamiento adecuada, se empaquetará este dentro de la cápside en detrimento del fago ayudante. Como resultado, los fagémidos que se obtienen son fenotípicamente y genotípicamente heterogéneos, puesto que la proteína estructural empleada para fusionar la proteína recombinante puede ser de tipo normal (*wt*, *wild type*), si proviene del fago ayudante, o recombinante, si proviene del fagémido. El genoma contenido en la cápside puede ser del fago ayudante o del fagémido. Son los genes de resistencia a antibióticos que poseen tanto el fago ayudante como el fagémido los que permiten la selección exclusiva de aquellas bacterias que contengan tanto el fagémido como el fago ayudante (Bradbury y Marks, 2004; Bratkovic, 2010; Weisser y Hall, 2009).

2.3.4 Genotecas de fragmentos de anticuerpos de tipo scFv

El sitio de unión al antígeno de un anticuerpo está compuesto por seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *complementary determining regions*), o regiones hipervariables: tres en el dominio variable de la cadena ligera (VL o V_L) y tres en el dominio variable de la cadena pesada (VH). La expresión de sitios funcionales de unión al antígeno (*i.e.* scFv) en la superficie de bacteriófagos ha permitido realizar procesos de selección de anticuerpos frente al antígeno de elección sin la necesidad de emplear la tecnología de los hibridomas. Los scFv son pequeños fragmentos de anticuerpos con un tamaño aproximado de unos 28 kDa, constituidos por los dominios variables de las cadenas ligera y pesada de las inmunoglobulinas en cualquier orden, unidos mediante un péptido conector de unos quince aminoácidos (**Figura 2.3**). De este modo, las genotecas de fragmentos de anticuerpos de tipo scFv consisten en combinaciones aleatorias de regiones variables de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos, que presentan una gran diversidad, y que se expresan como proteínas de fusión a una de las proteínas estructurales del fago, normalmente la proteína pIII (Hoogenboom, 2005).

2.3.5 Biopanning

El proceso de selección *in vitro* de scFv a partir de genotecas de fagos recombinantes se conoce como *biopanning*, y consiste en la exposición de los scFv al antígeno, para permitir seleccionar

aquellos fagos que expresen fragmentos de anticuerpos con mayor afinidad por la molécula diana, en una serie de etapas con las que se pretende imitar el proceso de expansión clonal de linfocitos B que tiene lugar *in vivo*. Con esto se consigue seleccionar de entre los cientos de millones de fagos que componen la genoteca, una subpoblación de fagos con mayor afinidad de unión por el ligando. Para realizar el *biopanning*, la genoteca de fagos se incuba con el antígeno diana que se encuentra tapizando una superficie de soporte. Las partículas de fagos no unidas o unidas inespecíficamente a la molécula diana se eliminan mediante sucesivas etapas de lavado. Posteriormente, los fagos unidos se separan mediante un descenso brusco de pH, un cambio brusco de la fuerza iónica del medio, o por digestión con proteasas. El número de partículas víricas que se emplea al comienzo de una ronda de selección es de aproximadamente 10^{12} ufp mL⁻¹, con lo que se consigue que cada clon esté representado de media por unos 100 individuos. La subpoblación obtenida representa solo una pequeña fracción de la inicial, en la cual los clones con mayor afinidad por la diana se encuentran en mayor número. Esta subpoblación puede amplificarse de nuevo infectando un cultivo fresco de *E. coli* (Adda *et al.*, 2002; Smith y Petrenko, 1997). Como a menudo se produce la unión inespecífica de los fagos (normalmente a la superficie de soporte), suelen ser necesarias varias rondas de *biopanning* para enriquecer la genoteca con aquellos clones que posean la mejor afinidad de unión (Menendez y Scott, 2005; Thomas *et al.*, 2010) (**Figura 2.4**).

Tras finalizar el proceso de selección, se comprueba, habitualmente mediante ELISA, la capacidad de unión de los clones de fagos seleccionados frente al antígeno, y se realiza la identificación de la secuencia nucleotídica de estos.

2.3.6 Genoteca Tomlinson I + J

En las genotecas Tomlinson I + J, desarrolladas por el laboratorio del Dr. Greg Winter en el MRC *Laboratory of Molecular Biology*, los fagos expresan anticuerpos recombinantes humanos de tipo scFv, constituidos por un único polipéptido que contiene los dominios VH (V3-23/DP-47 y JH4b) y Vk (O12/O2/DPK9 y Jk1) unidos mediante un conector flexible de glicina y serina. La disposición canónica (VH: 1-3, Vk: 2-1-1) codificada por esta estructura es la más común en el repertorio de anticuerpos humanos. La CDR3 ha sido diseñada para ser lo más corta posible, pero manteniendo la capacidad de constituir una superficie de unión al antígeno. En ambas genotecas, en la CDR3 se conservan 7 residuos de aminoácidos, y la variabilidad se introduce con las regiones CDR2 y CDR3, mientras que la secuencia de la región CDR1 se mantiene constante. Los scFv se expresan como proteínas de fusión a la proteína pIII del fago M13. Estas genotecas *naïve* están constituidas por unos 10^8 clones diferentes de fagémidos, obtenidos a partir de linfocitos B de donantes humanos no inmunizados, a partir de los que, mediante transcripción inversa y amplificación por PCR, se obtuvieron los genes de las cadenas ligera y pesada de la región variable de las inmunoglobulinas, que posteriormente se subclonaron en el fagémido pIT2 (**Figura 2.5**), que posee el gen de resistencia a ampicilina. Los fagémidos se encuentran

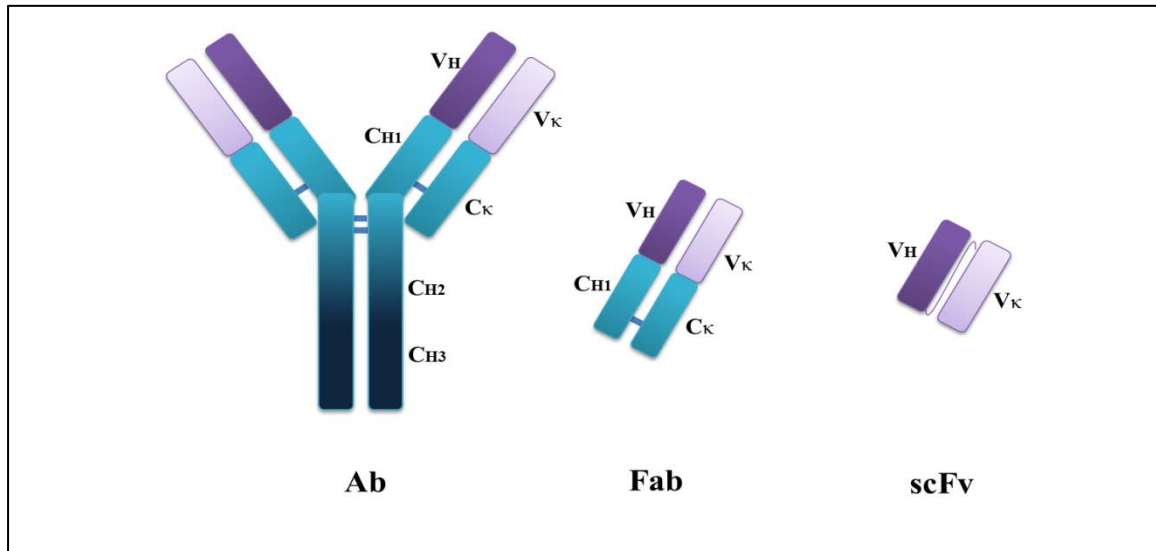


Figura 2.3. Representación esquemática de un anticuerpo (Ab), un fragmento de unión al antígeno (Fab) y un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). VH, región variable de la cadena pesada; VK, región variable de la cadena ligera; CH1-3, regiones constantes de la cadena pesada; CK, región variable de la cadena pesada. Las cadenas ligera y pesada de los Ab y Fab se encuentran unidas mediante puentes disulfuro, mientras que las cadenas ligera y pesada de los scFv lo están mediante un conector de serina y glicina.

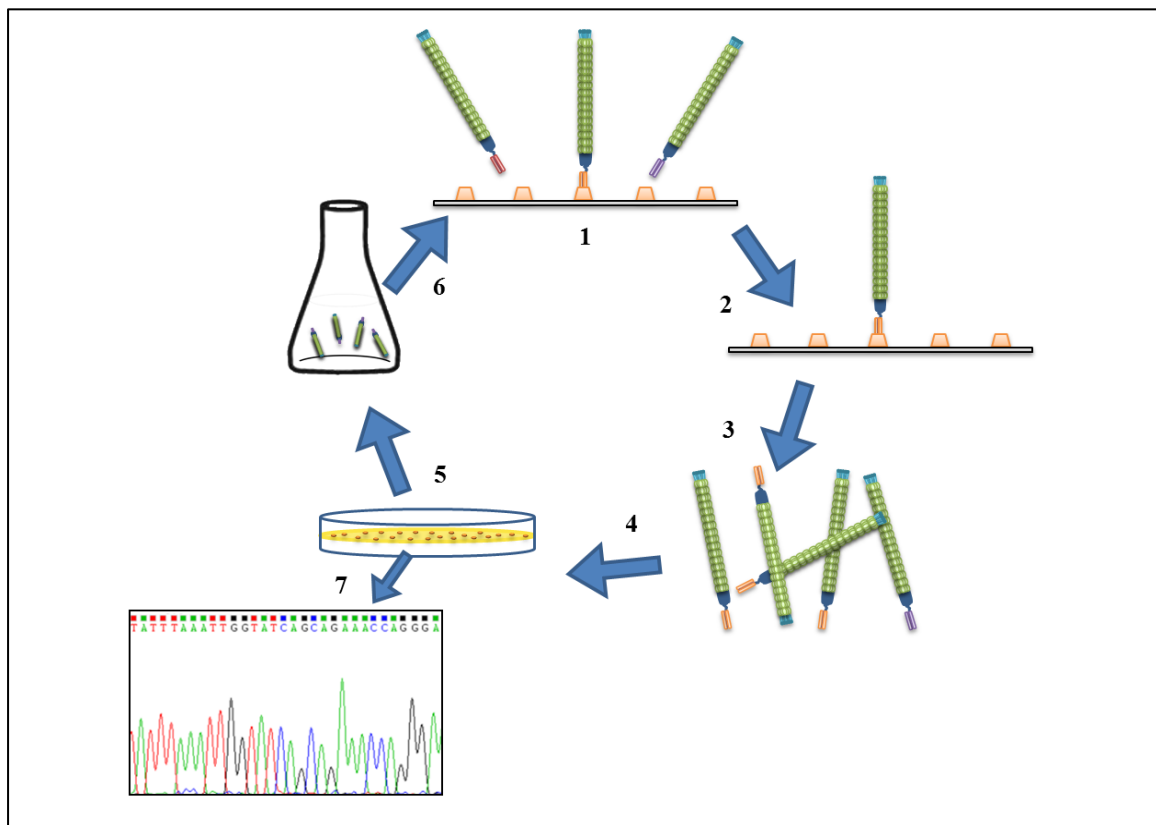


Figura 2.4. Representación esquemática de la técnica de *biopanning*. (1) Tras inmovilizar el antígeno en la superficie de soporte, la genoteca de fagos se expone al antígeno; (2) aquellos fagos que no se unen se retiran mediante una serie de lavados; (3) se eluyen los fagos unidos al antígeno, que se emplean para infectar un cultivo nuevo de bacterias (4); (5) los clones de fagos aislados en la primera ronda se amplifican, enriqueciéndose la genoteca en clones con mayor afinidad por el antígeno; (6) los fagos amplificados se emplean en sucesivas rondas de selección; (7) finalizado el proceso, se seleccionan colonias individuales para su secuenciación.

transformando células de *E.coli* de la cepa TG1 (K12Δ (lac-proAB) supE thi hsdD5/F' traD36 proA+B lacIq lacZ M15). El fago ayudante que emplea es el KM13, que posee resistencia a kanamicina (Goletz *et al.*, 2002; Tomlinson *et al.*, 1992).

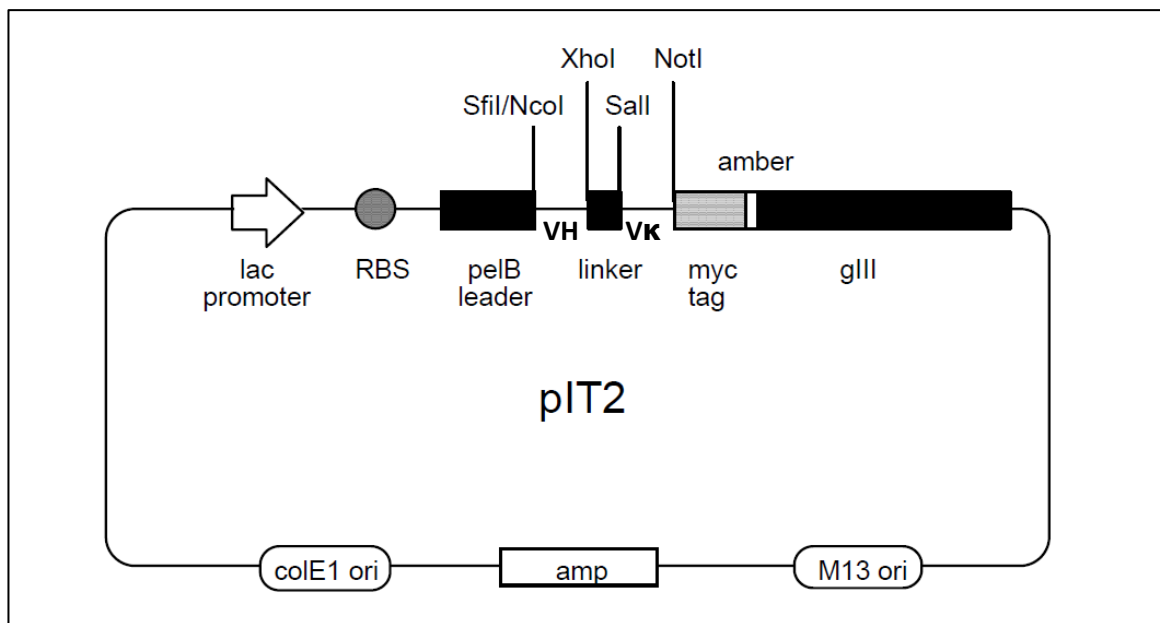


Figura 2.5. Mapa del vector pIT2, albergando un inserto codificante de un fragmento de anticuerpo (scFv). RBS, sitio de unión al ribosoma; PelB, secuencia señal; VH-linker-VK, scFv; myc tag, epítipo c-myc; His-tag, cola de histidina. El codón de terminación ámbar está presente entre la unión de la secuencia codificante del scFv y el *gIII* (imagen extraída de www.lifesciences.sourcebioscience.com).

Las genotecas Tomlinson I + J poseen la peculiaridad de que, tras la incubación de la genoteca con el antígeno y la realización de lavados, los fagos se eluyen mediante digestión con tripsina. La tripsina escinde el péptido en la región de la etiqueta c-myc que existe entre el scFv expresado y la proteína pIII del fago, que permanece intacta para permitir la infección de la bacteria. Además, la digestión con tripsina elimina el ruido de fondo ocasionado por la presencia del fago ayudante, puesto que la proteína pIII de este sí es sensible y, por lo tanto, se digiere y pierde su capacidad infectiva (Kristensen y Winter, 1998). Tras conocer la secuencia del fragmento de anticuerpo que reconoce a la molécula diana, se pueden realizar técnicas de maduración de la afinidad *in vitro*, con lo que se consigue incrementar la sensibilidad de los scFv.

2.4 SISTEMAS EMPLEADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

El uso de proteínas está muy extendido en el campo de la investigación, la medicina y la industria. No obstante, su extracción a partir de su fuente natural implica en ocasiones tener que llevar a cabo procesos difíciles y costosos. Otras proteínas, como por ejemplo los scFv, no se

encuentran como tales en la naturaleza. Teniendo en cuenta estas consideraciones, es evidente la necesidad de contar con un sistema que sea capaz de producir de manera simple y económica grandes cantidades de proteínas recombinantes, que además sean seguras.

A la hora de producir proteínas recombinantes, el primer paso implica la clonación de la secuencia de ADN deseada, que se introducirá posteriormente en el sistema de expresión elegido para traducirse. En el proceso de elección de los sistemas de expresión, hay que considerar una serie de factores, como la calidad de la proteína, su funcionalidad, la velocidad de producción y su rendimiento. Para la síntesis de proteínas recombinantes se pueden utilizar cultivos bacterianos, levaduras, mohos, mamíferos, plantas e insectos. De forma general, las proteínas mayores de 100 kDa se expresan en sistemas eucariotas, mientras que las menores de 30 kDa, en sistemas procariotas.

2.4.1 Bacterias

Sin ninguna duda, *E. coli* es el sistema más utilizado dentro del grupo de los organismos procariotas para expresar proteínas recombinantes, principalmente por su relativa simplicidad de manejo, su facilidad de cultivo a altas densidades, su elevado rendimiento, su escaso coste y su genética bien estudiada. No obstante, este organismo presenta una serie de desventajas, como su incapacidad de expresar adecuadamente proteínas que presenten puentes disulfuro o glicosilaciones, y la posible existencia de endotoxinas bacterianas en el sobrenadante de cultivo. Hay que tener en cuenta que en ocasiones las proteínas eucariotas son tóxicas para las bacterias. Además, en el caso de que la proteína se produzca como cuerpos de inclusión, esta puede ser inactiva, insoluble, o necesitar de etapas posteriores de tratamiento para conseguir su plegamiento adecuado. Una alternativa que evita la formación de cuerpos de inclusión consiste en dirigir las proteínas expresadas al espacio periplásmico, o secretarlas al medio de cultivo. Esta opción facilitaría el procesado posterior de las proteínas recombinantes, mejorando su actividad biológica, su estabilidad y solubilidad. Para llevar a cabo esta alternativa, se añade un péptido líder al extremo N-terminal de la proteína dirigido al sistema *Sec*, como los péptidos señal derivados de la proteína de membrana externa A (*OmpA*), de la fosfatasa alcalina A (*PhoA*), o de la pectato liasa B (*PeiB*). Tras finalizar la inducción de proteínas, estas se recuperan lisando la célula mediante un choque osmótico o permeabilizando la pared celular (Frenzel *et al.*, 2013; Mergulhão *et al.*, 2005; Sørensen y Mortensen, 2005; Swartz, 2001).

No obstante, *E. coli* no es el único organismo procariota empleado en la síntesis de proteínas recombinantes. La capacidad para producir y secretar al medio gran cantidad de proteínas convierte a determinadas cepas del género *Bacillus* en los grandes productores de enzimas desde el punto de vista industrial. Diferentes especies de este género se han empleado para producir nucleótidos, riboflavina, ribosa, y ácido poli (γ -glutámico). La desventaja que presentan es que estas cepas no suelen estar disponibles para su uso en investigación. Además,

dichas bacterias producen niveles elevados de proteasas, que pueden llegar a hidrolizar a la proteína recombinante expresada (Schallmey *et al.*, 2004). Otras bacterias que se han empleado para la producción de proteínas recombinantes son *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas putida* o *P. fluorescens*, puesto que presentan diferentes propiedades deseables, como la ausencia de acumulación de acetato o la capacidad de expresar fosfohidrolasas activas (Gruber *et al.*, 2015).

2.4.2 Levaduras

Cuando la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* no se produce de forma correcta, normalmente por problemas que implican el plegamiento o la necesidad de glicosilación, la alternativa suele consistir en el uso de levaduras. Las cepas de levaduras que se emplean en estas ocasiones están bien caracterizadas genéticamente, y como organismos eucariotas, son capaces de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales. Además, su manipulación y cultivo es más sencillo y económico que el de células de insecto o de mamífero. Las dos especies más utilizadas en la producción de proteínas recombinantes son *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* (Damasceno *et al.*, 2012).

La levadura *S. cerevisiae* es conocida por ser el organismo empleado por antonomasia en la producción de bioetanol, si bien también se emplea en la producción de proteínas recombinantes, como la insulina humana y las vacunas de la hepatitis y el papiloma humano (Hou *et al.*, 2012). Por otra parte, la levadura metilotrófica *P. pastoris* presenta la ventaja de que se puede utilizar para la expresión de proteínas recombinantes el promotor del gen de la alcohol oxidasa *AOX1*. Este promotor es uno de los más fuerte y estrictamente regulados conocidos hasta la fecha. Además, *P. pastoris*, a diferencia de *E. coli*, es capaz de formar puentes disulfuro y glicosilar proteínas. Si la comparamos con otros sistemas de expresión, como las células de insecto o de mamífero, *P. pastoris* presenta mejores rendimientos. Además, las células de organismos multicelulares requieren medios de cultivo complejos, lo que incrementa el coste de producción de proteínas. Otra de las características que hacen de *P. pastoris* un organismo ideal para la expresión de proteínas recombinantes es que esta puede crecer en un medio de cultivo que contenga una única fuente de carbono y una de nitrógeno, por lo que es posible llevar a cabo el marcado isotópico de las proteínas. Otras ventajas destacables son que *P. pastoris* es capaz de secretar al medio las proteínas sintetizadas, y puede integrar múltiples copias de ADN externo en su genoma, produciendo transformantes estables. Sin embargo, como desventaja de este sistema cabe señalar su incapacidad para la síntesis de proteínas chaperonas, que se necesitan para el plegamiento correcto de ciertas proteínas heterólogas. Otras levaduras metilotróficas que también se utilizan para la síntesis de proteínas son *Hansenula*, *Candida* y *Torulopsis* (Çelik y Çalik, 2012; Daly y Hearn, 2005; Demain y Vaishnav, 2009; Jafari *et al.*, 2011).

2.4.3 Hongos filamentosos

Por su habilidad para secretar altos niveles de proteínas y metabolitos bioactivos con modificaciones post-traduccionales, los hongos filamentosos de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus* son un hospedador atractivo para la producción de proteínas recombinantes. De hecho, su uso está ampliamente extendido en la industria alimentaria y biotecnológica, como por ejemplo en la producción de ácido cítrico por *A. niger* (Frenzel *et al.*, 2013). No obstante, una de las limitaciones que presentan estos organismos es la producción de proteasas homólogas que pueden degradar la proteína recombinante expresada, o que presentan patrones de glicosilación de proteínas distintos a los de los mamíferos, por lo que las proteínas recombinantes producidas por hongos filamentosos no son las más adecuadas para su uso terapéutico (Ward, 2012).

2.4.4 Células de insecto

Las células de insecto son capaces de realizar modificaciones post-traduccionales mucho más complejas que las que pueden realizar eucariotas unicelulares, aunque no idénticas a las de las células de mamífero. También presentan una maquinaria celular que posibilita el plegamiento de proteínas de mamífero, por lo que son bastante aceptables para producir proteínas de esta clase. El vector que se emplea más comúnmente para la producción de proteínas heterólogas es el baculovirus. Entre las ventajas que presenta este tipo de sistema de expresión se encuentran la capacidad de realizar fosforilaciones y N y O glicosilaciones, la correcta hidrólisis del péptido señal, la acilación, palmitilación y miristilación. Tampoco existen límites en el tamaño de la proteína a sintetizar. En este sistema, el gen a expresar se coloca bajo el control del promotor de la polihedrina viral, lo que permite la expresión de la proteína heteróloga hasta en un 30 % de la producción total de proteínas. Entre las desventajas de estos sistemas encontramos el plegamiento incorrecto de ciertas proteínas y los bajos niveles de expresión (Demain y Vaishnav, 2009; Hunt, 2005).

2.4.5 Células de mamífero

Estos sistemas de expresión de proteínas recombinantes se suelen emplear cuando se necesita producir proteínas propias de mamífero que requieran su producción en células de mamífero para conseguir una actividad y rendimiento óptimos. Las células de mamífero más utilizadas son las de ovario de hámster chino (*Cricetus griseus*) (CHO), especialmente a escala industrial, aunque entre otras líneas ampliamente utilizadas se encuentran las células embrionarias de riñón humano HEK293, y la línea de mono verde africano (*Chlorocebus* sp.) COS-1.

Los cultivos celulares de mamífero presentan la ventaja de expresar las proteínas correctamente glicosiladas y plegadas. Por ello, la producción de proteínas biofarmacéuticas se realiza empleando preferentemente este tipo de células. Sin embargo, entre las desventajas que

se observan se encuentran su bajo rendimiento y su elevado precio. La producción de proteínas recombinantes en células de mamífero es un proceso extremadamente delicado y costoso, puesto que se requiere de biorreactores de precio elevado para realizar la producción de proteínas a escala comercial (Bandaranayake y Almo, 2014; Dalton y Barton, 2014).

2.4.6 Animales transgénicos

Los animales transgénicos también se han utilizado en la producción de proteínas recombinantes. Entre las especies más empleadas como biorreactores se encuentran la vaca, la cabra, la oveja, el cerdo, el conejo y el ratón.

El tejido de elección para la expresión de proteínas recombinantes en animales transgénicos es la glándula mamaria, por la facilidad que presenta la leche a la hora de recolectarse en grandes volúmenes. Esto se ha traducido en que los esfuerzos para producir animales transgénicos se han centrado en especies productoras de leche. Sin embargo, la expresión de proteínas tiene lugar de manera discontinua, durante los ciclos de lactación, y el intervalo de tiempo desde el nacimiento del animal hasta la primera lactación es relativamente largo. Otra desventaja es el tiempo y los recursos necesarios para producir animales transgénicos. Otras proteínas recombinantes sintetizadas por animales transgénicos se han producido en clara de huevo, sangre, orina, plasma seminal y seda (Dyck *et al.*, 2003; Wells, 2010).

2.4.7 Plantas transgénicas

En comparación con otros sistemas de expresión empleados en el *farming* molecular, las plantas transgénicas, como *Arabidopsis thaliana*, poseen una serie de ventajas con respecto a los microorganismos, atendiendo al coste, complejidad de las proteínas capaces de secretar, almacenamiento y distribución. Además, para su producción solo se requieren nutrientes sencillos, agua y luz solar. No obstante, entre sus desventajas se encuentran su bajo rendimiento y la incorrecta glicosilación de ciertas proteínas (Ahmad *et al.*, 2012a; Demain y Vaishnav, 2009; Ma *et al.*, 2003; Obembe *et al.*, 2011).

2.5 PRODUCCIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Al igual que sucede con otras proteínas recombinantes, hasta la fecha se han utilizado diversos sistemas de expresión para la producción de scFv, un resumen de los cuales puede consultarse en la **Tabla 2.5**.

Tabla 2.5. Diferentes sistemas de expresión que se han empleado en la producción de scFv.

| Molécula diana | Referencia |
|--|----------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | |
| G-cuadruplejos de <i>Stylonychia lemnae</i> | Schaffitzel <i>et al.</i> , 2001 |
| Protooncogén ErbB2 (Her2/ <i>neu</i>) | Nielsen <i>et al.</i> , 2002 |
| Hapteno phOx | Sletta <i>et al.</i> , 2004 |
| Fumonisin B1 y B2 | Lauer <i>et al.</i> , 2005 |
| Eritropoyetina (EPO) | Mi <i>et al.</i> , 2005 |
| Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) | Miller <i>et al.</i> , 2005 |
| Células de carcinoma ovárico humano y CD3 humano (AhOCxAhCD3) | Zhao <i>et al.</i> , 2007 |
| Antígenos carcinoembrionarios CEACAM1, CEACAM3 y CEACAM5 | Zamboni <i>et al.</i> , 2008 |
| Antígeno Crf2 de <i>Aspergillus fumigatus</i> | Schütte <i>et al.</i> , 2009 |
| Células de melanoma de ratón B16F10 | Chen <i>et al.</i> , 2010 |
| Proteína transmembrana de mucina 1 (MUC1) | Thie <i>et al.</i> , 2011 |
| Marcador tumoral CD30 | Wezler <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Proteus mirabilis</i> (L VI) | |
| Proteína de activación de fibroblastos α (FAP- α) | Rippmann <i>et al.</i> , 1998 |
| Receptor del factor de necrosis tumoral | |
| Toxina tetánica | |
| <i>Bacillus brevis</i> | |
| Inhibición de la glucosil transferasa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> | Shiroza <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | |
| Digoxina | Wu <i>et al.</i> , 1998 |
| Fibrina MH-1 | Wu <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Bacillus megaterium</i> YYBm1 | |
| Lisozima | David <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Bacillus megaterium</i> MS941 | |
| D1.3 de la lisozima | Jordan <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | |
| Molécula de adhesión intercelular (ICAM1) | Chancey <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> | |
| Proteasa RgPA de <i>Porphyromonas gingivalis</i> | Marcotte <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Lactobacillus zeae</i> | |
| Proteína SAI/II de <i>Streptococcus mutans</i> | Krüger <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Pichia pastoris</i> | |
| Glicoproteína CD33 | Emberson <i>et al.</i> , 2005 |
| Factor inhibidor de leucemia humana recombinante (rhLIF) | Ridder <i>et al.</i> , 1995 |
| Receptor p185 ^{Her-2} | Gurkan <i>et al.</i> , 2004 |
| Desipramina (DMI) | Eldin <i>et al.</i> , 1997 |
| Glicoproteína CD7 | |
| Glicoproteína A33 | Damasceno <i>et al.</i> , 2007 |
| Zearalenona (ZEA) | Chang <i>et al.</i> , 2008 |
| Queratina | Fan <i>et al.</i> , 2009 |
| Marcador tumoral Her-2 | Sommaruga <i>et al.</i> , 2011 |
| Péptido natriurético tipo B | Maeng <i>et al.</i> , 2012 |
| Virus de la rabia | Wang <i>et al.</i> , 2012a |
| Marcador CD25 | Wan <i>et al.</i> , 2013 |

Tabla 2.5. (Continuación)

| Molécula diana | Referencia |
|---|-------------------------------------|
| <i>Pichia pastoris</i> | |
| Metolcarb | Cai <i>et al.</i> , 2014 |
| Marcador tumoral Her-2 | Cao <i>et al.</i> , 2015 |
| Antígeno CD22 | Della Cristina <i>et al.</i> , 2015 |
| TNF- α | Hu <i>et al.</i> , 2015 |
| Dominio ED-B de fibronectina | |
| Colágeno | Liang <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | |
| Modelo de scFv | Xu <i>et al.</i> , 2005 |
| Receptor de la transferrina | Hackel <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | |
| Proteínas Ras | Swennen <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Aspergillus awamori</i> | |
| Lisozima | Sotiriadis <i>et al.</i> , 2001 |
| Células de insecto Sf9 | |
| Fenil-oxazolona | Kretschmar <i>et al.</i> , 1996 |
| Plombagina | Sakamoto <i>et al.</i> , 2010b |
| Inhibición del factor de coagulación VIII | Kurasawa <i>et al.</i> , 2013 |
| Células de insecto Sf 158 | |
| TNF | Brocks <i>et al.</i> , 1997 |
| Células de <i>Drosophila</i> DS2 | |
| Virus del mosaico africano de la yuca (ACMV) | Reavy <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Bombix mori</i> | |
| Marcador tumoral Her-2 | Nguyen <i>et al.</i> , 2015 |
| Ginsenósido Re | Sakamoto <i>et al.</i> , 2010a |
| Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASp) | Sato <i>et al.</i> , 2012 |
| Células de mieloma de ratón | |
| Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-IR) | Li <i>et al.</i> , 2000 |
| Células CHO / Células de mieloma de ratón NS1 | |
| Proteína priónica | Ono <i>et al.</i> , 2003 |
| Clara de huevo | |
| Proteína priónica | Kamihira <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Oryctolagus cuniculus</i> / <i>Bos taurus</i> | |
| Proteoglicano asociado a melanoma CD28 | Grosse-Hovest <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Coturnix japonica</i> | |
| Proteína priónica | Kawabe <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | |
| Zearalenona | Yuan <i>et al.</i> , 2000 |

Tabla 2.5. (Continuación)

| Molécula diana | Referencia |
|---|-------------------------------------|
| <i>Nicotiana tabacum</i> | |
| Antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) | Ramírez <i>et al.</i> , 2002 |
| Citoquinas IL-4 y IL-6 | Ehsani <i>et al.</i> , 2003 |
| Marcador tumoral Her-2 | Galeffi <i>et al.</i> , 2005 |
| LPS de <i>Salmonella entérica paratyphi</i> B | Makvandi-Nejad <i>et al.</i> , 2005 |
| Neutraliza la neurotoxina botulínica | Almquist <i>et al.</i> , 2006 |
| Proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa | Joensuu <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Petunia hybrida</i> | |
| Dihidroflavonol 4-reductasa | De Jaeger <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Oryza sativa</i> / <i>Triticum aestivum</i> | |
| Antígeno carcinoembrionario (CEA) | Stöger <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Triticum aestivum</i> | |
| CD4 | Brereton <i>et al.</i> , 2007 |
| CD28 | |
| <i>Oryza sativa</i> | |
| Pili K99 de <i>E. coli</i> | Sunilkumar <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Glycine max</i> | |
| Toxina de <i>Fusarium virguliforme</i> | Brar y Bhattacharyya, 2012 |

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL CON SONDA TAQMAN PARA LA DETECCIÓN DE TRAZAS DE NUEZ DE BRASIL (*Bertholletia excelsa*) EN ALIMENTOS

CHAPTER 3

*TAQMAN REAL-TIME PCR ASSAY FOR DETECTION OF TRACES OF BRAZIL NUT (*Bertholletia excelsa*) IN FOOD PRODUCTS*

Food Control 33 (2013) 105-113



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

TaqMan real-time PCR assay for detection of traces of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in food products



Silvia de la Cruz^a, Inés María López-Calleja^a, Marcos Alcocer^b, Isabel González^a, Rosario Martín^a, Teresa García^{a,*}

^aDepartamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^bDepartment of Nutritional Sciences, School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough LE12 5RD, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2012

Received in revised form

23 January 2013

Accepted 25 January 2013

Keywords:

TaqMan real-time PCR

Brazil nut (*Bertholletia excelsa*)

2S albumin

Ber e 1

Food allergen

Allergen labeling

ABSTRACT

Mislabeling of food products containing Brazil nut may represent a serious threat for allergic consumers. In order to protect sensitized individuals, reliable methods to detect trace amounts of Brazil nut must be accessible to food industry as well as Food Safety authorities. According to this, a TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) method has been developed for specific detection of Brazil nut in foodstuffs. The method employs Brazil nut specific primers and probe, targeting 2S albumin gene (*Ber e 1*), and a positive amplification control based on 18S rRNA gene. Results obtained on sensitivity with wheat flour spiked with different concentrations of raw and heat treated Brazil nut showed that the limit of detection (LOD) for the technique was 2.5 mg/kg. Applicability of the Brazil nut specific system was assessed through analysis of 66 different commercial food samples. The reported real-time PCR assay provides a useful tool for detection of Brazil nut DNA, and it can be used as a routine analysis to assert accuracy on food labeling.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) is a tree nut belonging to the Lecythidaceae family in the order Ericales. In recent years there has been an increasing demand for delicatessen food products that contain Brazil nut seeds as an ingredient. Not only do these products offer a high economic value, but their consumption is also associated with several health benefits. Brazil nuts have important antioxidant properties thanks to their high content in selenium (Chunhieng et al., 2004; Yang, 2009). Moreover, even though an average of 60% of their total weight is oil, 73% of the fatty acids are heart-protective monounsaturated and polyunsaturated, and it is an excellent dietary source of micronutrients such as tocopherols, phytosterols and squalene (Phillips, Ruggio, & Ashraf-Khorassani, 2005; Robbins, Shin, Shewfelt, Eitenmiller, & Pegg, 2011; Ros, Tapsell, & Sabaté, 2010; Ryan, Galvin, O' Connor, Maguire & O'Brien, 2006). Protein content of Brazil nuts is also remarkable, with 15–17% of protein by fresh weight. The Brazil nut 2S albumin,

named Ber e 1, comprises about 30% of total protein, and it is exceptionally rich in sulfur aminoacids. However, it is well-established that Ber e 1 is able to elicit allergic responses in sensitized individuals (Alcocer, Rundqvist, & Larsson, 2012; Ryan et al., 2006). Moreover, together with peanuts and hazelnuts, Brazil nuts are the most powerful food allergens (Schubert-Ullrich et al., 2009).

Food allergies have become an important health issue in industrialized countries, and they are ranked by the World Health Organization as the sixth problem of human health. It has been estimated that around 1% of adults and 2.5% of children worldwide suffer from food allergy (Jackson, 2003; Kumar, Verma, Das, & Dwivedi, 2012). Clinical experience suggests that most cases of food allergy are elicited by a relatively small number of foods (colloquially known as 'the big eight'). The most frequent food allergens in children are milk, egg, soy, peanut, tree nuts, fish and crustaceans, whereas in adults are peanuts, tree nuts, crustaceans, fish and egg (Jackson, 2003). Although sensitivity to some food allergens tends to decrease in late childhood, allergies to peanuts, tree nuts and seafood tend to persist (Chapman et al., 2006).

In sensitized individuals, even a minute intake of an allergen could trigger a plethora of symptoms, which range from skin irritations to life-threatening anaphylaxis. Furthermore, at the present time the only effective treatment for food allergy is total avoidance

Abbreviations: BNS, Brazil nut specific system; PAC, positive amplification control.

* Corresponding author. Tel.: +34 913943747.

E-mail address: tgarcia@vet.ucm.es (T. García).

0956-7135/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.053>

of the offending food (Monaci & Visconti, 2010). Nevertheless, accidental exposure to a particular allergen frequently happens due to mislabeling of products or cross-contamination during food processing. In several countries, Brazil nut is included in a list of food ingredients which must be indicated on the label of foodstuffs, as they are likely to cause adverse reactions in susceptible individuals. The EU (European Parliament and Council, 2007, 2011), the USA (Food Allergen Labelling and Consumer Protection Act of 2004) and Canada (Regulations Amending the Food and Drug Regulations, 2011) are some of the countries that have regulated labeling of food allergens. To enforce labeling requirements, robust analytical methods to monitor foods or industrial lines where cross-contamination is possible must be accessible for food industry and Food Safety authorities. The new tools must be fast, sensitive (providing low limit of detection), accurate and specific (allowing discriminate between similar species) in order to enable unequivocal identification of the allergens (Kirsch et al., 2009).

Various assays for detection of Brazil nut in foodstuffs have been reported over the last few years. These methods targeted either the allergen itself, marker proteins or DNA fragments. Protein-based methods involve immunochemical detection protocols. Despite the wide range of immunochemical methods available, only enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is currently convenient for routine screening and quantification in food industry (Kirsch et al., 2009). In the other hand, DNA-based methods are based on the amplification of a specific DNA fragment by the polymerase chain reaction (PCR). Both methods have their advantages and drawbacks (Poms, Klein, & Anklam, 2004). Immunoanalytical procedures require the employment of animal antibodies raised against the allergenic protein. In addition, in order to select a target allergen, it is important to take into account protein stability during food processing because manufacturing operations can have an impact on allergen structure, affecting conformational epitopes and, therefore, preventing antibody recognition (Sathe & Sharma, 2009). Regarding Brazil nut, Ber e 1 protein presents a high stability toward heat processing as well as pepsin digestion, maintaining the native form, so it becomes a suitable biomarker to detect the presence of Brazil nut in foods (Koppelman et al., 2005). Two immunoanalytical techniques which detect Ber e 1 protein in foodstuffs using polyclonal antibodies have been published. Blais, Omar, and Phillippe (2002), reported a qualitative sandwich enzyme immunoassay, and Clemente, Chambers, Lodi, Nicoletti, and Brett (2004) developed an indirect competitive ELISA, both achieving a limit of detection (LOD) of 1 mg/kg. Other authors have obtained polyclonal antibodies against Brazil nuts extracts, like Sharma, Roux, and Sathe (2009) who described a competitive ELISA also with a LOD of 1 mg/kg, but reporting a significant interference with cinnamon. Immunoassays have also been developed for simultaneous detection of peanut and tree nuts. In this respect, Blais, Gaudreault, and Phillippe (2003) attained simultaneous detection of Brazil nut, peanut and hazelnut by employing a reverse dot blot enzyme immunoassay system, whereas Ben Rejeb, Abbott, Davies, Cl eroux, and Delahaut (2005), developed a competitive indirect enzyme immunoassay to detect Brazil nut, almond, cashew, hazelnut and peanut using rabbit polyclonal antibodies. Nonetheless, neither of those polyclonal antibodies is commercially available. Lately, lateral flow devices have earned importance. These kits are extremely simple to perform, but they have the disadvantage of being only qualitative. AgraStrip[®] Brazil nut (Romer[®] Labs, Cheshire, UK) and Lateral Flow Brazil Nut (R-Biofarm[®], Darmstadt, Germany) are commercially available kits for Brazil nut detection, both with a LOD at the low mg/kg level.

DNA based methods such as PCR provide an alternative approach to detect allergenic ingredients in foods. These methods have the advantages of being highly sensitive, specific and

reproducible, and can be used in highly processed products. Moreover, when real-time PCR assays are used, they also have the benefits of automation, speed and acquisition of quantitative data. Real-time PCR requires more expensive laboratory equipment, but it is more accurate than other DNA quantification methods (Poms, Anklam, & Kuhn, 2004). Three PCR assays have been recently developed for Brazil nut allergen detection (Brezn a, Dud asov a, & Kuchta, 2010; Hubalkova & Rencova, 2011; R oder, Filbert, & Holzhauser, 2010), but only that of R oder et al. (2010) has a LOD in the range accomplished by available ELISA methods.

In this study we describe the development and optimization of a TaqMan real-time PCR technique, based on selective amplification of a *Ber e 1* gene fragment, for specific identification of Brazil nut. The applicability of the assay was evaluated through the screening of 66 different commercial food samples, consisting in a wide variety of brands and types of products.

2. Materials and methods

2.1. Sample selection

Samples of Brazil nut and other tree nuts were purchased from a local dealer in Madrid, Spain. They were carefully cleaned and shelled separately to avoid cross-species contamination, and stored at -20°C until used. Plant and animal species analyzed for specificity purposes (Table 1) were acquired in different local markets in Madrid. Finally, a total of 66 commercial food products were purchased from various retail markets and delicatessen shops (Spain).

Table 1
Specificity of the real-time PCR system.

| Common name | Scientific name | <i>Ber e 1</i> BNS ^a | 18S rRNA PAC ^b |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Brazil nut | <i>Bertholletia excelsa</i> | 20.50 ± 0.08 ^c | 13.90 ± 0.02 |
| Almond | <i>Prunus dulcis</i> | – ^d | 13.11 ± 0.02 |
| Cashew nut | <i>Anacardium occidentale</i> | – | 13.86 ± 0.07 |
| Chestnut | <i>Aesculus hippocastanum</i> | – | 15.88 ± 0.02 |
| Hazelnut | <i>Corylus avellana</i> | – | 11.37 ± 0.01 |
| Macadamia | <i>Macadamia integrifolia</i> | – | 12.97 ± 0.04 |
| Peanut | <i>Arachis hypogaea</i> | – | 14.56 ± 0.04 |
| Pecan nut | <i>Carya illinoensis</i> | – | 13.43 ± 0.02 |
| Pine nut | <i>Pinus pinea</i> | – | 15.11 ± 0.06 |
| Pistachio | <i>Pistacia vera</i> | – | 13.38 ± 0.01 |
| Walnut | <i>Juglans regia</i> | – | 11.30 ± 0.01 |
| Barley | <i>Hordeum vulgare</i> | – | 15.02 ± 0.04 |
| Chocolate | <i>Theobroma cacao</i> | – | 16.41 ± 0.04 |
| Chufa sedge | <i>Cyperus esculentus</i> | – | 14.79 ± 0.03 |
| Lupine | <i>Lupinus albus</i> | – | 16.52 ± 0.06 |
| Maize | <i>Zea mays</i> | – | 16.38 ± 0.03 |
| Mung bean | <i>Vigna radiata</i> | – | 15.78 ± 0.01 |
| Oats | <i>Avena sativa</i> | – | 14.32 ± 0.06 |
| Olive | <i>Olea europaea</i> | – | 14.01 ± 0.03 |
| Orange | <i>Citrus sinensis</i> | – | 14.23 ± 0.02 |
| Potato | <i>Solanum tuberosum</i> | – | 15.05 ± 0.05 |
| Rice | <i>Oryza sativa</i> | – | 13.87 ± 0.01 |
| Rye | <i>Secale cereale</i> | – | 14.02 ± 0.02 |
| Sesame | <i>Sesamum indicum</i> | – | 16.26 ± 0.07 |
| Soybean | <i>Glycine max</i> | – | 14.12 ± 0.02 |
| Sunflower | <i>Helianthus annuus</i> | – | 15.44 ± 0.01 |
| Wheat | <i>Triticum aestivum</i> | – | 15.72 ± 0.06 |
| Cattle | <i>Bos taurus</i> | – | 16.17 ± 0.01 |
| Goat | <i>Capra hircus</i> | – | 15.02 ± 0.04 |
| Sheep | <i>Ovis aries</i> | – | 13.98 ± 0.00 |
| Swine | <i>Sus scrofa domestica</i> | – | 14.34 ± 0.07 |

^a **Bere1 BNS**: Brazil nut specific system on the *Ber e 1* gene (NBRAZIL-FW2/ NBRAZIL-REV2, and BexcTM probe).

^b **18S rRNA PAC**: Positive amplification control on the 18S rRNA gene (18SDIR/ 18SINV, and 18SP probe).

^c Average Cp value ± SD obtained from triplicate PCR reactions from each DNA extraction.

^d Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles.

These products included 18 labeled as containing Brazil nut as an ingredient, 15 labeled as may contain Brazil nut traces, 19 labeled as 'may contain traces of tree nuts', and 14 declaring to contain tree nuts, but not Brazil nut. The commercial food samples were stored at -20°C in airtight containers until analyzed.

2.2. Sample preparation

Experimental binary mixtures of Brazil nut in a wheat flour matrix (10^5 – 1 mg/kg) were prepared to evaluate the test sensitivity. As a first step, 50 g of finely ground Brazil nut was added to 450 g of wheat flour, and the mixture was homogenized for 5 min at high speed using a food processor (Thermomix, Vorwerk, Germany). Then, 50 g of the former mixture was added to 450 g of wheat flour to obtain a concentration of 10^4 mg/kg. Remaining concentrations (up to 1 mg/kg) were obtained following the same procedure. Three additional mixtures containing 5000 mg/kg, 5 mg/kg and 2.5 mg/kg of Brazil nut in wheat flour were also prepared by mixing 250 g of wheat flour with 250 g of the mixtures containing 10^4 mg/kg, 10 mg/kg, and 5 mg/kg, respectively. A pure sample of ground Brazil nut was used as the positive control.

The effect of heat treatment on technique's ability to identify the target species was assessed through the analysis of binary mixtures prepared with ground roasted Brazil nuts. To prepare roasted mixtures, 70 g of ground Brazil nut were processed in an oven at 160°C for 13 min. This roasted sample was used to prepare Brazil nut-wheat flour mixtures containing 10^5 – 1 mg/kg of Brazil nut component, prepared as described above. Binary mixtures were stored at -20°C until use.

2.3. DNA extraction

Two hundred milligrams of sample were homogenized with 860 μL of extraction buffer (0.010 M Tris, 0.150 M NaCl, 0.002 M EDTA, and 1% SDS, pH 8.0), 100 mL of 5 M guanidine hydrochloride, and 40 μL of 20 mg/mL proteinase K (Merk, Darmstadt, Germany), and incubated overnight at 55°C with shaking at 250 rpm. Then, the samples were cooled down to room temperature. Five hundred microliters of chloroform (Sigma–Aldrich, MO, USA) were added to the lysate before centrifugation at 16 438 g for 10 min. Genomic DNA from the clear aqueous supernatant obtained after the centrifugation (500 μL) was purified using the Wizard DNA Cleanup System Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA), with a vacuum manifold, according to the manufacturer's instructions. The DNA was eluted in 50 μL of sterile deionized water. DNA concentration was quantified with a ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE, USA) before storage at -20°C . Three separate extractions of each sample were prepared, and a negative control sample was included within every extraction. DNA extracted from raw and roasted Brazil nut was electrophoresed in a 1% low electroendosmosis D1 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide (Sigma–Aldrich)

Table 2
DNA sequences and description of the primers and probes used in this study.

| Primers | Length (bp) | Sequence (5' → 3') | Description | Target gene | Fragment length (bp) |
|---------------------|-------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------|----------------------|
| NBRAZIL-FW2 | 20 | CGGAAGGCTAAGGATGATG | Brazil nut specific forward primer | <i>Ber e1</i> | 131 |
| NBRAZIL-REV2 | 20 | GCATCTCATGGGACTGAGGT | Brazil nut specific reverse primer | | |
| 18SDIR | 16 | TGGTGCCAGCAGCCGC | Positive Control forward primer | 18S rRNA | 77 |
| 18SINV | 25 | TCCAACCTACGAGCTTTTAACTGCA | Positive Control reverse primer | | |
| Probes | Length (bp) | Sequence (5' → 3') | Description | Target gene | |
| Bexce TM | 22 | 6FAM-AAGGGATATTCTCGCCAGCT-BBQ | Brazil nut probe | <i>Ber e1</i> | |
| 18SP | 22 | 6FAM-CGCTATTGGAGCTGGAATTACC-BBQ | Universal probe | 18S rRNA | |

in Tris-acetic acid-EDTA buffer (0.04 M Tris, 0.02 M acetic acid, 0.001 M EDTA, pH 8.3) (Bio-Rad, Munich, Germany) for 30 min at 110 V. Total DNA was visualized by UV transillumination employing a Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.4. Primers and probes

Several 2S albumin gene sequences from peanut and tree nut species available in the GenBank-European Molecular Biology Laboratory (GenBank-EMBL) database were aligned with EMBOSS software package, version 2.2.0. After sequence comparison and analysis, a Brazil nut specific pair of primers (NBRAZIL-FW2 and NBRAZIL-REV2) was designed to amplify a DNA fragment of 131 bp in the *Ber e1* (Brazil nut 2S albumin) gene, with the aid of Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A TaqMan probe (BexceTM) was designed to anneal within the amplicon generated with the Brazil nut specific primers. As a positive amplification control (PAC), universal primers 18SDIR and 18SINV and TaqMan probe 18SP were used, targeting a 77 bp fragment in the 18S rRNA gene from all eukaryotic species (Pegels et al., 2011). The sequences of the primers and probes used in the real-time PCR assay are listed in Table 2. TaqMan probes were designed and synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany).

2.5. Real-time PCR setup

Real-time PCR amplification reactions were performed in a final volume of 10 μL , in a glass capillary tube. Each reaction mixture contained 200 ng of template DNA, 2 pmol of TaqMan probe (TibMolBiol), and LightCycler[®] TaqMan Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Primers concentrations were experimentally set to obtain the lowest crossing point (Cp) values with the highest fluorescence. They were 300 nM for the forward primer and 900 nM for the reverse primer. Amplification reactions were run on a LightCycler[®] 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany), with a program consisting of 10 min at 95°C (denaturation and Taq polymerase activation), followed by 50 cycles at 95°C for 10 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 s. Then, samples were cooled to 40°C for 30 s. This program was carried out to amplify the Brazil nut specific system (BNS) and the PAC. Real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extract. The Cp value, which represents the cycle at which increase in fluorescence is the highest and where the logarithmic phase of a PCR begins, were provided automatically by the LightCycler[®] software as the first maximum of the second-derivative of the curve.

2.6. Construction of the standard curve and data analysis

In order to evaluate the correlation between Cp values obtained in the real-time PCR and the concentration of Brazil nut in the samples, standard curves were obtained using ten-fold dilution

series of Brazil nut DNA (10^2 ng– 10^{-4} ng). Standard curves were also constructed from experimental mixtures containing different concentrations (10^5 – 1 mg/kg) of raw and roasted Brazil nut in wheat flour.

Variables Cp and Brazil nut concentration are correlated following a semi-logarithmic model:

$$C_p = b \log \text{concentration} + a$$

where b is the slope and a is the intercept.

The amplification efficiency, E , was calculated from the slope of the standard curve using the following formula (Bustin et al., 2009):

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

$$\% \text{ Efficiency} = (E - 1) \cdot 100$$

The LOD of the method was determined with the standard deviation of the response and the slope using the equation $\text{LOD} = 3.3\sigma/b$, where σ is the standard deviation of the intercept, and b is the slope of the calibration curve. Moreover, the practical LOD was assessed as the lowest amount of Brazil nut that can be reliably distinguished from the blank matrix, based on sextuplicate analysis of binary mixtures of a wheat flour matrix spiked with decreasing concentrations of raw and roasted Brazil nut (10^5 – 1 mg/kg).

Linearity, sensitivity, accuracy and precision parameters of the BNS were determined according to previously described methods (Camacho, Torres, Gil-Alegre, Obregón, & Ruz, 1993; Fajardo et al., 2009; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005). The following tests were used for linearity analysis: (i) Cochran test, which determined whether the variances of the responses obtained for each concentration of Brazil nut in the binary mixtures were homogeneous for a 0.05 significance level; (ii) Regression analysis, which asserted if existed a statistically significant relationship between Cp and logarithm of the Brazil nut DNA concentration, with a confidence level of 99.0%; (iii) Analysis of variance (ANOVA) with lack of fit, which determined whether the chosen model was suitable to describe the observed data with a confidence level of 95.0%, and (iv) Discriminating capacity, which is the least difference in the logarithm of the target DNA concentration in the sample that the analytical method can discriminate at the specified significance level. In-house validation of the assay was assessed by testing three independent DNA extractions from experimental mixtures containing five different concentrations of Brazil nut, with three replicates per extraction. Precision was evaluated by contrasting the coefficient of variation (CV) values calculated in three different days versus those obtained in the same day, to ponder the influence of the day of analysis in the data obtained from the binary mixtures. Statgraphics Centurion 15.2.14 (XV) (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, USA) was used for data analysis.

3. Results and discussion

3.1. Assay development and specificity

The real-time PCR assay developed and evaluated in this work is based on a species-specific primer pair and TaqMan probe designed on the Brazil nut 2S albumin gene, *Ber e 1*. *Ber e 1* has been reported as a major food allergen, demonstrating its ability to bind IgE from the sera of allergic patients, and due to the presence of disulfide bonds, this glycoprotein is resistant to proteolysis and thermal treatment (Moreno & Clemente, 2008; Moreno et al., 2004). In the

present work, the *Ber e 1* gene has been selected because *Ber e 1* protein is the major allergen described in Brazil nut (Alcocer et al., 2012). In addition, availability of different entries for Brazil nut 2S albumin gene in databases, prevents selecting nucleotide regions specific for a particular Brazil nut variety, or regions containing inaccurate nucleotides due to sequencing failures, that could lead to unsuccessful amplifications. Alignment and analysis of 2S albumin DNA sequences available in the GenBank-EMBL database allowed the design of the primer pair NBRAZIL-FW2 and NBRAZIL-REV2, which amplified a DNA fragment of 131 bp in *B. excelsa*, and the Bexc™ TaqMan probe (Fig. 1). The selection of a short length DNA fragment is important to avoid lack of amplification of the target, as food processing may cause random cleavage of DNA strands, leading to a reduction in the size of DNA fragments (Jonas et al., 2001). Gel electrophoresis in Fig. 2 shows some degree of DNA fragmentation, even in raw Brazil nut. It may be due to the boiling treatment that is commonly applied to facilitate removing their extremely hard shell. DNA fragmentation increased with heat treatments, and samples roasted at $140^\circ\text{C}/20$ min or $160^\circ\text{C}/13$ min contained only a smear of low-to-medium molecular weight degraded DNA. Specificity of the BNS was assessed by the analysis of DNA extracted from 11 nuts, and also from several plant and animal species. In the BNS, Brazil nut was amplified with a Cp value of 20.50 ± 0.08 , while no cross-species amplification signal was obtained after 50 cycles on the non-targeted plant and animal species tested, including all the allergenic nuts that must be stated in food labels according to EU Regulation No 1169/2011 (Table 1). To support the absence of PCR inhibition, a PAC system based on the eukaryotic 18S rRNA, was carried out in parallel with BNS for amplification of total eukaryotic DNA. The PAC amplified the specific DNA fragment from all eukaryotic species analyzed with average Cp values of 14.52 ± 1.33 . Inhibition due to the absence of amplifiable DNA in the sample or to the presence of polymerase inhibitors would produce a negative real-time PCR result in the PAC.

3.2. Standard curves and amplification efficiency

To estimate the sensitivity (lowest amount of Brazil nut DNA detected) of the real-time PCR method, standard curves were constructed with ten-fold dilutions of DNA from raw and roasted (160°C , 13 min) Brazil nut. A good linear correlation ($R^2 > 0.99$) was obtained between the crossing point values and the log of Brazil nut DNA concentration. Linearity was observed over the range between 100 ng and 10 pg of DNA. Sensitivity of the real-time PCR system was 1 pg for raw Brazil nut and 10 pg for roasted Brazil nut. Fig. 3 shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between Cp values and logarithm of the raw and roasted Brazil nut DNA concentrations. The Cochran test demonstrated that the variances of the responses obtained for each DNA concentration were homogeneous for a 0.05 significance level, thus allowing the calculation of the regression line parameters by least squares and the discriminating capacity from an average variance of the response (S^2 comb). Since the P -values in the ANOVA tables were lower than 0.01, there was a statistically significant relationship between Cp and log concentration of Brazil nut DNA at the 99% confidence level. Also, since the P -values for lack-of-fit in the ANOVA tables were greater than 0.05, the linear model appeared to be adequate for the observed data at the 95% confidence level. The slope of the log-linear phase of the standard curve reflects the amplification efficiency. The slopes of the linear equations were -3.5 for raw Brazil nut DNA and -3.76 for roasted Brazil nut DNA, which corresponded to amplification efficiencies of 93% and 84.5%, respectively. Efficiencies for an optimal real-time PCR should be between 90% and 100%. This parameter can be affected, among

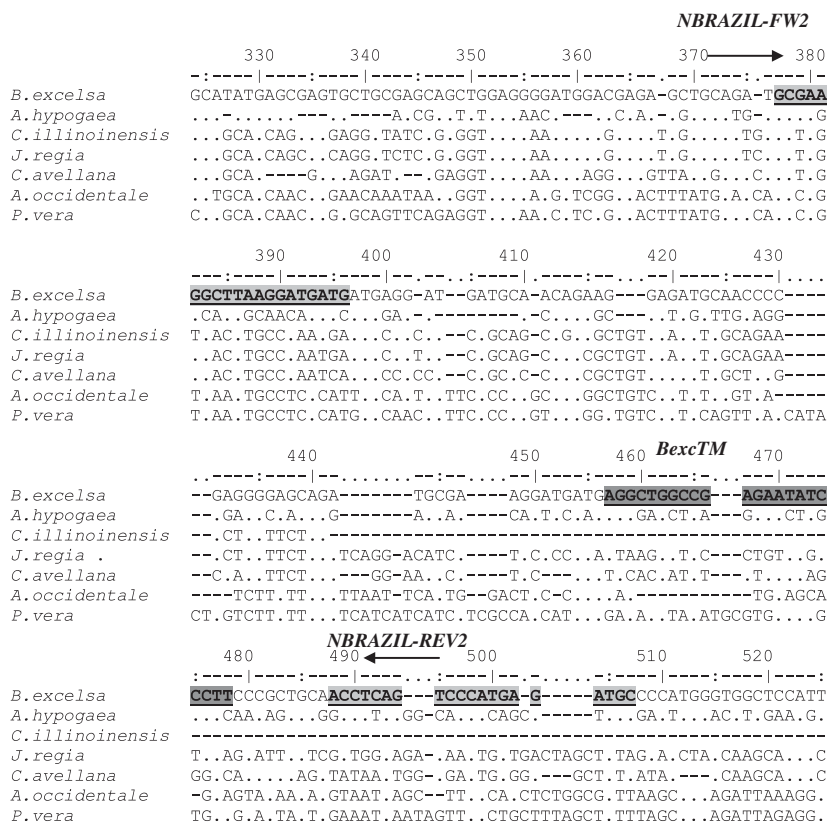


Fig. 1. Alignment of the 2S albumin DNA sequences from Brazil nut (*Bertholletia excelsa* AB044391), peanut (*Arachis hypogaea* FJ713110.1), pecan nut (*C. illinoensis* AY192569.1), walnut (*Juglans regia* 1794251), hazelnut (*Corylus avellana* FJ358504.1), pistachio (*Pistacia vera* DQ631675.1) and cashew nut (*Anacardium occidentale* AY081853.1) available at the GenBank-EMBL database. Primers NBRAZIL-FW2, NBRAZIL-REV2, and BexcTM probe are highlighted.

other things, by the length of the amplicon, secondary structure and primer quality (Dorak, 2006).

To test the efficiency and sensitivity of the technique under practical conditions, the real-time PCR amplification was also carried out with experimental mixtures containing different

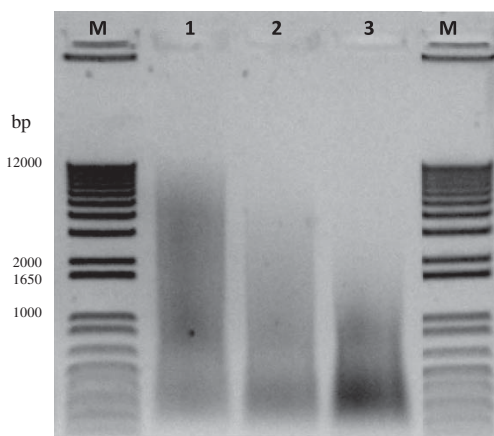


Fig. 2. Gel electrophoresis of total genomic DNA extracted from Brazil nut. Sample in lane 1 was obtained from raw Brazil nut, and samples in lanes 2 and 3 were obtained from air roasted Brazil nut heat-treated at 140 °C/20 min (2), and at 160 °C/13 min (3). M, molecular weight marker 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

concentrations of raw and roasted Brazil nut (1–10⁵ mg/kg) in wheat flour. Fig. 4 summarizes the statistical analysis for linearity of the results obtained. A linear response between the Cp and logarithm of Brazil nut concentration was obtained over the range 10²–10⁵ mg/kg ($R^2 > 0.99$). The slopes of the linear equations were –3.39 for raw Brazil nut mixtures and –3.52 for roasted Brazil nut mixtures, which corresponded to amplification efficiencies of 97.2% and 92.3%, respectively. The LOD of the method based on the standard deviation of the response and the slope was calculated as 0.6 and 0.7 mg/kg for raw and roasted Brazil nut, respectively. Nevertheless, the practical LOD was assessed from analysis of spiked wheat flour samples as the minimum Brazil nut concentration that could be reliably distinguished from the blank matrix. The practical LOD was 2.5 mg/kg for both raw and roasted Brazil nut, based on sextuplicate analysis of spiked samples. All six replicates of samples containing 10, 5, and 2.5 mg/kg raw or roasted Brazil nut were amplified using the BNS, with Cp values of 35.97 ± 0.34, 35.23 ± 0.74, and 36.33 ± 0.72, respectively, for raw Brazil nut, and Cp values of 35.70 ± 0.81, 36.11 ± 0.61, and 36.20 ± 0.52, respectively, for roasted Brazil nut. Nevertheless, only 2 out of 6 mixtures spiked at 1 mg/kg were amplified with average Cp values of 35.83 for raw, and 36.81 for roasted Brazil nut.

Even though it is difficult to establish a threshold dose that would not cause a reaction in any individual within the total population of allergic patients, there is scientific agreement that the detection limits for different allergenic ingredients in foodstuffs must be somewhere between 1 and 100 mg/kg, depending on the

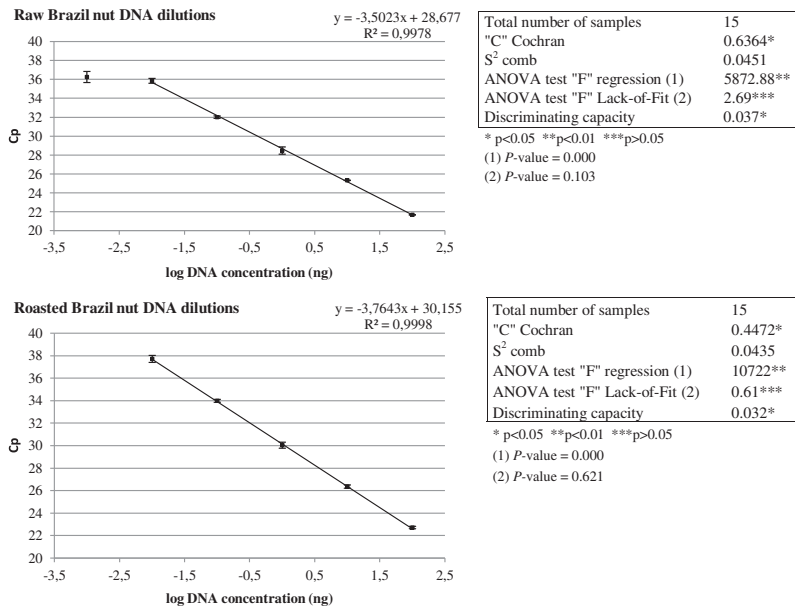


Fig. 3. Cp values plotted versus the logarithm of the DNA concentration (ng) of raw and heat treated (160 °C/13 min) Brazil nut. Linearity test, regression line, and sensitivity parameters were calculated for the BNS. Error bars indicate the standard deviation of mean from three independent experiments.

respective food (Poms, Klein, et al., 2004; Taylor, Crevel, Sheffield, Kabourek, & Baumert, 2009; Threshold Working Group, 2008). Thus, the LOD of the real-time PCR method developed herein is appropriate to protect allergic consumers.

Accuracy is defined as the ability of the analytical method to give results as close as possible to the theoretical value (Camacho et al., 1993). This parameter was assessed analyzing wheat flour samples

spiked with known amounts of Brazil nut (100, 1000, 5000, 10 000 and 100 000 mg/kg). Mean percent recovery values were 103.19 ± 12.3 for raw Brazil nut and 100.57 ± 10.3 for roasted Brazil nut. The Student's *t*-test demonstrated the accuracy of the method, since there were no significant differences between 100% and the mean recovery values at the 95.0% confidence level. The influence of the day of analysis on the assay precision was evaluated through

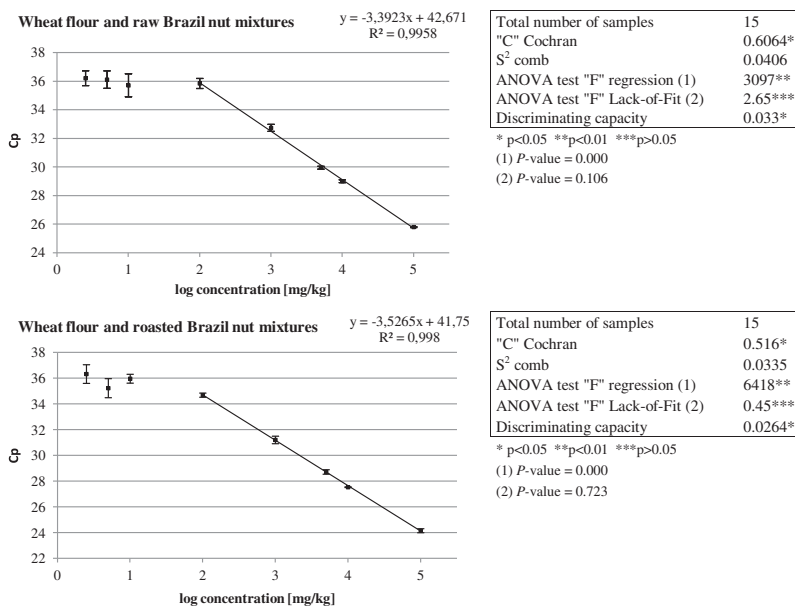


Fig. 4. Cp values plotted versus the logarithm of Brazil nut concentrations (10^2 –2.5 mg/kg) in wheat flour for raw Brazil nut mixtures, and heat treated (160 °C/13 min) Brazil nut mixtures. Linearity test, regression line, and sensitivity parameters were calculated for the BNS. Error bars indicate the standard deviation of mean from three independent experiments.

Table 3
Results of the Brazil nut real-time PCR analysis of 66 commercial food products.

| | Number of samples analyzed | <i>Ber e 1</i> (BNS) | 18S rRNA (PAC) |
|---|----------------------------|----------------------|----------------|
| Commercial food products that declared Brazil nut as an ingredient | | | |
| Chocolate | 5 | +(2)/–(3) | + |
| Food bar | 6 | + | + |
| Muesli | 2 | + | + |
| Cereal | 4 | + | + |
| Biscuit | 1 | + | + |
| Commercial food products that declared traces of Brazil nut | | | |
| Chocolate | 15 | +(1)/–(14) | + |
| Commercial food products that declared to contain traces of tree nuts | | | |
| Biscuit | 4 | – | + |
| Bread | 2 | – | + |
| Chocolate | 5 | – | + |
| Cereal | 1 | + | + |
| Rice cake | 1 | – | + |
| Food bar | 3 | +(2)/–(1) | + |
| Granola | 1 | – | + |
| Ice cream | 1 | – | + |
| Candy bar | 1 | – | + |
| Commercial food products that declared to contain traces of nuts different from Brazil nut | | | |
| Chocolate | 3 | – | + |
| Cashew cream | 1 | – | + |
| Cereal | 1 | – | + |
| Beverage | 3 | – | + |
| Biscuit | 3 | – | + |
| Tomato sauce | 1 | – | + |
| Precooked meal | 1 | – | + |
| Ice cream | 1 | – | + |

(+) Indicates positive signal before 50 PCR cycles.
(–) Indicates no positive signal after 50 PCR cycles.

comparison of the coefficients of variation (CV) of the average percentage of recovery values obtained in triplicate assays from 3 independent real-time PCR experiments, either performed on the same day or on three different days. CV for the same day where 11.95 and 10.29 for raw and roasted Brazil nut, respectively. When the assay was performed on different days the CV values were slightly higher (12.29 and 13.06). Nevertheless, the ANOVA test demonstrated that the factor “day of analysis” did not have a

statistically significant effect on the average percentage of recovery at a 95.0% confidence level.

Currently, PCR techniques described in bibliography for Brazil nut detection are scarce. Hubalkova and Rencova (2011) developed a multiplex PCR assay for detection of pecan and Brazil nut based on the *Ber e 1* gene with a LOD of 1000 mg/kg. Similarly, Brezná et al. (2010) developed a real-time PCR method for Brazil nut on the gene encoding the 11S globulin, which also achieved a detection limit of 1000 mg/kg. Nevertheless, these methods lacked of sufficient sensitivity to achieve detection in the range of 1–100 mg/kg. The LOD of the assay described in the present work is similar to the 5 mg/kg reported by Röder et al. (2010), being in the range of sensitivity recommended for detection of nut allergens in food, but they only analyzed a total of 15 retail samples, of which just 2 contained Brazil nut. Therefore, it would have been desirable to analyze a higher number of commercial samples in order to assess the applicability of that method.

3.3. Analysis of retail samples

Availability of techniques for detection of Brazil nut in foodstuffs is crucial not only because an accidental contamination with these tree nuts could cause a serious health problem in sensitized individuals, but also because Brazil nuts are susceptible targets for fraudulent substitution, due to their higher price when compared to other tree nuts or peanut (Woolfe & Primrose, 2004).

The suitability of the developed method for detection of Brazil nut DNA in foodstuffs was assessed through analysis of 66 commercial food products that could contain Brazil nut in their composition. Among the samples analyzed, 18 were labeled as including Brazil nut as an ingredient, 15 labeled as containing traces of Brazil nut, 19 labeled as ‘may contain traces of tree nuts’, and 14 declaring to contain tree nuts, but not Brazil nut (Table 3).

Real-time PCR analysis supported labeling in most of the samples. However, Brazil nut DNA was not amplified from 3 chocolates which declared to contain Brazil nut, but did not state the percentage of this ingredient. Result was also negative for 14 chocolates which declared to contain traces of Brazil nuts. Due to its high economic value, the absence of DNA amplification in the 3 samples

Table 4
Real-time PCR results obtained in the analysis of commercial food products that contained Brazil nut according to the Brazil nut specific system.

| Commercial food product | Percentage of Brazil nut declared on the label | BNS (Cp) ^a | PAC (Cp) ^b | Estimated Brazil nut percentage |
|-------------------------|--|-----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Chocolate-1 | Brazil nuts (15%) | 24.27 ± 0.04 | 13.24 ± 0.09 | 9.052 |
| Chocolate-2 | Brazil nuts | 26.67 ± 0.06 | 13.36 ± 0.07 | 1.889 |
| Food-bar-1 | Brazil nuts | 26.99 ± 0.09 | 15.19 ± 0.06 | 1.533 |
| Food bar-2 | Brazil nuts | 30.12 ± 0.08 | 13.80 ± 0.03 | 0.199 |
| Food bar-3 | Brazil nuts | 25.20 ± 0.30 | 14.12 ± 0.08 | 4.932 |
| Food bar-4 | Brazil nuts | 29.33 ± 0.12 | 15.46 ± 0.04 | 0.333 |
| Food bar-5 | Brazil nuts (8%) | 26.06 ± 0.01 | 15.07 ± 0.05 | 2.813 |
| Food bar-6 | Brazil nuts (6.2%), | 23.78 ± 0.02 | 16.19 ± 0.02 | 12.465 |
| Muesli-1 | Brazil nuts (2.8%) | 30.22 ± 0.03 | 14.10 ± 0.03 | 0.186 |
| Breakfast cereals-1 | Brazil nuts (3.3%) | 26.94 ± 0.03 | 14.75 ± 0.07 | 1.584 |
| Breakfast cereals-2 | Nuts (6.5%) (Brazil nuts, pecan nuts) | 24.93 ± 0.04 | 13.30 ± 0.05 | 5.883 |
| Breakfast cereals-3 | Brazil nuts (3.5%) | 29.74 ± 0.04 | 16.72 ± 0.04 | 0.254 |
| Breakfast cereals-4 | Nuts (4%) (Brazil nuts, pecan nuts) | 29.98 ± 0.01 | 13.46 ± 0.01 | 0.218 |
| Milled Flaxseed-1 | Brazil nuts (10%) | 25.02 ± 0.01 | 14.02 ± 0.02 | 5.547 |
| Biscuits-1 | Brazil nuts (18%) | 26.57 ± 0.09 | 14.40 ± 0.01 | 2.016 |
| Commercial food product | Traces of nuts declared on the label | BNS (Cp) | PAC (Cp) | Estimated Brazil nut percentage |
| Chocolate-8 | Traces of Brazil nuts | 34.88 ± 0.06 | 15.34 ± 0.07 | 0.009 |
| Breakfast cereals-10 | May contain traces of nuts | 35.34 ± 0.04 | 13.75 ± 0.06 | 0.007 |
| Food bar-7 | May contain traces of nuts | 36.47 ± 0.03 | 15.33 ± 0.01 | 0.003 |
| Food-bar-8 | May contain traces of nuts | 35.84 ± 0.09 | 16.37 ± 0.07 | 0.005 |

^a BNS: Brazil nut specific system on the *Ber e 1* gene. Average Cp value ± standard deviation of triplicate analysis.
^b PAC: Positive amplification control on the 18S rRNA gene.

of chocolates that declared to contain Brazil nut corresponds to a fraudulent substitution by cheaper nuts. Nevertheless, the lack of positive results in products labeled as 'may contain traces of Brazil nut' could be explained because its content was below LOD, or because Brazil nut-containing products are manufactured at the same factory and the company prefers to alert about a possible contamination in order to safeguard allergic consumers.

In an attempt to estimate Brazil nut content, Cp values obtained from commercial food products which yielded positive results in the BNS were interpolated in the linear regression equation obtained from binary mixtures of wheat flour and roasted Brazil nut. Table 4 shows the estimated Brazil nut percentages of the commercial products after substitution of the Cp values in the regression equation. According to the results obtained, the estimated Brazil nut content was lower than that stated in the labels for most products, except for Food bar-6 and Breakfast cereals-2. It is important to note that food processing encompass different time–temperature combinations, and also that a wide number of ingredients are employed. Even though some approaches have been recently purposed to compensate for the variability in DNA extraction and amplification in food materials (Demmel, Hupfer, Busch, & Engel, 2012; Hirao, Hiramoto, Imai, & Kato, 2006), quantification of Brazil nut in commercial products is affected by the heat treatments and food matrices analyzed. Thus, accurate quantification would require different standard curves for different products, according to their composition and processing conditions.

4. Conclusions

The real-time PCR system developed is highly sensitive and specific, which makes it particularly suitable for detection of small amounts of Brazil nut DNA in food products, with a LOD of 2.5 mg/kg. False negative results are avoided by the use of a positive amplification control based on the 18S rRNA gene. In addition to experimental mixtures, the method has proven to be appropriate for analysis of a wide range of processed commercial food products, including breakfast cereals, cakes, chocolates, and energetic bars, that may contain Brazil nut as an ingredient or contaminant. The results obtained were found to confirm the product labels in most cases. However, some samples which declared Brazil nut as an ingredient yielded a negative result. Due to the high economic value of Brazil nut, fraudulent substitution with a cheaper ingredient is the most probable reason for the negative results in these products. The method is rapid and could be performed as a routine analysis to enforce compliance with food labeling legislation, in order to protect allergic consumers against Brazil nut's allergens, and also to avoid fraudulent replacement of Brazil nut by more economic ingredients.

Acknowledgments

This study was supported by Grant No. AGL 2010-15279 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain, and the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (Spain). Silvia de la Cruz Ares is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain.

References

Alcocer, M., Rundqvist, L., & Larsson, G. (2012). Ber e 1 protein: the versatile major allergen from Brazil nut seeds. *Biotechnology Letters*, 34, 597–610.

Ben Rejeb, S., Abbott, M., Davies, D., Clérout, C., & Delahaut, P. (2005). Multi-allergen screening immunoassay for the detection of protein markers of peanut and four tree nuts in chocolate. *Food Additives and Contaminants*, 22, 709–715.

Blais, B. W., Gaudreault, M., & Phillippe, L. M. (2003). Multiplex enzyme immunoassay system for the simultaneous detection of multiple allergens in foods. *Food Control*, 14, 43–47.

Blais, B. W., Omar, M., & Phillippe, L. (2002). Detection of Brazil nut proteins in foods by enzyme immunoassay. *Food and Agricultural Immunology*, 14, 163–168.

Brezná, B., Dudášová, H., & Kuchta, T. (2010). A novel real-time polymerase chain reaction method for the detection of Brazil nuts in food. *Journal of AOAC International*, 93, 197–201.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611–622.

Camacho, M. A., Torres, A. L., Gil-Alegre, M. E., Obregón, M. M., & Ruz, V. (1993). Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pratiques*, 3, 197–202.

Chapman, J. A., Bernstein, I. L., Lee, R. E., Oppenheimer, J., Nicklas, R. A., Portnoy, J. M., et al. (2006). Food allergy: a practice parameter. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 96, S1–S68.

Chunhieng, T., Pétritis, K., Elfakir, C., Brochier, J., Goli, T., & Montet, D. (2004). Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4318–4322.

Clemente, A., Chambers, S. J., Lodi, F., Nicoletti, C., & Brett, G. M. (2004). Use of the indirect competitive ELISA for the detection of Brazil nut in food products. *Food Control*, 15, 65–69.

Demmel, A., Hupfer, C., Busch, U., & Engel, K. H. (2012). Quantification of lupine (*Lupinus angustifolius*) in wheat flour using real-time PCR and an internal standard material. *European Food Research and Technology*, 235, 61–66.

Dorak, M. T. (2006). *Real-time PCR*. In *Bios advanced methods series*. London: Taylor & Francis Group.

European Parliament and Council. (2007). Commission Directive 2007/68/EC of 27 November 2007 amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain food ingredients. *Official Journal*, L 310, 11–14.

European Parliament and Council. (2011). Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004. *Official Journal of the European Union*, L 304, 18–63.

Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., et al. (2009). A LightCycler TaqMan PCR assay for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in experimental meat mixtures. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 1997–2004.

Hirao, T., Hiramoto, M., Imai, S., & Kato, H. (2006). A novel PCR method for quantification of buckwheat by using a unique internal standard material. *Journal of Food Protection*, 69, 2478–2486.

Hubalkova, Z., & Rencova, E. (2011). One-step multiplex PCR method for the determination of pecan and Brazil nut allergens in food products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 2407–2411.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2005). Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1).

Jackson, W. F. (2003). *Food allergy*. In *ILSI Europe concise monograph series*. ILSI Press.

Jonas, D. A., Elmadfa, I., Engel, K. H., Heller, K. J., Koziowski, G., König, A., et al. (2001). Safety considerations of DNA in food. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 45, 235–254.

Kirsch, S., Fourdrilis, S., Dobson, R., Scippo, M. L., Maghuin-Rogister, G., & De Pauw, E. (2009). Quantitative methods for food allergens: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 57–67.

Koppelman, S. J., Nieuwenhuizen, W. F., Gaspari, M., Knippels, L. M. J., Penninks, A. H., Knol, E. F., et al. (2005). Reversible denaturation of Brazil nut 2S albumin (Ber e1) and implication of structural destabilization on digestion by pepsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 123–131.

Kumar, S., Verma, A. K., Das, M., & Dwivedi, P. D. (2012). Allergenic diversity among plant and animal food proteins. *Food Reviews International*, 28, 277–298.

Monaci, L., & Visconti, A. (2010). Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 272–283.

Moreno, F. J., & Clemente, A. (2008). 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens? *The Open Biochemistry Journal*, 2, 16–28.

Moreno, F. J., Jenkins, J. A., Mellon, F. A., Rigby, N. M., Robertson, J. A., Wellner, N., et al. (2004). Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1698, 175–186.

Pegels, N., González, I., Martín, I., Rojas, M., García, T., & Martín, R. (2011). Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control*, 22, 1189–1196.

Phillips, K. M., Ruggio, D. M., & Ashraf-Khorassani, M. (2005). Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9436–9445.

Poms, R. E., Anklam, E., & Kuhn, M. (2004). Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *Journal of AOAC International*, 87, 1391–1397.

Poms, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21, 1–31.

- Regulations Amending the Food and Drug Regulations (1220-Enhanced for Food Allergen and Gluten Sources and Added Sulphites). (2011). SOR/2011-28, February 4. *Canada Gazette Part II*, 145(4), 324–330.
- Robbins, K. S., Shin, E. C., Shewfelt, R. L., Eitenmiller, R. R., & Pegg, R. B. (2011). Update on the healthful lipid constituents of commercially important tree nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12083–12092.
- Röder, M., Filbert, H., & Holzhauser, T. (2010). A novel, sensitive and specific real-time PCR for the detection of traces of allergenic Brazil nut (*Bertholletia excelsa* L.) in processed foods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 2279–2288.
- Ros, E., Tapsell, L. C., & Sabaté, J. (2010). Nuts and berries for heart health. *Current Atherosclerosis Reports*, 12, 397–406.
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T. P., Maguire, A. R., & O'Brien, N. M. (2006). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, 219–228.
- Sathe, S. K., & Sharma, G. M. (2009). Effects of food processing on food allergens. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 970–978.
- Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A., et al. (2009). Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 69–81.
- Sharma, G. M., Roux, K. H., & Sathe, S. K. (2009). A sensitive and robust competitive enzyme-linked immunosorbent assay for Brazil nut (*Bertholletia excelsa* L.) detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 769–776.
- Taylor, S. L., Crevel, R. W. R., Sheffield, D., Kabourek, J., & Baumert, J. (2009). Threshold dose for peanut: risk characterization based upon published results from challenges of peanut-allergic individuals. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1198–1204.
- Threshold Working Group. (2008). Approaches to establish thresholds for major food allergens and for gluten in food. *Journal of Food Protection*, 71, 1043–1088.
- Woolfe, M., & Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *TRENDS in Biotechnology*, 22, 222–226.
- Yang, J. (2009). Brazil nuts and associated health benefits: a review. *Food Science and Technology*, 42, 1573–1580.

CAPÍTULO 4

DETECCIÓN SENSIBLE Y ESPECÍFICA DE ALMENDRA (*Prunus dulcis*) EN ALIMENTOS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

CHAPTER 4

SENSITIVE AND SPECIFIC DETECTION OF ALMOND (Prunus dulcis) IN COMMERCIAL FOOD PRODUCTS BY REAL-TIME PCR

LWT - Food Science and Technology 56 (2014) 31-39



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Sensitive and specific detection of almond (*Prunus dulcis*) in commercial food products by real-time PCR



Inés María López-Calleja*, Silvia de la Cruz, Nicolette Pegels, Isabel González, Rosario Martín, Teresa García

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2013
Received in revised form
30 September 2013
Accepted 26 October 2013

Keywords:

TaqMan real-time PCR
Almond (*Prunus dulcis*)
Commercial food products
Food allergy

ABSTRACT

Almond has been widely used in all sorts of food products, mostly due to its pleasant flavor and health benefits. However almonds can become an important health problem since they are responsible for triggering adverse immune responses in allergic individuals, and since they are present in many processed foods they are considered as a potential hidden allergen. Consequently, it's important for food processors and regulatory agencies to be able to ensure accurate labeling of foods to protect the safety of the public and to avoid expensive recalls. We propose a simple and highly sensitive approach to detect almond in a wide range of processed foods. The method consists of a real-time PCR assay targeting the gene encoding for the ITS1 in almond, using a nuclease (TaqMan) probe labeled with FAM and BBQ. Sensitivity of real time PCR was determined by analysis of raw and heat treated almond-wheat flour mixtures with a range of detection of 0.1–100,000 mg/kg. The assay was successfully trialed on a total of 214 commercial foodstuffs allowing the detection of trace amounts of almond down to the level of 0.1 mg/kg, and is therefore proposed as a ready-to-use analytical tool to trace almond allergens in foods.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tree nuts have attained an important place in human diets because they are considered excellent foods, mainly due to their pleasant taste and potential health benefits. Particularly, the consumption of almonds has been associated with nutritional benefits, including cholesterol-lowering effects, protection against diabetes and potential prebiotic properties (Chen, Lapsley, & Blumberg, 2006; Jenkins et al., 2002, 2008; Mandalari, Nueno-Palop, Bisignano, Wickham, & Narbad, 2008). Almonds are used as an ingredient in a wide variety of food products (spreads, bakery, pastry, chocolates, and confectionary products) (Alasalvar & Shahidi, 2008), which are more or less related to the population habits and/or the type of tree nuts available in the geographical region. In the USA, almonds rank first in the per capita consumption among tree nuts (USDA, 2009). Between 1997 and 2007 the production capacity of the 20 countries growing most of almonds has approximately doubled from 0.993 to 2.019 million metric tons.

Approximately 50% of the world's almond production originated from the USA (FAOSTAT, 2010).

However, this potential health benefits attributed to almonds do not apply to everyone since this tree nut is a known allergenic food. Almonds are known to be responsible for triggering abnormal immunological responses in allergic individuals, ranging from mild reactions to potentially fatal anaphylactic shocks, even after the ingestion of minimal doses of the allergenic food (Sampson, Mendelson, & Rosen, 1992; Yunginger et al., 1988). In the United States, by the use of random-calling telephone surveys, through an 11-year follow up study, there was an increase of almond allergy among other tree nut allergy prevalence in children, ranging from 0.6% in 1997 to 1.2% in 2002 and 2.1% in 2008, whereas in the adult population the same prevalence remained around 1.3% (Sicherer, Muñoz-Furlong, Godbold, & Sampson, 2010).

Food allergic individuals are strongly advised to manage their food allergy through strict avoidance of the allergenic food (Sampson, 2004, 2005; Sicherer & Sampson, 2006). Therefore, food labels that provide accurate ingredient information are of vital importance. Despite this, the ingestion of almonds often happens accidentally because of mislabeling of products, rework processes, which include almond-containing foods or cross-contamination during processing (Costa, Mafra, Carrapatoso, & Oliveira, 2012a).

Abbreviations: ASS, almond specific system; PAC, positive amplification control.
Corresponding author. Tel.: +34 913943750.
E-mail addresses: ilopezcalleja@vet.ucm.es, ineslopezcalleja@gmail.com (I. López-Calleja).

To safeguard sensitized individuals with respect to the contents of almonds and other allergenic components in food products, legislation on food labeling has established clear guidelines in the European regulation (EU 1169/2011/EC (OJEU, 2011)), as well as in the USA (Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004), Canada (Regulations Amending the Food and Drug Regulations, 2011) and other countries. Thus, appropriate analytical methods are needed for the sensitive and specific allergen detection to verify labeling requirements and to identify cross contact with allergenic foods.

The need for adequate methodology to detect food allergens has been rapidly increasing over recent years, especially in response to the demands imposed by current legislation. The food industry has been addressing with special interest the necessities of food allergic consumers, not only concerning the proper food labeling but also minimizing allergen cross-contamination among foodstuffs. Therefore, suitable analytical methods are required to detect allergenic proteins, as they are mostly present at trace levels (Baumgartner, Krska, & Welzig, 2007). The requirements needed for detecting allergenic ingredients in food involve appropriate specificity and sensitivity to trace minute amounts of the target allergens or the correspondent markers in complex food matrices, including processed foods.

Several methods for almond detection have been developed, mainly relying on immunochemical and DNA-based techniques. Immunochemical methods have been successfully applied for the detection of almond allergens in food with the specificity based on

the specific interaction between the antibody and the antigen, which is the allergen or marker protein in the case of food allergen detection (Garber & Perry, 2010; Rejeb, Abbott, Davies, Cleroux, & Delahaut, 2005; Roux, Teuber, Robotham, & Sathe, 2001). Nevertheless, the use of immunoassays has numerous problems mainly due to the cross-reactivity with non target proteins and the low resistance of proteins to food processing during thermal processing, because it can cause conformational changes in the tridimensional structure of the epitopes (e.g., heat induced denaturation) and/or protein cleavage, affecting linear epitopes (e.g., fermentation).

On the other hand, DNA-based methods have been increasingly used as highly sensitive and specific alternatives for allergen detection, taking advantage of the greater thermal stability of DNA molecules compared to proteins. These techniques rely on the use of polymerase chain reaction (PCR), either as qualitative end-point PCR, being distinguished on the basis of their differential migration through agarose gel electrophoresis, or by real-time PCR using fluorescent labeled probes or dyes. Nevertheless, real-time PCR has been so far the most widely applied PCR strategy to detect food allergens (Fajardo et al., 2009; López-Calleja et al., 2013; Platteau, De Loose, De Meulenaer, & Taverniers, 2011; Scaravelli, Brohee, Marchelli, & Van Hengel, 2008). Several real-time PCR approaches have been proposed to detect food allergens from almonds (Costa, Mafra, & Oliveira, 2012b; Koppel et al., 2010; Pafundo, Gulli, & Marmioli, 2009, 2010; Röder, Vieths, & Holzhauser, 2011).

Table 1

List of almond varieties analyzed by the almond real-time PCR system.

| Type of material | Almond variety | Scientific name | Country of origin | ITS A.S.S | 18S rRNA P.A.C |
|------------------|------------------------------------|--------------------------|-------------------|-----------|----------------|
| Leaves | Wild Almond "Prunus webbii" | <i>Prunus webbii</i> | Unknown | + | + |
| Leaves | Wild Almond "Prunus vavilovi" | <i>Prunus vavilovi</i> | Unknown | + | + |
| Leaves | Wild Almond "Prunus kotchkii" | <i>Prunus kotchkii</i> | Unknown | + | + |
| Leaves | Wild Almond "Prunus orientalis" | <i>Prunus orientalis</i> | Unknown | + | + |
| Leaves | Almond "Gorki" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Unknown | + | + |
| Leaves | Almond "Tuono" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Italy | + | + |
| Leaves | Almond "Genco" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Italy | + | + |
| Leaves | Almond "Lauranne" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | France | + | + |
| Leaves | Almond "Primorskii" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Ucrania | + | + |
| Leaves | Almond "Nonpareil" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | EEUU | + | + |
| Leaves | Almond "Texas" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | EEUU | + | + |
| Leaves | Almond "Chellaston" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Australia | + | + |
| Leaves | Almond "Ardechoise" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | France | + | + |
| Leaves | Almond "Penta" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Tardona | + | + |
| Leaves | Almond "Tardona" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Leaves | Almond "Achaak" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Tuñez | + | + |
| Leaves | Almond "Marcona" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Leaves | Almond "Desmayo Largueta" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Leaves/Kernel | Almond "Antoñeta" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Leaves/Kernel | Almond "Ferragnes" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | France | + | + |
| Leaves/Kernel | Almond "Marta" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Vairo" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Marinada" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Constanti" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Tarraco" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Masbovera" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Glorieta" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Francoli" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Guara" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Soleta" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Belona" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Bitter" cultivar | <i>Prunus dulcis</i> | Unknown | + | + |
| Kernel | Almond "Largueta" | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Comuna" | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "Marcona" | <i>Prunus dulcis</i> | Spain | + | + |
| Kernel | Almond "California" | <i>Prunus dulcis</i> | EEUU | + | + |

ITS A.S.S: Almond-specific system on the Internal Transcribed Spacer (*AlmondITSdir/AlmondITSinv* and *AlmondITSF*).

18S rRNA P.A.C: Positive amplification control (*18Sdir/18Sinv*, and *18SP*) for the almond system on the 18S rRNA gene.

The aim of this study was to develop a DNA based qualitative real-time PCR method based on the use of a multicopy *ITS* genetic marker in order to improve the sensibility of PCR techniques for detection of traces of almonds in commercial products.

2. Materials and methods

2.1. Sample selection

Almonds, tree nuts, peanuts and various commercial brands of food were purchased from different local stores and several delicatessen markets and stored at room temperature in the dark. A total of 35 different almond cultivars (leaves and single kernels) provided by the IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Tarragona, Spain) and the CEBAS-CSIC (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Murcia, Spain), and four commercial varieties (single kernels) obtained from different delicatessen markets, were considered for analysis in order to check the specificity of the almond real-time PCR system (Table 1). Moreover, a wide range of plant (flesh and kernels) and animal (flesh) species was also included in the assays for specificity control purposes (Table 2).

Almonds (Marcona) were finely grounded and binary mixtures of raw and heat treated almond in wheat flour, containing 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10,000 and 100,000 mg/kg of almonds, were prepared to a final weight of 500 g using a kitchen robot (Thermomix, Vorwerk). Heat treatment, when applied, consisted of 160 °C for 13 min. This heat treatment was chosen to create samples homologous to certified IRRM materials for peanut.

2.2. DNA extraction

Two hundred milligrams of each sample were homogenized with 860 µL of extraction buffer, pH 8.0 (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA and 1% SDS), 100 µL of 5 M guanidine hydrochloride and 40 µL of 20 mg/mL proteinase K (Merck, Darmstadt Germany), and incubated overnight at 55 °C with shaking at 60 rpm. Then, the samples were left to cool at room temperature. Five hundred µL of chloroform (Sigma Aldrich) were added to the lysate before centrifugation at 16,438 g for 10 min at room temperature (Heraeus® Primo Centrifuge, United Kingdom).

Genomic DNA from the clear aqueous supernatant obtained after the centrifugation (500 µL) was purified using the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega, Madison, WI, USA) as described by López-Calleja et al. (2007). The DNA was eluted in 50 µL of sterile deionized water. DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE) and adjusted to a final concentration of 100 ng per reaction. Unless otherwise stated, three DNA replicates were extracted from each sample. A negative control sample was included in every DNA extraction. The DNA extracted from raw and heat-treated almond was electrophoresed in a 1% D1 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing 1 µg/mL ethidium bromide in Tris–acetate buffer (0.04 M Tris–acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0) for 30 min at 110 V. Total DNA was visualized by UV transillumination using a Chemidoc x RS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

2.3. Oligonucleotide primers and probes

Due to the fact that there weren't any almond *ITS* gene sequences available in the GenBank database at the beginning of the research, we purified and sequenced the *ITS* gene sequence for the target allergen. For this purpose, we used *ITS-1* and *ITS-2*

Table 2
Specificity of the almond real-time PCR system.

| Common name | Scientific name | <i>ITS</i> A.S.S | <i>18S</i> rRNA P.A.C |
|-------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Almond | <i>Prunus dulcis</i> | 17.53 ± 0.33 ^a | 14.79 ± 0.03 |
| Hazelnut | <i>Corylus avellana</i> | – | 14.53 ± 0.02 |
| Peanut | <i>Arachis hypogaea</i> | – | 16.61 ± 0.01 |
| Walnut | <i>Juglans regia</i> | – | 15.02 ± 0.04 |
| Pistachio | <i>Pistacia vera</i> | – | 14.15 ± 0.06 |
| Macadamia | <i>Macadamia intergrifolia</i> | – | 16.17 ± 0.01 |
| Cashew nut | <i>Anacardium occidentale</i> | – | 15.13 ± 0.04 |
| Brazil nut | <i>Bertholletia excelsa</i> | – | 16.13 ± 0.01 |
| Pecan | <i>Carya illinoensis</i> | – | 16.20 ± 0.01 |
| Soybean | <i>Glycine max</i> | – | 16.52 ± 0.06 |
| Green bean | <i>Phaseolus vulgaris</i> | – | 16.01 ± 0.02 |
| Green pea | <i>Pisum sativum</i> | – | 15.01 ± 0.01 |
| Chickpea | <i>Cicer arietinum</i> | – | 14.87 ± 0.01 |
| Lentil | <i>Lens culinaris</i> | – | 15.21 ± 0.02 |
| Tiger Nut | <i>Cyperus esculentum</i> | – | 15.46 ± 0.04 |
| Lupine | <i>Lupinus albus</i> | – | 15.48 ± 0.03 |
| Acorn | <i>Quercus ilex</i> | – | 14.72 ± 0.02 |
| Chestnut | <i>Aesculus hippocastanum</i> | – | 16.38 ± 0.03 |
| Sesame | <i>Sesamum indicum</i> | – | 15.78 ± 0.01 |
| Pine nut | <i>Pinus pinea</i> | – | 16.34 ± 0.01 |
| Barley | <i>Hordeum vulgare</i> | – | 14.32 ± 0.06 |
| Oat | <i>Avena sativa</i> | – | 14.01 ± 0.03 |
| Rye | <i>Secale cereale</i> | – | 14.23 ± 0.02 |
| Rice | <i>Oryza sativa</i> | – | 14.56 ± 0.04 |
| Sunflower | <i>Helianthus annuus</i> | – | 14.11 ± 0.02 |
| Maize | <i>Zea mays</i> | – | 15.11 ± 0.06 |
| Wheat | <i>Triticum aestivum</i> | – | 13.55 ± 0.01 |
| Cocoa | <i>Theobroma cacao</i> | – | 15.05 ± 0.05 |
| Grape | <i>Vitis vinifera</i> | – | 15.04 ± 0.01 |
| Pear | <i>Pyrus rosaceae</i> | – | 14.81 ± 0.01 |
| Apple | <i>Malus domestica</i> | – | 14.43 ± 0.01 |
| Apricot | <i>Prunus armeniaca</i> | – | 15.34 ± 0.01 |
| Cherry | <i>Prunus avium</i> | – | 16.03 ± 0.01 |
| Sour cherry | <i>Prunus cerasus</i> | – | 15.21 ± 0.01 |
| Peach | <i>Prunus persica</i> | – | 15.03 ± 0.04 |
| Plum | <i>Prunus domestica</i> | – | 16.02 ± 0.02 |
| Banana | <i>Musa cavendishii</i> | – | 15.87 ± 0.01 |
| Kiwifruit | <i>Actinidia deliciosa</i> | – | 13.98 ± 0.01 |
| Watermelon | <i>Citrullus lanatus</i> | – | 14.67 ± 0.02 |
| Orange | <i>Citrus sinensis</i> | – | 13.87 ± 0.01 |
| Potato | <i>Solanum tuberosum</i> | – | 14.02 ± 0.02 |
| Garlic | <i>Allium sativum</i> | – | 15.09 ± 0.01 |
| Onion | <i>Allium cepa</i> | – | 14.73 ± 0.02 |
| Eggplant | <i>Solanum melongena</i> | – | 15.21 ± 0.01 |
| Zucchini | <i>Cucurbita pepo</i> | – | 16.34 ± 0.03 |
| Tomato | <i>Solanum lycopersicum</i> | – | 13.92 ± 0.01 |
| Asparagus | <i>Asparagus officinalis</i> | – | 14.87 ± 0.02 |
| Carrot | <i>Daucus sativus</i> | – | 15.45 ± 0.02 |
| Olive | <i>Olea europaea</i> | – | 16.26 ± 0.07 |
| Cattle | <i>Bos taurus</i> | – | 13.98 ± 0.00 |
| Sheep | <i>Ovis aries</i> | – | 14.12 ± 0.02 |
| Goat | <i>Capra hircus</i> | – | 15.44 ± 0.01 |
| Swine | <i>Sus scrofa domestica</i> | – | 14.34 ± 0.07 |

ITS A.S.S.: Almond-specific system on the Internal Transcribed Spacer (*AlmondITSdir*, *AlmondITSinv* and *AlmondITS*).

18S rRNA P.A.C.: Positive amplification control (*18Sdir*/*18Sinv*, and *18SP*) for the almond system on the *18S* rRNA gene.

^a Average Cp value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extracted from kernels from 18 almonds varieties. Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles.

oligonucleotides designed by Fernández et al. (2001) (with a slightly modified *ITS-2* primer) for the amplification, purification and sequencing of an approximately 650 bp fragment from the *ITS-1*, *5.8S* rRNA and *ITS-2* region from three almond “cultivars” (Lauranne, Marcona and Nonpareil) as well as two plums (Chile and South Africa) and one apricot. Polymerase chain reaction products (120 µL) amplified with *ITS-1* and *ITS-2* oligonucleotides from almond were loaded in a 2% LM2 (Hispanlab S. A.) agarose gel containing 1 µg/mL of ethidium bromide in Tris–acetate buffer and electrophoresed at 90 V for 40 min. Each DNA fragment was excised from the agarose gel under UV light using a sterile scalpel. The gel

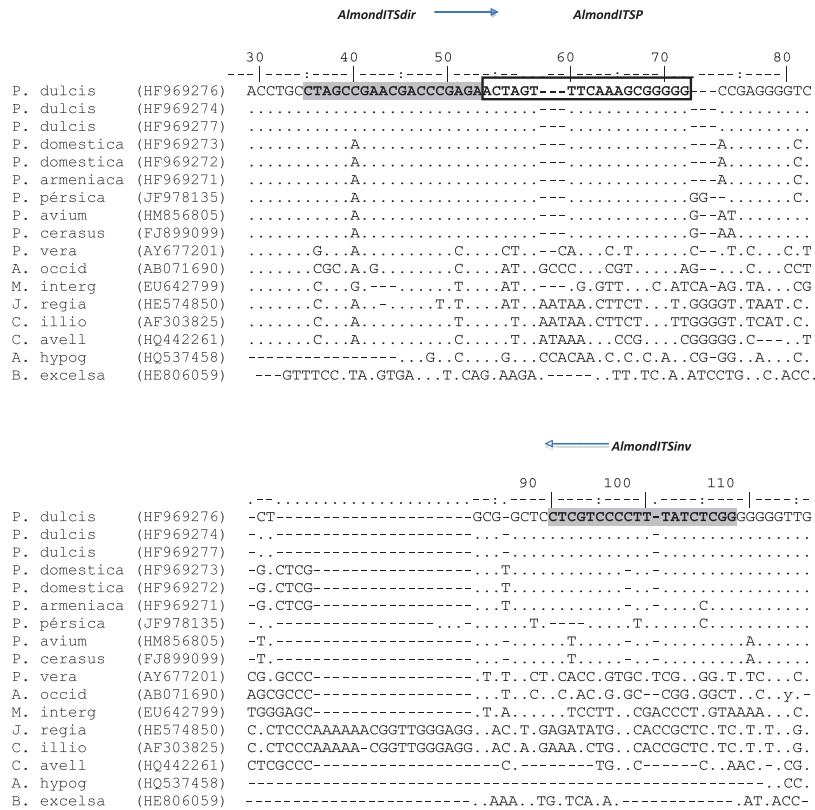


Fig. 1. Deoxyribonucleic acid sequence alignment of the ITS region PCR products from almond (*Prunus dulcis*: Marcona/HF969276, Nonpareil/HF969274 and Lauranne/HF969277), plum (*Prunus domestica* HF969273 and HF969272), apricot (*Prunus armeniaca* HF969271), peach (*Prunus pérsica* JF978135), cherry (*Prunus avium* HM856805), sour cherry (*Prunus cerasus* FJ899099), pistachio (*Pistacia vera* AY677201), cashew nut (*Anacardium occidentale* AB071690), macadamia (*Macadamia intergrifolia* EU642799), walnut (*Juglans regia* HE574850), pecan (*Carya illinoensis* AF303825), hazelnut (*Corylus avellana* HQ442261), peanut (*Arachis hypogaea* HQ537458) and Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HE806059), available at the GenBank-EMBL database. Primers *AlmondITSdir*, *AlmondITSinv*, and *AlmondITSP* probe are highlighted.

slice was purified with the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the PCR products was estimated by agarose gel electrophoresis using a standard as reference marker (REAL, Durviz S.L., Valencia, Spain). Purified PCR products were sequenced at Sistemas Genómicos S.L. (Parque Tecnológico de Valencia, Spain). Deoxyribonucleic acid sequencing was accomplished in an ABI Prism model 377 DNA sequencer (Perkin–Elmer/Applied Biosystems) using *ITS-1* and *ITS-2* primers with the dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin–Elmer/Applied Biosystems). The sequences obtained were submitted to GenBank-European Molecular Biology Laboratory database and were assigned with the accession numbers HF969277 (Lauranne), HF969276 (Marcona), HF969274 (Nonpareil), HF969273 (Plum-Chile), HF969272 (Plum-South Africa) and HF969271 (Apricot).

The *ITS* gene sequences obtained from Lauranne, Marcona and Nonpareil almonds were aligned together with the sequences from plum and apricot and other plants and animal *ITS* gene sequences available in the GenBank database, in order to visualize similarities and differences among the sequences of different almond cultivars and other close related plant species. Information obtained after alignment and comparison of almond and the other *ITS* gene sequences was used to design the almond-specific primer pair *AlmondITSdir/AlmondITSinv*, potentially suitable for the amplification of a specific 76-bp DNA fragment.

Primers *18Sdir* and *18Sinv*, based on conserved *18S* rRNA gene sequences available in the Genbank/EMBL database for various plant and animal species, were used as positive amplification control of the PCR assay (Pegels et al., 2011, 2012; Pegels, González, Fernández, García, & Martín, 2012; Pegels, González, García, & Martín, 2011; Pegels, González, López-Calleja, García, & Martín, 2013). These primers were expected to amplify a conserved fragment of 77 bp from the *18S* rRNA gene in eukaryotes.

The EMMA program included in the EMBOSS software package version 2.0 and the Primer Express 2.0 software (Perkin–Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) were used for sequence alignment and primer design.

To accomplish the detection procedure, specific fluorescent hybridization TaqMan probe for almond (*AlmondITSP*) was used. Besides, another TaqMan probe (*18SP*) based on conserved *18S* rRNA gene sequences available in the Genbank/EMBL database for various plant and animal species was used as a positive control in the real-time PCR system. TaqMan probes were designed and synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany). The TaqMan probes were aimed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the corresponding target (Fig. 1) and were dual labeled on the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) and on the 3' end with the blackberry (BBQ) fluorescent quencher.

The sequences and description of the primers and probes used in this work are summarized in Table 3.

Table 3
DNA sequences and description of the primers and probes used in this study.

| | Length (bp) | Sequence (5' → 3') | Description | Target gene | Fragment length (bp) |
|---------------------|-------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|----------------------|
| Primers | | | | | |
| <i>ITS-1</i> | 19 | GTTTCGGTAGGTGAACCTG | Sequencing forward primer | <i>ITS</i> | 650 |
| <i>ITS-2</i> | 19 | CGTCTGAYCTGRGGTCG | Sequencing reverse primer | | |
| <i>AlmondITSdir</i> | 19 | CTAGCCGAACGCCGAGA | Almond-specific forward primer | <i>ITS</i> | 76 |
| <i>AlmondITSinv</i> | 19 | CCGAGATAAAGGGGACGAG | Almond-specific reverse primer | | |
| <i>18Sdir</i> | 16 | TGGTGCACGAGCCGC | Positive control forward primer | <i>18S rRNA</i> | 77 |
| <i>18Sinv</i> | 25 | TCCAACCTACGAGCTTTTAACTGCA | Positive control reverse primer | | |
| Probes | | | | | |
| <i>AlmondITSP</i> | 22 | 6FAM-ACTAGTTTCAAAGCGGGG-BBQ | Almond probe | <i>ITS</i> | |
| <i>18SP</i> | 22 | 6FAM-CGCTATTGGAGCTGGAATTACC-BBQ | Universal probe | <i>18S rRNA</i> | |

2.4. Real-time PCR

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. The optimum PCR concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest C_p (crossing point value) were experimentally determined for each set of primers: 300 nM for forward primers and 900 nM for reverse primers. The PCR reactions were carried out using the LightCycler® TaqMan® Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan probe (TibMolBiol), and 100 ng of template DNA. Amplification reactions were done in a total reaction volume of 10 µL in a glass capillary tube and were run on the LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Ponsberg, Germany) with the following program: an amplification program of 55 cycles at 95 °C for 5 s and 60 °C for 30 s. Samples were then cooled to 40 °C for 30 s. This program was used to amplify the species-specific PCR system, along with the positive amplification control. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extract.

The crossing point value (C_p), which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level, was calculated automatically by the LightCycler software as the first maximum of the second derivative of the curve. The continual measurement of fluorescence is related to the amount of amplicon in the real time PCR, yielding a qualitative result on the presence of the target species.

2.5. Construction of standard curves and data analysis

To assess the efficiency, linear range and analytical sensitivity of the *ITS1* almond-specific system, a standard curve were constructed using two binary mixtures of known almonds content (raw & heat treated almond/wheat flour) rendered under homogeneous conditions and containing increasing amounts of target material. The amount of target DNA in an unknown sample can be then measured by extrapolation of the C_p value obtained in the unknown sample in the standard curve of C_p values generated from known DNA concentrations of the target species. In addition, the correlation between the variables, crossing point (C_p) and concentration ($[·]$) is semilogarithmic:

$$C_p = b \log [·] + a$$

where b is the slope and a is the intercept.

Linearity test, sensitivity, accuracy and precision parameters of the species-specific real-time PCR systems were evaluated according to previously described methods (Camacho, Torres, Gil-Alegre, Obregón, & Ruz, 1993; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [ICH] 2005). To carry out the validation of the real-time PCR technique developed in this work, three separate

DNA extractions of each almond concentration were assayed in different days, using three replicates of each sample. Precision of the assay was evaluated by comparing the coefficient of variation (CV) values obtained in three different days versus those obtained in the same day, to assess the influence of random events (day of analysis, analyst, equipment, etc.) in the data obtained.

3. Results and discussion

3.1. Almond-specific system on the *ITS1* gene

3.1.1. TaqMan real-time PCR

The real-time PCR assay developed in this work was based on the *Internal Transcribed Spacer 1* region. The *ITS* region results an ideal candidate for primer designing, due to the high copy number of rRNA genes easy to amplify even from small quantities of DNA, which contribute to increase the sensitivity of the present PCR. Also, the presence of a multi-copy gene makes easier the recovery of at least a few copies when subjected to intense thermal processing conditions. Commercial production processes of tree nuts and peanuts involve heat treatment such as roasting, which degrades DNA, thereby the selection of a short *ITS1* amplicon of 76 bp is relevant for real-time PCR analysis aimed to detection of almond in commercial food products. Moreover, the *ITS* gene also presents a high degree of sequence variation required for identification of closely related species. In addition, the use of a conserved region in the nuclear *18S rRNA* gene would provide a positive control as described before.

3.1.2. Specificity and sensitivity

Specificity and sensitivity are two important indices of performance of qualitative assays. The close phylogenetic relationships among almond and tree nut species, together with the varied number of plants and animals components that can be present in different commercial food products indicates the need to check the cross reactivity of the PCR against a wide range of species. In this sense, and even though a Blast evaluation of the almond sequences in the NCBI database suggested a possible cross reactivity with some other *Prunus* species, a total of 35 samples of these "stone fruits" (plums, apricots, peaches, cherries and sour cherries) were tested and no amplification was achieved, proving that the system is almond-specific. Additionally to this the specificity of the almond real-time PCR system (primers and probe) on the *ITS1* gene was assessed by analysis of the DNA extracted from 48 plant species (including the latter ones) and 4 animal species. As expected, the almond specific PCR system on the *ITS1* gene successfully detected a DNA fragment of 76 bp from almonds, while no positive amplification signal was obtained on the animal and plant species tested (Table 2). Moreover, leaves and kernels from a total of 35 almond cultivars and 4 almond commercial varieties were analyzed and successfully amplified, proving the capability of amplification in

any almond variety (Table 1). Also, it should be stressed that, because pollination is not controlled, the seeds from trees of a defined cultivar can in fact contain DNA from different pollinators. Nevertheless, we would like to point out that in the case of the seeds we analyzed single kernels, what minimizes the complexity of the sample to just one possible DNA pollinator per kernel. The 18S rRNA eukaryotic system amplified a 77 bp fragment from all samples tested. The Cps obtained from the analysis of the “individual kernels” from 18 almond varieties oscillated between 17 and 18 (17.53 ± 0.33). Thus, the target DNA copy number is similar in all varieties analyzed despite their origin. This result differs from that described by Rogers et al. (1987) in *Vicia faba*, who reported up to a 95-fold difference of copy numbers within the ribosomal RNA genes of different individuals of this species.

Two binary mixtures of raw and heat treated (160 °C for 13 min) Marcona almond in wheat flour, containing increasing amounts of the target almond, were used to construct a calibration curve using a simple regression model with the log input DNA concentration versus the Cp. Mean values and standard deviation of all the Cp values are plotted in Fig. 2.

As can be observed in Fig. 2, the resulting slope of the linear equation is -3.53 for raw and heat treated almond/wheat *ITS1* almond-specific system. Apart from the demand for specificity, real-time PCR methods intended for species detection in commercial food products should be aimed at reaching a good sensitivity level even when submitted to high temperature treatments (Van Raamsdonk et al., 2007). Prior to consumption, almonds usually undergo heat treatments like blanching or roasting. In this way, real-time PCR results indicate effective amplification of the desired DNA segments in all raw and heat-treated mixtures, confirming the ability of the PCR to amplify relatively short segments.

The mean Cp values and standard deviation obtained from almond calibration curve, plotted against the logarithm of the DNA concentrations, were used to test the sensitivity of the real-time PCR method. Fig. 2 also shows the discriminating capacity, which is the least difference in logarithm of target DNA concentration in the sample that the analytical method can discriminate with a significant level. Linearity of the almond real-time PCR response was also analyzed. In this PCR system, the following parameters were evaluated: (a) Cochran's test, which determined whether the variances of the responses obtained for each concentration of almond DNA in the reference samples were homogeneous, (b) regression analysis and (c) variance analysis with lack of-fit. All parameters were evaluated following previously described validation protocols.

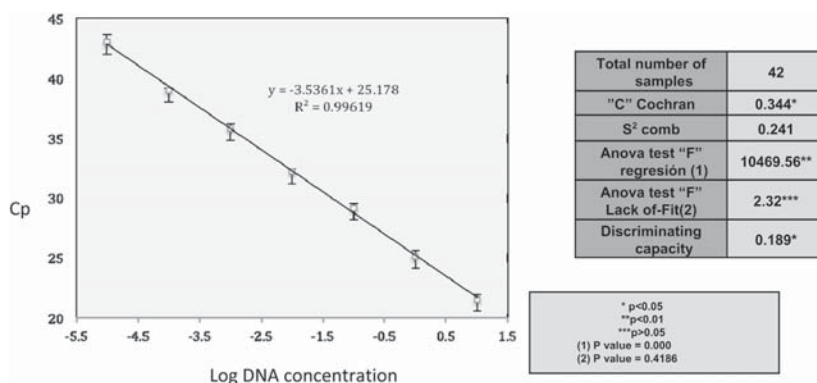


Fig. 2. Linearity test, regression line, sensitivity parameters and standard deviation of the almond-specific TaqMan system on the *ITS1* region, using three different DNA extractions of seven different almond concentrations (100,000, 10,000, 1000, 100, 10, 1, 0.1 mg/kg) for both binary mixtures of raw and heat treated almond/wheat flour.

Table 4
Results of the almond real time PCR analysis of 214 commercial products.

| | Number of samples analyzed | <i>ITS</i> A.S.S. (Cp) | 18S rRNA (Cp) |
|---|----------------------------|------------------------|---------------|
| Commercial food products that declared almond in the labeling (28) | | | |
| Chocolate | 3 | + | + |
| Bonbon | 3 | + | + |
| Biscuits | 4 | + | + |
| Nut bar | 6 | + | + |
| Cereal | 8 | + | + |
| Yogurt | 1 | + | + |
| Ice cream | 1 | + | + |
| Nougat | 1 | + | + |
| Beverage | 1 | + | + |
| Commercial food products that declared traces of nuts (63) | | | |
| Chocolate | 17 | +(10)/-(7) | + |
| Bonbon | 18 | +(1)/-(17) | + |
| Rice/corn cake | 2 | -(2) | + |
| Biscuits | 11 | +(7)/-(4) | + |
| Nut bar | 6 | +(3)/-(3) | + |
| Cereal | 1 | -(1) | + |
| Ice cream | 2 | +(1)/-(1) | + |
| Bread | 5 | +(4)/-(1) | + |
| Precooked meal | 1 | -(1) | + |
| Commercial food products that not declared almond nor traces in the labeling (123) | | | |
| Chocolate | 19 | +(9)/-(10) | + |
| Bonbon | 14 | +(4)/-(10) | + |
| Biscuits | 19 | +(8)/-(11) | + |
| Nut bar | 9 | +(4)/-(5) | + |
| Cereal | 4 | +(2)/-(2) | + |
| Ice cream | 10 | +(4)/-(6) | + |
| Bread | 9 | +(3)/-(6) | + |
| Chocolate cream | 3 | +(1)/-(2) | + |
| Peanut cream | 1 | -(1) | + |
| Cashew cream | 1 | -(1) | + |
| Beverage | 17 | +(9)/-(8) | + |
| Sauce | 1 | -(1) | + |
| Precooked meal | 1 | +(1) | + |
| Meat products | 11 | +(3)/-(8) | + |
| Rice cake | 2 | -(2) | + |
| Yogurt | 2 | +(2) | + |

(+) Plus sign indicates positive signal before 50 PCR cycles.

(-) Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles.

In order to determine the accuracy of the *ITS1* almond-specific system seven concentrations (0.1, 1, 10, 100, 1000, 10,000 and 100,000 mg/kg) of reference samples were elaborated and analyzed. Accuracy is reported as percentage recovery by the assay of known added amounts of analyte. *ITS1* primers were able to detect up to 0.1 mg/kg. Using the Snedecor F-test, it was verified

that the concentration of DNA present in a sample did not affect the variation of the results. The values for Student's *t*-test obtained demonstrated that the method was accurate, since no significant differences between 100% and the mean recovery values were detected. The influence of day of analysis on the precision of the assay was also tested by comparing the coefficients of variation (CV) of three separate DNA extractions performed on the 0.1 mg/kg, three times on the same day, versus the values obtained for the same samples on three different days. Results showed no significant differences.

3.1.3. Commercial food products analysis

The method was also tested with regard to its suitability for the detection of almond DNA in commercial food products. In this way, the *ITS* almond-specific system was applied to the analysis of a collection of 214 commercial food products of different brands with different label declaration: 28 containing almond as an ingredient, 63 may contain traces of nuts and 123 did not declare the presence of almonds. PCR results were found to conform to the labeling in all samples except for 50 food samples with undeclared almonds in the labeling (Table 4). To assess the quantification ability of the assay, extrapolation analysis of the Cp data obtained for different commercial products (chocolates, bonbon, biscuits, cereal, nut bars, ice cream, chocolate cream, yogurt, beverage, bread, precooked meal, nougat and rice cake) was carried out using the linear regression equation of the reference curve in order to determine whether the detected almond content (%) of each sample fitted with the declared one. Table 5 shows the average Cp values and the content estimated in mg/kg for commercial samples with a declared almond percentage, and those samples that didn't indicate the presence of almonds or traces on the labeling but were found to contain almond traces. The almond estimation content obtained by substitution of the Cps in the corresponding A.S.S. equation for those commercial food samples with declared almond content, resulted to be lower than the percentage indicated in the labeling. This underestimation of the amount of allergen could be due to a great number of factors which affect DNA yield, such as the extent of DNA degradation due to processing treatments and the presence of different food matrices potentially containing different amounts of DNA (milk, fat, seeds, etc.) which might interfere with the PCR reaction. As a consequence, quantitative estimation of target allergen content in a food product would be only reliable if samples with identical composition and processing treatment are used for the preparation of calibration standards. Nevertheless, considering the great variety of ingredients used in the preparation of commercial food products (chocolate, lecithin, oil, milk, butter, vegetables, etc.) as well as the diversity of processing treatments applied by the food industry, the preparation of calibration standards for each type of product is not feasible from a practical point of view. Therefore, although in theory real-time PCR techniques have the potential for quantitative measurements, the reality is that their application for the analysis of real commercial food products would be limited to a qualitative detection of the target "tree nut". Regardless to this fact, for allergic sensitized individuals it is difficult to determine the exact amount of allergen (percentage) necessary to trigger symptoms, as this may vary from one person to the other. In this way, to determine the presence of the tree nut in a food product that doesn't declare it on the labeling is what is more relevant.

On the other hand, from the extrapolation of the different Cps obtained for the list of products that didn't indicate the presence of almonds or traces on the labeling, we estimated that 40 of the 50 samples with an undeclared almond content contained less than 10 mg/kg of almond, whereas 7 contained between 10 and 50 and the other three contained more than 50 mg/kg of almond. As

Table 5

Real-time PCR results obtained with the *ITS* almond-specific system and *18S* rRNA positive amplification control in the analysis of commercial food products with a declared almond percentage and those samples that didn't indicate the presence of almonds or traces on the labeling, but were found to contain almond traces.

| Commercial products (percentage of almonds declared on the label) | A.S.S. (Cp) | P.A.C. (Cp) | mg/kg (Estimated almond percentage) |
|---|--------------|--------------|-------------------------------------|
| Nut bar-1 (2%) | 25.60 ± 0.01 | 16.01 ± 0.02 | 7600 mg/kg (0.76%) |
| Biscuit-1 (4%) | 23.14 ± 0.01 | 16.34 ± 0.02 | 37,701 mg/kg (3.7%) |
| Cereal-1 (3%) | 24.73 ± 0.01 | 14.92 ± 0.01 | 13,000 mg/kg (1.3%) |
| Cereal-2 (1.4%) | 29.12 ± 0.01 | 14.34 ± 0.01 | 800 mg/kg (0.08%) |
| Cereal-3 (2.8%) | 26.87 ± 0.01 | 14.01 ± 0.01 | 3323 mg/kg (0.33%) |
| Beverage-1 (7%) | 25.14 ± 0.02 | 15.02 ± 0.02 | 10,250 mg/kg (1.02%) |
| Commercial products (not declared almond nor traces on the label) | A.S.S. (Cp) | P.A.C. (Cp) | mg/kg |
| Bonbon-1 | 37.28 ± 0.01 | 14.01 ± 0.02 | 3.8 mg/kg |
| Bonbon-2 | 33.12 ± 0.02 | 15.06 ± 0.01 | 56 mg/kg |
| Bonbon-3 | 37.01 ± 0.01 | 15.01 ± 0.02 | 4.5 mg/kg |
| Bonbon-4 | 35.02 ± 0.01 | 14.23 ± 0.01 | 16 mg/kg |
| Chocolate-1 | 41.05 ± 0.01 | 14.45 ± 0.02 | 0.3 mg/kg |
| Chocolate-2 | 40.01 ± 0.02 | 15.08 ± 0.02 | 0.6 mg/kg |
| Chocolate-3 | 39.34 ± 0.02 | 16.78 ± 0.08 | 1 mg/kg |
| Chocolate-4 | 36.12 ± 0.01 | 15.08 ± 0.02 | 8 mg/kg |
| Chocolate-5 | 37.21 ± 0.01 | 15.88 ± 0.02 | 3.9 mg/kg |
| Chocolate-6 | 38.01 ± 0.01 | 15.02 ± 0.08 | 2.3 mg/kg |
| Chocolate-7 | 37.83 ± 0.01 | 14.34 ± 0.08 | 2.6 mg/kg |
| Chocolate-8 | 38.01 ± 0.01 | 15.12 ± 0.08 | 2.3 mg/kg |
| Chocolate-9 | 37.34 ± 0.01 | 14.89 ± 0.02 | 4 mg/kg |
| Chocolate Cream-1 | 33.41 ± 0.02 | 14.26 ± 0.01 | 46.3 mg/kg |
| Ice cream-1 | 39.23 ± 0.01 | 14.26 ± 0.01 | 1 mg/kg |
| Ice cream-2 | 40.12 ± 0.01 | 16.23 ± 0.01 | 0.6 mg/kg |
| Ice cream-3 | 40.01 ± 0.01 | 14.78 ± 0.01 | 0.6 mg/kg |
| Ice cream-4 | 39.71 ± 0.01 | 14.87 ± 0.01 | 0.7 mg/kg |
| Yogurt-1 | 36.34 ± 0.01 | 14.92 ± 0.01 | 6.9 mg/kg |
| Yogurt-2 | 37.12 ± 0.01 | 14.34 ± 0.02 | 4.1 mg/kg |
| Nut bar-1 | 39.81 ± 0.01 | 14.12 ± 0.01 | 0.7 mg/kg |
| Nut bar-2 | 40.32 ± 0.01 | 14.98 ± 0.05 | 0.5 mg/kg |
| Nut bar-3 | 38.03 ± 0.01 | 14.12 ± 0.01 | 2.3 mg/kg |
| Nut bar-4 | 38.51 ± 0.01 | 16.01 ± 0.01 | 1.7 mg/kg |
| Biscuit-1 | 36.12 ± 0.01 | 14.01 ± 0.01 | 8 mg/kg |
| Biscuit-2 | 38.23 ± 0.02 | 15.83 ± 0.02 | 2 mg/kg |
| Biscuit-3 | 37.87 ± 0.01 | 16.78 ± 0.08 | 2.5 mg/kg |
| Biscuit-4 | 35.49 ± 0.03 | 14.23 ± 0.01 | 12 mg/kg |
| Biscuit-5 | 37.12 ± 0.03 | 14.23 ± 0.01 | 4 mg/kg |
| Biscuit-6 | 38.65 ± 0.01 | 15.01 ± 0.02 | 1.5 mg/kg |
| Biscuit-7 | 36.63 ± 0.01 | 13.71 ± 0.02 | 5.7 mg/kg |
| Biscuit-8 | 35.14 ± 0.01 | 16.56 ± 0.01 | 15.3 mg/kg |
| Cereal-1 | 36.66 ± 0.01 | 15.11 ± 0.04 | 5.6 mg/kg |
| Cereal-2 | 36.02 ± 0.01 | 14.87 ± 0.03 | 8 mg/kg |
| Bread-1 | 39.12 ± 0.01 | 16.01 ± 0.03 | 1.1 mg/kg |
| Bread-2 | 33.02 ± 0.01 | 13.34 ± 0.03 | 60 mg/kg |
| Bread-3 | 33.87 ± 0.01 | 14.12 ± 0.01 | >100 mg/kg |
| Beverage-1 | 38.13 ± 0.01 | 14.45 ± 0.02 | 2.1 mg/kg |
| Beverage-2 | 34.82 ± 0.01 | 16.23 ± 0.08 | 18.5 mg/kg |
| Beverage-2a | 35.12 ± 0.01 | 16.23 ± 0.08 | 15.3 mg/kg |
| Beverage-3 | 36.67 ± 0.01 | 14.56 ± 0.03 | 5.5 mg/kg |
| Beverage-4 | 38.01 ± 0.01 | 13.93 ± 0.01 | 2.3 mg/kg |
| Beverage-4a | 37.71 ± 0.01 | 13.78 ± 0.01 | 2.8 mg/kg |
| Beverage-5 | 37.01 ± 0.01 | 15.21 ± 0.01 | 4.5 mg/kg |
| Beverage-5a | 38.22 ± 0.02 | 16.21 ± 0.01 | 2 mg/kg |
| Beverage-6 | 36.32 ± 0.06 | 16.23 ± 0.08 | 7 mg/kg |
| Meat Product-1 | 38.91 ± 0.01 | 16.67 ± 0.02 | 1.3 mg/kg |
| Meat Product-2 | 37.01 ± 0.01 | 15.56 ± 0.02 | 4.5 mg/kg |
| Meat Product-3 | 38.01 ± 0.01 | 14.21 ± 0.02 | 2.3 mg/kg |
| Precooked meal-1 | 35.01 ± 0.01 | 13.78 ± 0.02 | 16.4 mg/kg |

A.S.S.: Almond-specific system on the *Internal Transcribed Spacer*.

P.A.C.: Positive amplification control for the almond system on the *18S* rRNA gene.

mentioned before this calculated almond concentration given is a mere orientation of the tree nut content. However, what really matters to individuals who are susceptible of allergic reactions is to determine the presence of allergens in commercial food products

that don't declare it. For these commercial food products that gave positive for the presence of almond, contamination probably occurred during the production, since they were produced by companies that also process almonds.

The degree of contamination of commercial food samples with almonds, whether fraudulent or accidental, can cause a serious public health problem in sensitive individuals and, therefore, detection methods should provide a selective and sensitive detection level. One of the achievements of the assay described in this work is the ability to specifically detect down to 0.1 mg/kg of the target in food samples, which is one of the lowest detection limits achieved to the moment.

Methods for analysis of the almond content in food are necessary to support legislation. Several immunoassay based methods are available for the detection of almonds in food (Acosta, Rouy, Teuber, & Sathe, 1999; Hlywka, Hefle, & Taylor, 2000). Roux et al. (2001) reported the development of a competitive ELISA for the detection of the major allergen of almond, amandin with an LOD of 5–37 mg/kg in several spiked foods presenting minor cross-reactivity with other nuts and legumes. Rejeb et al. (2005) developed a competitive indirect ELISA, which allowed the simultaneous determination of almond, peanut, hazelnut, Brazil nut, and cashew nut with an LOD of 1 mg/kg of target protein in chocolate samples. On the other hand, Garber and Perry (2010) compared three commercial sandwich ELISA test kits for the detection of hazelnuts and almonds. The determined LOD and dynamic ranges for almonds spiked into cooked oatmeal, dipping chocolate, and muffins (baked) varied from 3 to 39 mg/kg, depending on the food matrix and the tested ELISA kit (Garber & Perry, 2010). These immunochemical methods although highly sensitive, may suffer of cross-reactivity with other tree nuts.

In this way, alternative methods based on the polymerase chain reaction (PCR) have been developed for the specific identification of almond such as Pafundo et al. (2009) who developed two systems for the detection of almond allergens using SYBR Green real-time PCR. The development of the two systems allowed the detection of almond in biscuits containing processed almond down to 1 mg/kg. In another work, the same authors reported the development of a multiple-target assay based on SYBR Green real-time multiplex PCR to detect sesame, peanut, cashew nut, hazelnut, walnut, and almond (Pafundo, Gulli, & Marmiroli, 2010). This method enabled the detection of low quantities of almond DNA (5 pg), with LOD ranging from 1 to 100 mg/kg of almond in spiked biscuits (Pafundo et al., 2010). On the other hand, Koppel et al. (2010) presented two tetraplex real-time PCR systems for the detection of eight allergens in foods based on the application of TaqMan probes. The assays exhibited good specificity and sensitivity in the range of 100 mg/kg of target ingredient in rice cookies. Concerning the specific detection of almond, an LOD of 10 mg/kg was obtained for almond spiked in rice cookies. Röder et al. (2011) also developed a method based on real-time PCR system with a TaqMan probe to detect almond allergen Pru du 3 down to an LOD of 5 mg/kg of almond in a variety of food matrices, while Costa et al. (2012b) reported the detection of the gene encoding for Pru du 5 allergen with a relative LOD of 50 mg/kg of almond and an absolute LOD of 10 pg of almond DNA. These same authors describe a single-tube nested real-time PCR to detect almond allergen Pru du 6 with the same LOD of 50 mg/kg and an absolute LOD of 1.28 pg (Costa, Oliveira, & Mafra, 2013).

This observation suggests that the real-time PCR method proposed herein is beneficial because, due to its high sensitivity, it facilitates the detection of almond traces in commercial food products. In all, these results demonstrate that labeling may not always be reliable for almond allergic individuals. Moreover, this real-time PCR could be applicable for routine screening purposes in product quality control, in order to avoid the unintentional

presence of almonds in food products and therefore preventing the food allergic consumer from unintentional ingestion of hidden allergens.

4. Conclusions

The ITS almond specific system was applied to the analysis of a collection of 214 commercial food products, and PCR results conformed to the labeling in all but 50 samples, which contained undeclared almonds. This demonstrates the potential of the real-time PCR-based method to detect the presence of almond in commercial products. As demonstrated, the presented PCR method is highly sensitive and selective, which makes it suitable for the detection of small amounts of almonds in food samples. The method is relatively straightforward, it can be easily implemented in any analytical laboratory routinely performing real-time PCR. Consequently, this methodology could be used in inspection programs to enforce accurate labeling of commercial food products, thereby protecting both producers and consumers against hidden allergens.

Acknowledgments

This work was supported by the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR/1489 of the Comunidad de Madrid (Spain) and by a project (AGL2010/15279) from the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain). Inés María López-Calleja Díaz is recipient of a Juan de la Cierva grant from the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain). Silvia de la Cruz Ares and Nicolette Pegels are both recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). We would like to thank Dr. Ignasi Batlle from the IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria, Tarragona, Spain) and Dr. Federico Dicenta from the CEBAS-CSIC (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Murcia, Spain) for kindly providing us with different almond cultivars.

References

- Acosta, M. R., Rouy, K. H., Teuber, S. S., & Sathe, S. K. (1999). Production and characterization of rabbit polyclonal antibodies to almond (*Prunus dulcis* L.) major storage protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4053–4059.
- Alasalvar, C., & Shahidi, F. (2008). Tree nuts: composition, phytochemicals, and health effects: an overview. In tree nuts: composition, phytochemicals, and health effects. *Nutraceutical Science and Technology*, 1–6.
- Baumgartner, S., Krška, R., & Welzig, E. (2007). Detecting allergens in foods. In *Managing allergens in food* (pp. 228–250). CRC Press.
- Camacho, M. A., Torres, A. I., Gil-Alegre, M. E., Obregón, M. M., & Ruz, V. (1993). Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pratiques*, 3, 197–202.
- Chen, C. Y., Lapsley, K., & Blumberg, J. (2006). A nutrition and health perspective on almonds. *Journal of Science and Food Agricultural*, 86, 2245–2250.
- Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I., & Oliveira, M. B. P. P. (2012a). Almond allergens: molecular characterization, detection, and clinical relevance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1337–1349.
- Costa, J., Mafra, I., & Oliveira, M. B. P. P. (2012b). High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. *Food Chemistry*, 133, 1062–1069.
- Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2013). Novel approach based on single-tube nested real-time PCR to detect almond allergens in foods. *Food Research International*, 51, 228–235.
- Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., et al. (2009). A LightCycler TaqMan PCR assay for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and Pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in experimental meat mixtures. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1997–2004.
- FAOSTAT. (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Accessed in March 2010.
- Fernández, A., García, T., Asensio, L., Rodríguez, M. A., Gonzalez, I., Hernandez, P. E., et al. (2001). PCR RFLP analysis of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region for identification of 3 clam species. *Journal of Food Science*, 66, 657–661.
- Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004. (Aug 2, 2004). *Public law 108–282* (pp. 905–911), 118 STAT.
- Garber, E., & Perry, J. (2010). Detection of hazelnuts and almonds using commercial ELISA test kits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 1939–1945.

- Hlywka, J., Hefle, S. L., & Taylor, S. L. (2000). A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of almonds in foods. *Journal of Food Protection*, 63, 252–257.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2005). *Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1)*. Available at <http://drugtiger.com/d/gdoc/media417.pdf>.
- Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., Marchie, A., Josse, A. R., Nguyen, T. H., Faulkner, D. A., et al. (2008). Almonds reduce biomarkers of lipid peroxidation in older hyperlipidemic subjects. *Journal of Nutrition*, 138, 908–913.
- Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., Marchie, A., Parker, T. L., Connelly, P. W., Qian, W., et al. (2002). Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors: blood lipids, oxidized low-density lipoproteins, lipoprotein (a), homocysteine, and pulmonary nitric oxide: a randomized, controlled, crossover trial. *Circulation*, 106, 1327–1332.
- Koppel, R., Dvorak, V., Zimmerli, F., Breitenmoser, A., Eugster, A., & Waiblinger, H. U. (2010). Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *European Food Research and Technology*, 230, 367–374.
- López-Calleja, I., De la Cruz, S., Pegels, N., González, I., García, T., & Martín, R. (2013). Development of a real time PCR assay for detection of allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. *Food Control*, 30, 480–490.
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2007). Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control*, 18, 1466–1473.
- Mandalari, G., Nueno-Palop, C., Bisignano, G., Wickham, M. S. J., & Narbad, A. (2008). Potential prebiotic properties of almond (*Amygdalus communis* L.) seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4264–4270.
- Official Journal of the European Union, 2011. Regulation (EU) 1169/2011/EC of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004, L304, 18–43.
- Pafundo, S., Gullì, M., & Marmiroli, N. (2009). SYBR® GreenER real-time PCR to detect almond in traces in processed food. *Food Chemistry*, 116, 811–815.
- Pafundo, S., Gullì, M., & Marmiroli, N. (2010). Multiplex real-time PCR using SYBR® GreenER for the detection of DNA allergens in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 1831–1839.
- Pegels, N., González, I., Fernández, S., García, T., & Martín, R. (2012). Sensitive detection of porcine DNA in processed animal proteins using TaqMan real-time PCR assay. *Food Additives and Contaminants Part A*, 29, 1402–1412.
- Pegels, N., González, I., García, T., & Martín, R. (2011). Detection of banned ruminant-derived material in industrial feedstuffs by Taqman real-time PCR assay. *Journal of Food Protection*, 74, 1300–1308.
- Pegels, N., González, I., López-Calleja, I., Fernández, S., García, T., & Martín, R. (2012). Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. *Poultry Science*, 91, 1709–1719.
- Pegels, N., González, I., López-Calleja, I., García, T., & Martín, R. (2013). Detection of fish-derived ingredients in animal feeds by a TaqMan real-time PCR assay. *Food Analytical Methods*, 5, 784–794.
- Pegels, N., González, I., Martín, I., Rojas, M., García, T., & Martín, R. (2011). Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control*, 22, 1189–1196.
- Platteau, C., De Loose, M., De Meulenaer, B., & Taverniers, I. (2011). Detection of allergenic ingredients using real-time PCR: a case study on hazelnut (*Corylus avellana*) and soy (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10803–10814.
- Regulations Amending the Food and Drug Regulations (1220-Enhanced for Food Allergen and Gluten Sources and Added Sulphites) (2011). SOR/2011-28, February 4, Canada Gazette Part II, 145(4), 324–330.
- Rejeb, S. B., Abbott, M., Davies, D., Cleroux, C., & Delahaut, P. (2005). Multi-allergen screening immunoassay for the detection of protein markers of peanut and four tree nuts in chocolate. *Food Additives and Contaminants*, 22, 709–715.
- Röder, M., Vieths, S., & Holzhauser, T. (2011). Sensitive and specific detection of potentially allergenic almond (*Prunus dulcis*) in complex food matrices by Taqman® real-time polymerase chain reaction in comparison to commercially available protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytica Chimica Acta*, 685, 74–83.
- Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1987). Heritability and variability in ribosomal RNA genes in *Vicia faba*. *Genetics*, 117, 285–295.
- Roux, K. H., Teuber, S. S., Robotham, J. M., & Sathe, S. K. (2001). Detection and stability of the major almond allergen in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2131–2136.
- Sampson, H. A. (2004). Update of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, 805–819.
- Sampson, H. A. (2005). Food allergy: accurately identifying clinical reactivity. *Allergy*, 60, 19–24.
- Sampson, H., Mendelson, L., & Rosen, J. (1992). Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *The New England Journal of Medicine*, 327, 380–384.
- Scaravelli, E., Brohee, M., Marchelli, R., & Van Hengel, A. (2008). Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products. *European Food Research and Technology*, 227, 857–869.
- Sicherer, S. H., Muñoz-Furlong, A., Godbold, J. H., & Sampson, H. A. (2010). US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 1322–1326.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2006). Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, S470–S475.
- USDA. (2009). *Fruit and tree nuts outlook yearbook*. <http://www.ers.usda.gov/publications/FTS/index.htm#yearbook> Accessed in May 2010.
- Van Raamsdonk, L. W. D., von Holst, C., Baeten, V., Berben, G., Boix, A., & de Jong, J. (2007). New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 133, 63–83.
- Yunginger, J., Sweeney, K., Sturner, W., Giannandrea, L., Teigland, J., Bray, M., et al. (1988). Fatal food-induced anaphylaxis. *Journal of the American Medical Association*, 260, 1450–1452.

CAPÍTULO 5

SELECCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE *PHAGE DISPLAY* Y SU APLICACIÓN EN LA DETECCIÓN DE NUEZ DE BRASIL (*Bertholletia excelsa*) EN ALIMENTOS

CHAPTER 5

*SELECTION OF RECOMBINANT ANTIBODIES BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY AND APPLICATION FOR DETECTION OF ALLERGENIC BRAZIL NUT (*Bertholletia excelsa*) IN PROCESSED FOODS*

Journal of Agricultural and Food Chemistry 61 (2013) 10310-10319

Selection of Recombinant Antibodies by Phage Display Technology and Application for Detection of Allergenic Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) in Processed Foods

Silvia de la Cruz,[†] Inés María López-Calleja,[†] Marcos Alcocer,[‡] Isabel González,[†] Rosario Martín,[†] and Teresa García^{*,†}

[†]Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid 28040 Madrid, Spain

[‡]Department of Nutritional Sciences School of Biosciences, University of Nottingham Sutton Bonington Campus, Loughborough LE12 5RD, U.K.

ABSTRACT: Current immunological methods for detection of Brazil nut allergens in foods are based on polyclonal antibodies raised in animals. Phage display technology allows the procurement of high-affinity antibodies avoiding animal immunization steps and therefore attaining the principle of replacement supported by animal welfare guidelines. In this study, we screened Tomlinson I and J libraries for specific binders against Brazil nut by employing a Brazil nut protein extract and a purified Brazil nut 2S globulin, and we successfully isolated a phage single chain variable fragment (named BE95) that specifically recognizes Brazil nut proteins. The selected phage scFv was further used as affinity probe to develop an indirect phage-ELISA for detection of Brazil nut in experimental binary mixtures and in commercial food products, with a limit of detection of 5 mg g⁻¹. This study describes for the first time the isolation of recombinant antibody fragments specific for an allergenic tree nut protein from a naïve library and paves the way to develop new immunoassays for food analysis based on probes that can be produced in vitro when required and do not rely on animal immunization.

KEYWORDS: Brazil nut, *Bertholletia excelsa*, phage display, scFv, ELISA

INTRODUCTION

Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*, family Lecythidaceae) are a valuable source of selenium.¹ Their 2S albumin protein fraction (named Ber e 1) is unusually rich in sulfur amino acids and comprises around 30% of the total protein.² For these reasons, Brazil nuts are regarded as a value added ingredient and therefore used in the preparation of different foods, including breakfast cereals, baked goods, and confectionery. Nevertheless, Ber e 1 is also the major allergen of Brazil nut, responsible for triggering allergic reactions in sensitized individuals,³ making Brazil nut, which also includes the allergen Ber e 2, one of the best characterized allergenic foods.^{4,5}

Thus far no effective treatment for food allergy is described, so strict avoidance of Brazil nut in the diet is the only possible measure to prevent life-threatening reactions in sensitized individuals.⁶ Nonetheless, accidental exposure to products containing Brazil nut might happen because of mislabeling of packaged foods, cross-contamination due to the use of shared processing equipment, or the presence of undeclared Brazil nut in ingredients.⁷ Since adequate information concerning substances causing allergies is crucial for consumer protection, several countries enforce labeling requirements for allergenic food ingredients.^{8–11} Enforcement of regulations regarding allergen labeling depends on the availability of appropriate analytical methods. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an accessible technique that allows sensitive and specific detection of protein residues in foods. Several ELISA assays for the detection of Brazil nut in foodstuffs have been developed over the past few years.^{12–15} Although performed in

different assay formats, all of them have in common the use of polyclonal antibodies, either raised in rabbits or produced in egg yolk.

With increased international awareness of welfare issues regarding animal use for scientific purposes, new regulatory policies have encouraged replacement and reduction of the use of animals in procedures and promotion of alternative approaches as soon as it is scientifically possible to do so.¹⁶

Recombinant DNA methods using phage display technology provide an alternative way of producing antibodies with desirable characteristics in large amounts and with little or no variability between batches. This approach has the potential to reduce the cost and effort of the traditional methods associated with polyclonal and monoclonal antibody production, while avoiding the use of live animals.^{17–19}

Phage display is the technology for exposing exogenous peptides on the surface of a bacteriophage that contains the gene encoding the displayed protein, thereby physically linking the genotype and the phenotype. Phage-displayed single chain variable fragment (scFv) libraries are combinatorial libraries that consist of a wide diversity of variable heavy (VH) and variable light (Vk) domains of an antibody, connected by a flexible glycine-serine linker. The antibody fragment is fused to the phage minor coat protein pIII, encoded by gene III, and

Received: July 29, 2013

Revised: October 3, 2013

Accepted: October 4, 2013

Published: October 4, 2013

displayed externally as a scFv.^{20,21} In the recent years, scFv antibodies against toxins like *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1C and Cry1B^{22,23} and palytoxin²⁴ have been isolated and characterized, but so far scFv antibodies have not been used for detection and identification of food allergens.

Here, we report the isolation of recombinant antibodies against Brazil nut from the naïve human scFv libraries Tomlinson I + J, by an iterative affinity selection procedure instead of animal immunization. We also describe an indirect phage-ELISA that allows the rapid, easy, and economical detection of Brazil nut in commercial food products by employing the affinity probe developed against a Brazil nut protein extract.

MATERIALS AND METHODS

Materials and Chemicals. The human single-fold scFv libraries I + J (Tomlinson I + J), KM13 protease cleavable helper phage, and *Escherichia coli* TG1 strain (K12 Δ (*lac-proAB*) *supE thi hsdD5/F' traD36 proA⁺B lac^I lacZ Δ M15*) were obtained from Source BioScience (Nottingham, UK). Both libraries are based on a single human framework for VH (V3-23/DP-47 and JH4b) and Vk (O12/O2/DPK9 and Jk1) with side chain diversity incorporated at positions in the antigen binding site that make contacts to antigen in known structures and are highly diverse in the mature repertoire. The size of the Tomlinson I library is 1.47×10^8 , and the size of the Tomlinson J library is 1.37×10^8 . The scFv is displayed as a fusion with the terminal phage gene III protein, cloned in the ampicillin resistant phagemid vector pIT2.

Brazil nut kernels and other tree nuts were purchased from local retailers in Madrid, Spain. They were cleaned and shelled separately to avoid cross-species contamination and stored at -20°C until used. Plant and animal species analyzed for specificity purposes (Table 1) were acquired in different local markets in Madrid. Finally, a total of 92 commercial food products were purchased from various retail markets and delicatessen stores (Spain).

Experimental binary mixtures of Brazil nut in a wheat flour matrix (from 100 to 0.1 mg g^{-1}) were prepared to evaluate the test sensitivity. First, 50 g of finely ground Brazil nut were added to 450 g of wheat flour, and the mixture was homogenized at high speed using a food processor (Thermomix, Vorwerk, Germany). Then, 50 g of the former mixture was added to 450 g of wheat flour to obtain a concentration of 10 mg g^{-1} . Remaining concentrations (up to 0.1 mg g^{-1}) were made following the same procedure. Three additional mixtures of 50, 25, and 5 mg g^{-1} of Brazil nut in wheat flour were also prepared by mixing 250 g of wheat flour with 250 of the mixtures containing 100, 50, and 10 mg g^{-1} , respectively.

HRP/anti-M13 monoclonal mouse antibody was purchased from GE Healthcare (München, Germany). Tryptone, yeast extract, and European bacteriological agar were purchased from Pronadisa (Madrid, Spain). Acetone and acetonitrile were purchased to Panreac (Barcelona, Spain). All others reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

The protein extraction solution consisted of 0.035 M phosphate buffer containing 1 M NaCl, pH 7.5.²⁵ 2xTY broth is 16 g L^{-1} tryptone, 10 g L^{-1} yeast extract, and 5 g L^{-1} NaCl. TYE agar is 15 g L^{-1} Bacto Agar, 10 g L^{-1} tryptone, 5 g L^{-1} yeast extract, and 8 g L^{-1} NaCl.

Preparation of Protein Extracts. Food samples were ground to fine flour using a mortar and pestle and stored at -20°C in plastic screw-capped vials until further use. An aliquot of 200 mg was mixed with 1800 μL of extraction solution, by continuous mixing using a vertical rotator (HulaMixer Sample Mixer, Life Technologies, Carlsbad, CA) for 10 min at room temperature (rt) to solubilize proteins. The slurry was centrifuged at 10 000g for 10 min at 4°C , and the supernatant was filtered through a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany). Protein content was determined by the bicinchoninic acid (BCA) assay (Thermo Fisher Scientific Inc.) using bovine serum albumin (BSA) as the standard protein. Aliquots

Table 1. List of Species Showing No Cross-Reactivity with Brazil Nut in the Indirect Phage-ELISA

| Species | | |
|--|--|--|
| Nuts | | |
| almond (<i>Prunus dulcis</i>) | macadamia (<i>Macadamia integrifolia</i>) | pine nut (<i>Pinus pinea</i>) |
| cashew nut (<i>Anacardium occidentale</i>) | peanut (<i>Arachis hypogaea</i>) | pistachio (<i>Pistacia vera</i>) |
| hazelnut (<i>Corylus avellana</i>) | pecan nut (<i>Carya illinoensis</i>) | walnut (<i>Juglans regia</i>) |
| Vegetal Species | | |
| anise (<i>Pimpinella anisum</i>) | lentil (<i>Lens culinaris</i>) | potato (<i>Solanum tuberosum</i>) |
| apple (<i>Malus domestica</i>) | lupine (<i>Lupinus albus</i>) | prune (<i>Prunus domestica</i>) |
| barley (<i>Hordeum vulgare</i>) | maize (<i>Zea mays</i>) | pumpkin seed (<i>Cucurbita maxima</i>) |
| carrot (<i>Daucus carota</i>) | mandarin orange (<i>Citrus reticulata</i>) | rice (<i>Oriza sativa</i>) |
| chickpea (<i>Cicer arietinum</i>) | mung bean (<i>Vigna radiata</i>) | rye (<i>Secale cereale</i>) |
| chufa sedge (<i>Cyperus esculentus</i>) | oats (<i>Avena sativa</i>) | sesame (<i>Sesamum indicum</i>) |
| cinnamon (<i>Cinnamomum verum</i>) | olive (<i>Olea europaea</i>) | soy (<i>Glycine max</i>) |
| cocoa (<i>Theobroma cacao</i>) | onion (<i>Allium cepa</i>) | sunflower (<i>Helianthus annuus</i>) |
| dry bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>) | orange (<i>Citrus sinensis</i>) | tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>) |
| flax (<i>Linum usitatissimum</i>) | paprika (<i>Capsicum annum</i>) | vanilla (<i>Vanilla planifolia</i>) |
| garlic (<i>Allium sativum</i>) | pea (<i>Pisum sativum</i>) | wheat (<i>Triticum aestivum</i>) |
| grape (<i>Vitis vinifera</i>) | pear (<i>Pyrus communis</i>) | zucchini (<i>Cucurbita pepo</i>) |
| kiwifruit (<i>Actinidia deliciosa</i>) | Animal Species | |
| cattle (<i>Bos taurus</i>) | poultry (<i>Gallus gallus domesticus</i>) | swine (<i>Sus scrofa domestica</i>) |
| fish (<i>Salmo salar</i>) | Others | |
| brown sugar | milk | |

were stored at -20°C until needed. The quality of the Brazil nut extract was verified by SDS-PAGE electrophoresis (see below).

Purification of Brazil Nut 2S Albumin (Ber e 1). Defatted Brazil nut flour was prepared as described by Doi et al.²⁶ with some modifications. Briefly, shelled Brazil nuts were ground and defatted by adding acetone (1:10 w/v), vortexing for 1 min, and then centrifuging at 10 000g for 30 min at 4°C . This procedure was repeated three times before Brazil nut flour was left to dry overnight at 25°C . The powder was stored in screw-capped plastic vials at -20°C until further use.

Purification of Ber e 1 was performed according to the method of Sharma et al.²⁵ with several modifications. Two grams of defatted Brazil nut flour was extracted with 20 mL of extraction solution, by continuous mixing for 1 h at 25°C . The slurry was centrifuged at 10 000g for 30 min at 4°C , and the supernatant was filtered through a $0.20\text{ }\mu\text{m}$ syringe filter. Brazil nut extract was subjected to size-exclusion chromatography on a HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR column (GE, Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) equilibrated with extraction solution. The flow rate was maintained at 0.8 mL min^{-1} . The 2S albumin fraction obtained was purified via preparative HPLC (Varian Dynamax $21.4 \times 250\text{ mm}$ Microsorb $5\text{ }\mu\text{m}$ 300 \AA C_8 reverse-phase column) using an Agilent 1200 HPLC system (Agilent Technologies) with a quaternary pump, a column thermostat, an autosampler, and a photodiode-array multiple-wavelength UV detection. The chromatographic conditions for this HPLC system were set as follows: column temperature was maintained at 40°C ,

elution was performed at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, with simultaneous UV detection at 254 and 280 nm. Mobile phase was a gradient prepared from 0.01% formic acid in water (component A) and 0.01% formic acid in acetonitrile (component B). The program used for elution was 0–5 min of 100% A and then a linear gradient from 100% A to 100% B over 100 min. The collected fraction containing Ber e 1 protein was immediately neutralized with ammonium hydroxide and thereafter was dialyzed against Milli-Q water, for 24 h with three water changes (4 L per change), using a dialysis cassette (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 3.5K MWCO, Thermo Scientific, Rockford, IL). The dialysate was lyophilized and stored in glass vials at -20 °C until further use. Soluble protein content was determined using the BCA assay. In order to characterize the purified protein, SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) was carried out. Samples were diluted 1:1 in sample buffer [0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 20% v/v glycerol, 0.5% (w/v) bromophenol blue as the tracking dye, 5% (v/v) β -mercaptoethanol], boiled for 10 min, loaded onto a 4% monomer acrylamide/bis stacking gel, and separated in a 13% monomer acrylamide/bis resolving gel. Electrophoresis was run at a constant voltage (100 V) for 3 h using a Miniprotean TetraCell (Bio-Rad). ColorBurst Electrophoresis Marker (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used as the molecular weight standard. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250, and the band was cut out with a sterile scalpel and immersed in 5% acetic acid solution. Protein sequencing was performed using the 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer mass spectrometer (AB SCIEX), at the Unidad de Proteómica at Parque Científico de Madrid (Madrid, Spain). Ion spectra of the peptides obtained were searched in the MASCOT search engine (<http://www.matrixscience.com>) using the SwissProt database. The following search parameters were used: trypsin enzymatic cleavage, allowing one possible missed cleavage; peptide mass tolerance of 80 ppm; fragment mass tolerance of 0.3 Da; peptides were assumed to be monoisotopic; carbamidomethyl (C) fixed modification; and methionine oxidation variable modification.

Preparation of Phage Libraries for Selection Procedure.

Tomlinson phage libraries I + J were prepared separately for selection procedure as depicted by the MRC protocol (<http://www.lifesciences.com/media/143421/tomlinsonij.pdf>). Briefly, 500 μ L of the library stock was inoculated into 200 mL of 2xTY broth containing 100 μ g mL⁻¹ ampicillin and 1% (w/v) glucose and incubated with shaking at 37 °C until the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) reached 0.4. Then, 2 × 10¹¹ particles of KM13 helper phage were added to 50 mL of the bacterial culture and incubated without shaking in a 37 °C water bath for 30 min. Subsequently, infected cells were centrifuged at 3000g for 10 min at 4 °C; resuspended in 100 mL of 2xTY containing 100 μ g mL⁻¹ ampicillin, 50 μ g mL⁻¹ kanamycin, and 0.1% (w/v) glucose; and incubated with shaking at 30 °C overnight. Phage particles were precipitated with 20 mL of ice-cold 20% polyethylene glycol 6000 in 2.5 M NaCl and pelleted by centrifugation at 3300g for 30 min at 4 °C. After pouring away supernatant, the phage pellet was resuspended in 4 mL of PB, and centrifuged at 11 600g for 10 min to remove bacterial debris. Phages were stored at 4 °C for short-term storage or at -80 °C in 15% glycerol for longer term storage. In order to estimate the titer of phage particles, 10 μ L of the stock solution was employed to produce a 10-fold dilution series from 10² to 10¹² in PBS. Then, 10 μ L of each dilution was added to an Eppendorf tube containing 200 μ L of a TG1 culture at an OD₆₀₀ of 0.4 and incubated at 37 °C for 30 min to allow infection. Finally 10 μ L of each dilution was spotted on a TYE agar plate containing 100 μ g mL⁻¹ ampicillin and 1% (w/v) glucose and incubated overnight at 37 °C.

Target Immobilization. For the first round of selection of scFv clones against Brazil nut, polystyrene paddles (Nunc, Denmark), with a surface area of 5.2 cm², were coated by incubation overnight at 4 °C with 1 mL of Brazil nut extract in PBS (positive screening) or with 1 mL of peanut extract in PBS (negative screening), both with a final concentration of 100 μ g mL⁻¹ of protein. The protein-coated polystyrene paddles were washed three times with PBS and blocked with 3% BSA at 37 °C for 1 h.

For the second round of selection, Dynabeads M-280 Tosylactylated (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) were employed. These magnetic beads bind proteins physically and chemically through primary amino or sulfhydryl groups. Coupling of the antigen was carried out as recommended by the manufacturer's instructions. Briefly, 5 mg of Dynabeads was coupled with 100 μ g of Brazil nut proteins (positive panning) in 0.1 M borate buffer pH 9.5 to a final volume of 150 μ L and then 100 μ L of 3 M ammonium sulfate in borate buffer was added. Coupling was performed on a vertical rotator (HulaMixer) at 37 °C overnight. After overnight coupling, supernatant was removed with the aid of a magnet, and Dynabeads were blocked with 1 mL of 0.5% (w/v) BSA in PBS, at 37 °C for 1 h on a rotator. Subsequently, supernatant was discarded, and the Brazil nut coupled beads were stored in 240 μ L of 0.1% (w/v) BSA in PBS at 4 °C until use. The same procedure was performed with 5 mg of new Dynabeads but employing a peanut protein extract as the ligand (negative panning). Both coating surfaces were used alternately throughout the complete selection procedure. The aim of employing different coating surfaces was to overcome the "target-unrelated phages" problem, which might produce false-positive results²⁷ if selected phages showed affinity for coating surfaces.

For selecting scFv clones against Ber e 1, the procedure was performed as described above, but employing 100 μ g mL⁻¹ of HPLC-purified Ber e 1 for coating polystyrene paddles and 100 μ g of the same protein for coating magnetic beads.

Panning Procedure. 1. *Selection of scFv Clones against Brazil Nut.* Approximately 10¹² phage particles from each library were added to paddles coated with peanut protein extract in 2 mL of 3% (w/v) BSA in PBS and incubated at 25 °C for 60 min on a rotator. After performing the negative panning, supernatants containing phage particles not bound to peanut proteins were added to polystyrene paddles coated with Brazil nut extract and then incubated at 25 °C for 60 min with rotation and a further 60 min without rotation. Unbound phage particles were removed by washing 10 times with PBS, and then, specifically bound phage scFvs were eluted from the paddle by adding 500 μ L of trypsin solution (1 mg mL⁻¹ trypsin in PBS) for 10 min at rt with rotation. Supernatant was collected, and 250 μ L of the eluted phages was transferred to a tube containing 1.75 mL of TG1 cell culture at an OD₆₀₀ of 0.4. After incubating for 30 min at 37 °C in a water bath, infected cells were spread on a TYE agar plate containing 100 μ g mL⁻¹ ampicillin and 1% (w/v) glucose and grown overnight at 37 °C. The titer of eluted phage was also determined. The next day, all colonies of the TYE agar plate were scraped into 2 mL of 2xTY containing 15% glycerol and stored at -80 °C (first round stock). In order to produce new phages for a second round of selection, 50 μ L of the first round stock was inoculated into 50 mL of 2xTY containing 100 μ g mL⁻¹ ampicillin and 1% (w/v) glucose and incubated with shaking at 37 °C until an OD₆₀₀ of 0.4 was reached. Then, 10 mL of the former culture was infected with 5 × 10¹⁰ particles of helper phage. Phage particles were rescued from the culture as described above. Selection was repeated one more time, employing 2.5 mg of Dynabeads instead of paddles, and increasing the washing step to 20 times to remove unspecifically bound phage scFvs.

2. *Selection of scFv Clones against Ber e 1.* The screening rounds were performed as previously described, but the number of selection rounds was increased to four, maintaining the alternation of polystyrene paddles with magnetic beads.

Brazil Nut Indirect Phage-ELISA. The ability of selected phage scFvs to recognize target proteins was assessed by polyclonal phage-ELISA. With that purpose, flat-bottom polystyrene microtiter plates (F96 MaxiSorp Nunc immuno plates, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4 °C with 100 μ L of target solution (25 μ g mL⁻¹ of Brazil nut protein extract or a 100 μ g mL⁻¹ solution of purified Ber e 1), a peanut protein extract (25 μ g mL⁻¹), or a BSA solution (100 μ g mL⁻¹), in PBS. Plates were washed three times (all washing steps were performed with PBS) and blocked to prevent nonspecific binding with 0.1% gelatin in PBS for 1 h at 37 °C. After washing three times, 10 μ L of precipitated phages from each round of selection was added to 100 μ L of 1% ovalbumin in PBS. Plates were incubated for 1 h at rt, washed 10 times prior to adding 100 μ L per well of a 1:5000

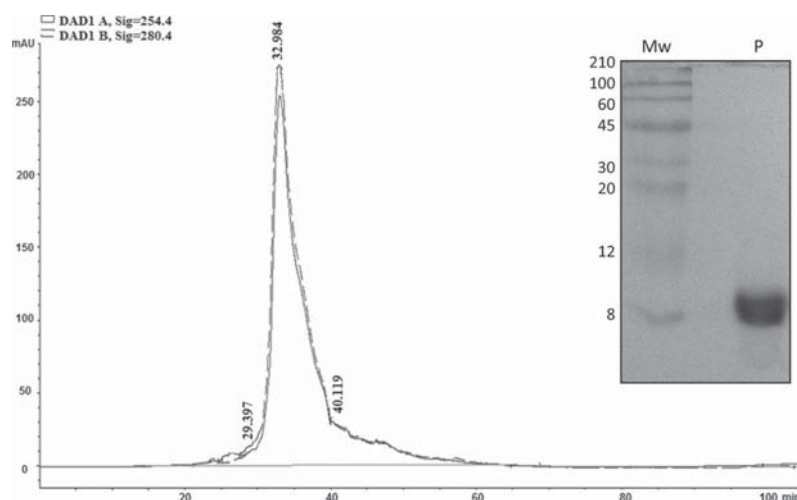


Figure 1. Elution profile of Brazil nut Ber e 1 protein obtained from preparative HPLC column. (Inset) SDS–PAGE electrophoresis (under reducing conditions) analysis of fraction eluted off the column. M_w , protein marker; P, protein eluted off the column. The molecular mass of each standard (kDa) is indicated in the left margin of the inset.

dilution of a HRP/anti-M13 monoclonal mouse antibody, and incubated again at rt for 1 h. Finally, plates were washed five times, and then 100 μ L of tetramethylbenzidine substrate solution was added to each well, and the plates were incubated in the dark. Color development was performed for 10 min at rt and stopped with 50 μ L per well of 1 M sulfuric acid. OD_{450} was measured with an iEMS Reader MF (Labsystems, Helsinki, Finland). All analyses were performed in triplicate.

In order to confirm the antigen recognition ability of single clones, 95 individual colonies from the last rounds of selection were randomly picked from the TYE agar plate with 100 μ g mL^{-1} ampicillin and 1% (w/v) glucose. Bacteria were inoculated into 100 μ L of 2xTY containing 100 μ g mL^{-1} ampicillin and 1% glucose in 96-well plates (Nirco, Barcelona, Spain), and were grown with shaking (250 rpm) overnight at 37 $^{\circ}C$. The next day, 5 μ L from each well was used to infect a second 96-well plate containing 200 μ L 2xTY, with 100 μ g mL^{-1} ampicillin and 1% glucose. Plates were incubated for 2 h more at 37 $^{\circ}C$ before rescuing phages by adding 10^9 particles of helper phage to each well. After incubation for 1 h at 37 $^{\circ}C$, the plates were centrifuged at 1800g for 10 min at 4 $^{\circ}C$. Supernatant was discarded, and pellets were resuspended in 200 μ L of 2xTY containing 100 μ g mL^{-1} ampicillin, 50 μ g mL^{-1} kanamycin, and 0.1% glucose and incubated overnight at 30 $^{\circ}C$. The following day, after spinning the plate at 1800g for 10 min, 50 μ L of the supernatant was employed in monoclonal phage ELISA.

Multiwell plates were coated overnight with 25 μ g mL^{-1} of Brazil nut protein extract (positive control) or with 25 μ g mL^{-1} of peanut protein extract (negative control). The ELISA technique was performed as described above, but using 50 μ L of phage supernatant from the overnight culture, diluted in 100 μ L of 1% ovalbumin, instead of using precipitated phages.

Sequence Analysis. Phagemid DNA from positive clones was amplified by PCR using GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI). Polymerase chain reaction (PCR) of colonies (95 $^{\circ}C$ for 9 min and then 95 $^{\circ}C$ for 30 s, 62 $^{\circ}C$ for 30 s, and 72 $^{\circ}C$ for 30 s for 30 cycles and the final extension at 72 $^{\circ}C$ for 7 min) was carried out to check individual clones for the presence of full length VH and V κ inserts. Primers used were LMB3 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') and pHEN seq (5'-CTA TGC GGC CCC ATT CA-3') for the whole scFv fragment. LMB3 and link seq new (5'-CGA CCC GCC ACC GCC GCT G-3') were used to amplify just the VH fragment, and DPK9 FRI seq (5'-CAT CTG TAG GAG ACA GAG TC-3') and pHEN seq were used to amplify only the V κ fragment. PCR products were examined by electrophoresis on 2% agarose gel. Phagemid DNA from positive clones was purified with a High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and sequenced at

Sistemas Genómicos (Valencia, Spain), using primers LMB3 and pHEN seq. The sequenced clones were compared using the European Molecular Biology Open Software Suite (Emboss software) and then analyzed with IgBLAST to determine framework and complementary determining regions (CDR) of the VH and V κ chains. Amino acid sequences were deduced from the nucleotide sequences by the Expasy Web site (www.expasy.org).

Assay Validation. Specificity of the Brazil nut indirect phage-ELISA was assessed by challenging protein extracts obtained from nine nuts and also from several plant and animal species (Table 1). Extracts were obtained according to the protein extraction protocol and diluted at 1:200 in PBS to be used in the ELISA assay. Each sample was analyzed in triplicate.

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated according to the guidelines of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).²⁸ The LOD for the ELISA was calculated by considering the minimum concentration of the target protein that is larger than the mean absorbance value of the blank (wells with PBS) plus 3 times the standard deviation (SD) after 20 experiments, whereas LOQ was determined considering the mean absorbance value of the blank plus 10 times the SD. Additionally, the LOD and LOQ for binary mixtures of a wheat flour matrix spiked with decreasing concentrations of raw Brazil nut were determined in a similar fashion, but using wells coated with wheat flour extract as blank.

Brazil nut protein extract was tested in the concentration range from 0 to 25 μ g mL^{-1} . The concentration–response curve was obtained by plotting the absorbance values vs the analyte concentration, and the standard curve obtained for Brazil nut dilution was fitted to the four-parameter logistic equation using Origin 8.0 software (OriginLab Corp.)

$$y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$$

where A is the maximum absorbance at infinite concentration, B is the curve slope at the inflection point, C is the x value at the inflection point, and D is the minimum absorbance for no analyte (background signal). Data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA and the Fisher's least significant difference (LSD) test ($p < 0.05$) using Statgraphics Centurion 15.2.14 (XV) (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA).

The effect of heat treatment on the technique's ability to identify Brazil nut protein was assessed through the analysis of protein extracts from roasted Brazil nuts. With that purpose, 70 g of ground Brazil nut were processed in an oven at 160 $^{\circ}C$ for 13 min. Standard curve was obtained as for raw Brazil nut extract described above.

Table 2. Peptides Identified by MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometry and Mascot Database Search

| protein identification | accession no. | total score | ion scores ^a | peptide sequences |
|---------------------------------------|---------------|-------------|-------------------------|------------------------------------|
| 2S sulfur-rich seed storage protein 2 | AB044391 | 122 | 48 | R.KAENLLSR.C |
| | | | 74 | R.QREEMELQGEQMQR.I |
| | | | 23 | R.QREEMELQGEQMQR.I + oxidation (M) |
| 2S sulfur-rich seed storage protein 1 | X54491.1 | 109 | 41 | R.LAENIPSR.C |
| | | | 69 | R.MQQEEMQPR.G |

^aIndividual ion scores bigger than 40 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

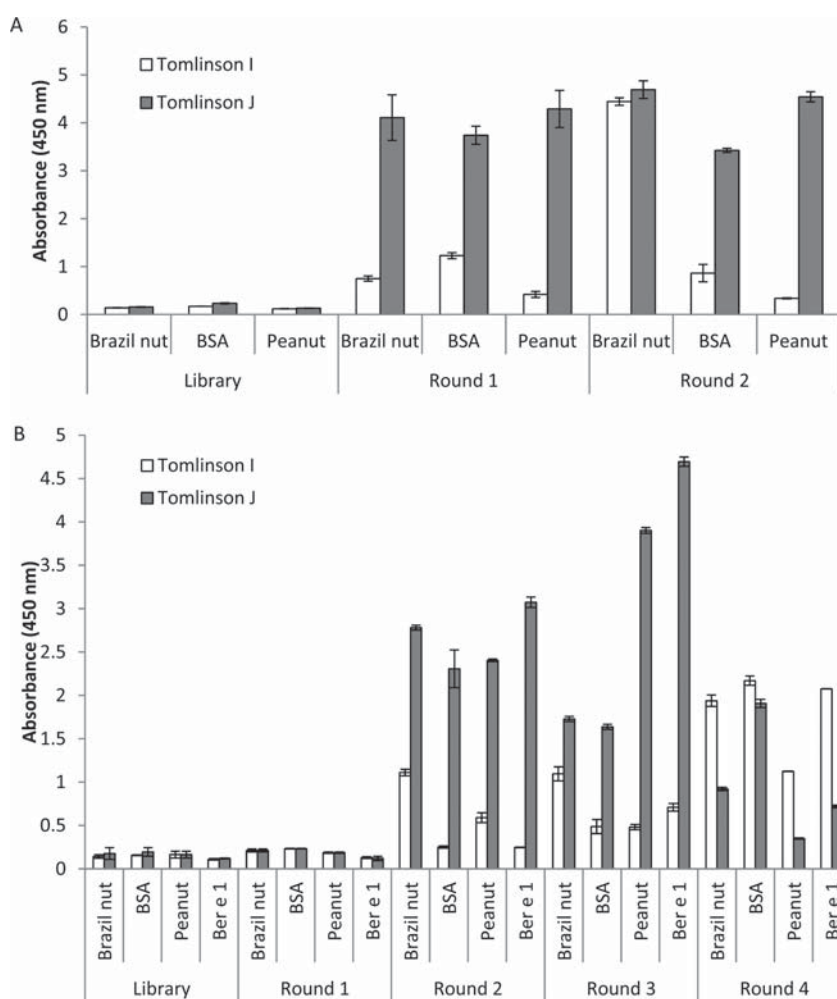


Figure 2. Indirect phage-ELISA results obtained with polyclonal phages rescued at each round of panning against Brazil nut extract (A) and purified Ber e 1 (B). Precipitated phages from each round of panning (containing approximately 10^{11} phage particles per milliliter) were analyzed by ELISA. Absorbance values are the mean of three independent determinations. Error bars show the standard deviation for each set of data.

To validate the applicability of the developed method for detection of Brazil nut protein in foodstuffs, a total of 92 commercial processed food products were analyzed. Samples including breakfast cereals, ice cream, cookies, nut beverages, chocolate, and nutritional bars were selected because they are varieties of food containing Brazil nut as one of the ingredients or might have been exposed to cross-contamination with Brazil nut. Each sample was analyzed in triplicate using the Brazil nut indirect phage-ELISA. Furthermore, in order to confirm the results, samples were also analyzed by a real-time PCR method developed in our laboratory that employs Brazil nut specific primers and probe and targets the 2S albumin gene.²⁹

RESULTS AND DISCUSSION

Ber e 1 Purification. Size-exclusion chromatography of defatted Brazil nut protein extract was resolved in a protein

profile with three major peaks, similar to that obtained by Sharma et al.²⁵ Fraction corresponding to Ber e 1 protein was further purified by passing it through a preparative HPLC column. Proteins were eluted off the column at 25–35% acetonitrile (min 30 to 40), and SDS-PAGE electrophoresis of the fraction, performed in reducing conditions, showed a single band of approximate 9 kDa (Figure 1). A proteomics approach was used to confirm the identity of purified Ber e 1 protein. The excised band was trypsinized and subsequently identified by MALDI-TOF/TOF. As shown in Table 2, two peptide isoforms of the 2S sulfur-rich seed storage protein (Ber e 1) from *B. excelsa* were identified, with 11% and 14% of sequence coverage. It is described that Ber e 1 has a polymorphic nature, because it is encoded by multiple gene sequences and,

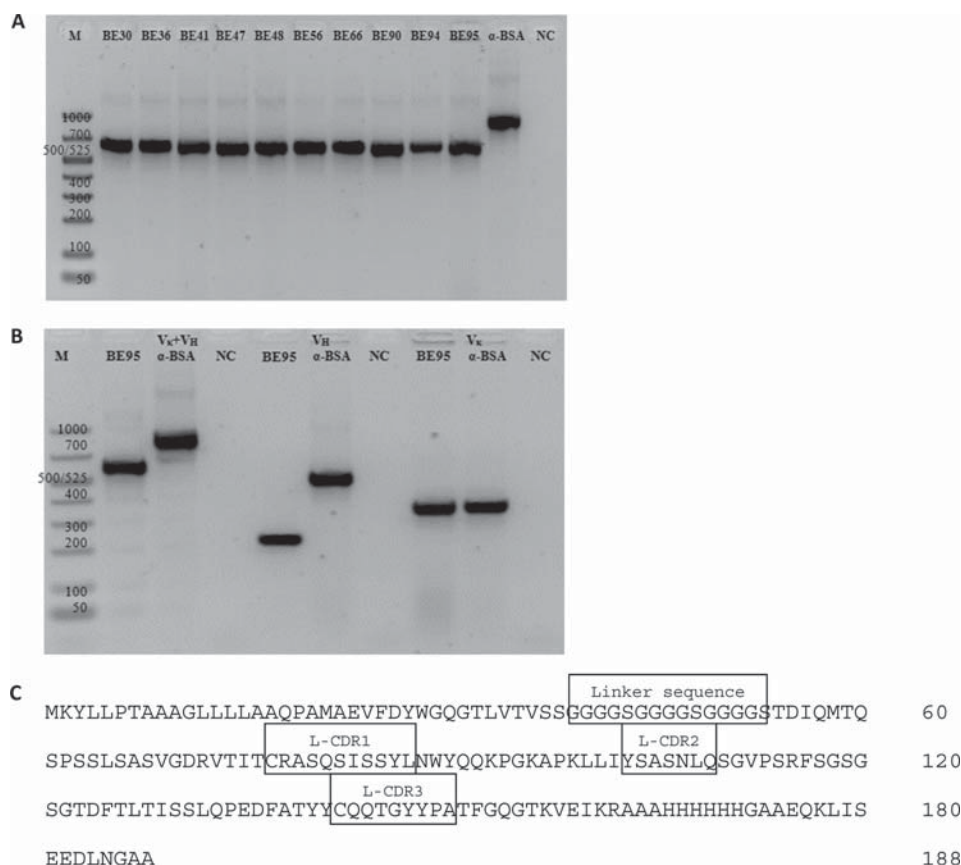


Figure 3. PCR amplification and sequencing of the selected clones. (A) PCR amplification using primers LMB3 and pHEN seq, for the complete scFv fragment. Clones with full length scFv gene should have bands at about 935 bp. ScFv clones against Brazil nut had bands at 628 bp. Lane M, DNA marker (BioMarker Low, BioVentures Inc.); lanes BE30, BE36, BE41, BE47, BE48, BE56, BE66, BE90, BE94, and BE95, different scFv clones against Brazil nut; lane α -BSA, scFv clone against BSA (positive control); lane NC, nontransduced TG1 (negative control). (B) PCR amplification using primers for the complete scFv fragment, the VH fragment, and the VK fragment. Lane M, DNA marker; lane BE95, scFv clone against Brazil nut; lane α -BSA, scFv clone against BSA (positive control); lane NC, nontransduced TG1 (negative control). (C) Amino acid sequences were deduced from the nucleotide sequences by the ExPasy Web site. Positions of the respective complementary determining regions for the variable domains of light chain (L-CDR 1–3) are indicated.

moreover, it is subjected to post-translational modifications.³⁰ Thus, the results obtained confirm the identity of the purified Brazil nut 2S albumin.

Libraries Screening. Usually, selection strategies employing phage libraries are carried out on purified molecules, since this allows performing the screening on well-defined antigens. However, by selecting a complex protein extract, cumbersome protein purification steps could be avoided. Furthermore, protein extracts allow isolation of phage clones that bind to specie-specific epitopes in a wider variety of molecules. Accordingly, we have used the Tomlinson I + J libraries to isolate phage scFvs against a purified Brazil nut protein (Ber e 1) or a whole Brazil nut protein extract, to determine the efficiency of the selection procedure for both types of targets.

Approximately 10^{12} phage particles were used for each round of selection. As the selection procedure progresses, a gradual increase in phage titers is expected, and such an increase frequently indicates the enrichment of specific phage binders.³¹ The clear increase in recovery values of phage particles obtained after the second round of selection for the Brazil nut extract was noteworthy, particularly regarding Tomlinson I library (2×10^3 phage particles recovered after the first round and 4×10^8 phage particles after the second round).

Polyclonal Phage-ELISA. The presence of positive binding phages after each round of selection was confirmed by polyclonal phage-ELISA using a Brazil nut protein extract or purified Ber e 1 as positive control, and a peanut extract and BSA as negative controls. As shown in Figure 2A, phages from the unselected libraries were not able to recognize both the target or negative control proteins. When selecting phages against the whole protein extract, scFv phages against Brazil nut became detectable even after the first round of selection, with a substantial increase in hypothetically specific phages at the second round of selection for library Tomlinson I ($A_{450} > 4$). On the other hand, library Tomlinson J showed high absorbance values for all the antigens assayed after both rounds of selection, therefore demonstrating no specificity for the target species. Consequently, no further analyses were performed with the Tomlinson J library.

Concerning phage antibodies raised against purified Ber e 1 (Figure 2B), no significant enrichment of the phage population specifically recognizing the Ber e 1 protein was obtained either for the I library or for the J library. After round three of selection, a generalized increase in the absorbance values for both positive and negative controls was found. Regarding the Tomlinson J library, the absorbance values for target protein dropped substantially in the polyclonal ELISA after the third

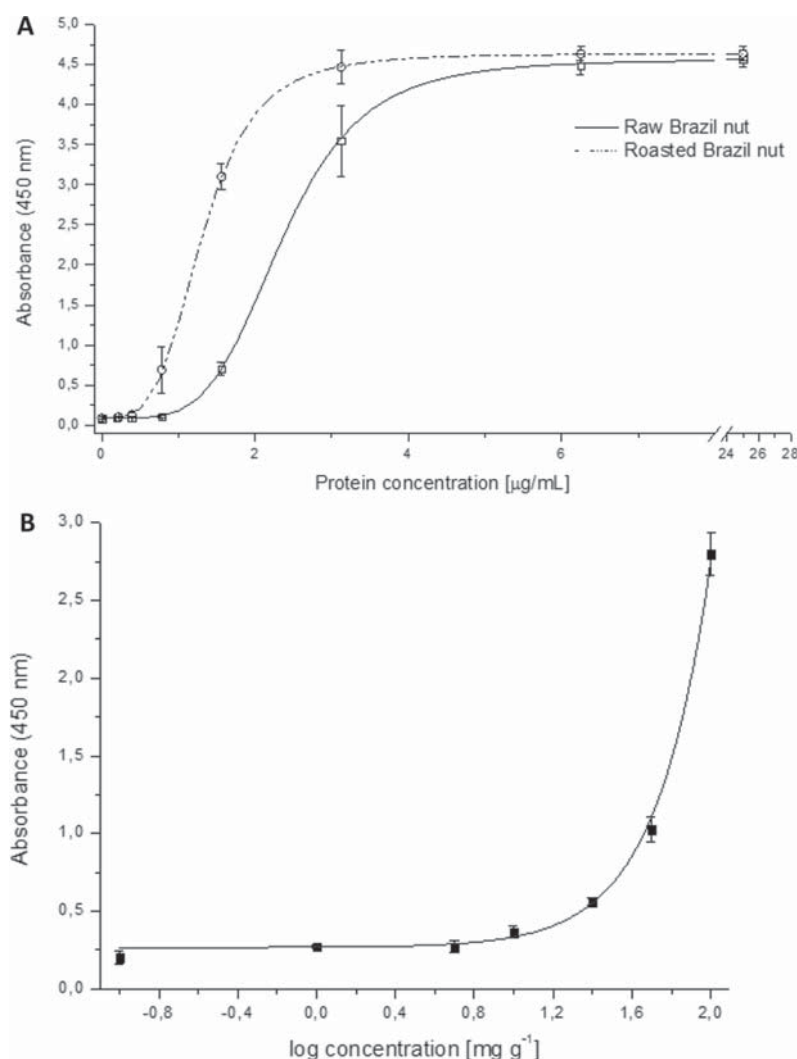


Figure 4. Representative standard curve of the developed Brazil nut indirect phage-ELISA. Each curve shows the mean value of six experiments and the standard deviation in each point of the curve. (A) Dilutions of raw and roasted Brazil nut protein extracts. (B) Protein extracts obtained from experimental Brazil nut/wheat flour binary mixtures.

round of panning, and the absorbance values for negative controls in the second and third rounds of selection were similar to those of positive controls. Therefore, after four rounds of selection with the purified Ber e 1 protein, no scFv phages that specifically recognized purified Ber e 1 were isolated using the Tomlinson I + J libraries. These results suggest that the VH–Vk combination necessary for the specific detection of Ber e 1 are not present in these libraries and further stress the importance of a comprehensive initial library. Thus, the panning using the purified protein was discontinued.

According to these results, a successful enrichment in scFv phages with affinity for Brazil nut was achieved only when the panning procedure was carried out using a Brazil nut protein extract obtained with phosphate buffer with 1 M NaCl. Therefore, the Brazil nut protein extract was further employed to test the specificity and sensitivity of the assays and also as a reference (positive control) in the ELISA for detection of Brazil nut in food samples.

Monoclonal Phage-ELISA. Phages eluted from Tomlinson I library after the second round of selection were used to infect *E. coli* TG1. Ninety-five phage clones were randomly picked and tested against the Brazil nut protein extract. Approximately

90% of the selected clones resulted positive, with 87 clones recognizing Brazil nut extract (absorbance values against Brazil nut extract/absorbance against negative controls >5). Ten of those 87 clones were randomly selected for further analysis.

Sequence Analysis of the Positive Clones. PCR amplification (using LMB3 and pHEN seq primers) of the scFv genes encoded in all phagemids selected after the second round of selection yielded products of 628 bp (Figure 3A), indicating the scFv inserts were incomplete (a complete fragment like that of the anti-BSA control has a length of about 935 bp). Then, PCR amplifications were performed for both VH and Vk inserts with specific primers. Figure 3B shows that clone BE95 contains a complete Vk fragment, with an insert of 368 bp, but an amplicon length of 227 bp for VH, indicating the absence of a VH sequence. For comparison, the anti-BSA positive control clone (provided with the library) had a full length VH insert of 527 bp. The complete nucleotide sequence was determined for 10 selected clones, and the results indicated that the coding sequences of all clones were identical, confirming the absence of the VH sequence. Hence, these scFv phagemids were uniformly designated as BE95. When compared to the NCBI database, the selected positive clone

was confirmed to be a human $V\kappa$ insert. Deduced amino acid sequences of the positive clone showing the CDRs and immunoglobulin framework regions (FRs) are illustrated in Figure 3C. Although heavy and light chains are usually paired in the human immune system, VH and VL can in some circumstances exist in isolation, maintaining their ability to recognize antigens.³¹ In fact, a commercially available human antibody library consisting of antibody fragments based exclusively on a single VH domain is available.³² In our case, we have isolated a fragment consisting solely of a single $V\kappa$ domain, which has the property of recognizing and binding the target antigen. In this respect, studies about immunoglobulin free light chains (Ig-fLCs) have demonstrated that although affinity might not reach that of tetrameric antibodies, binding of Ig-fLCs to their corresponding antigens is of sufficient strength to be detected with common immunodetection methods.³³

Assay Specificity. Specificity of the developed ELISA assay using BE95 phage scFv as affinity probe was ascertained through analysis of protein extracts from a wide variety of plant and animal species (Table 1). It should be noted that other ELISA assays described in the literature for Brazil nut detection showed interference problems with members of the Lauraceae family such as *C. verum*.¹⁵ In our case, we found that Brazil nut extract produced an A_{450} value of 4.386 ± 0.08 , whereas none of the nontarget crop protein extracts tested developed a significant signal (A_{450} value above the negative control value +3 standard deviations) in the Brazil nut indirect phage-ELISA, thus confirming the specificity of the assay.

The sensitivity of the assay (minimum quantity of Brazil nut protein detectable by the method developed in this work) was evaluated by analysis of serial dilutions of Brazil nut extract in PBS. Absorbance values at 450 nm increased in a concentration-dependent manner, until saturation levels were reached. Calibration curves showing the means and standard deviations were constructed for the Brazil nut indirect phage-ELISA (Figure 4A). LOD for Brazil nut without food matrix was found to be $0.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Brazil nut protein extract (90 ng of Brazil nut protein per well), whereas LOQ was $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

It is well-established that food processing can lead to modification of food constituents, resulting in alteration of protein solubility or integrity of target proteins.³⁴ Therefore, to appraise the capability of the method for also detecting heat-treated proteins, a protein extract from roasted Brazil nut was submitted to ELISA. Under these conditions, the LOD was $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ of roasted Brazil nut extract, whereas the LOQ was established at $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figure 4A). The observed increase in the sensitivity of protein detection could be explained by the fact that thermal processing can modify protein structures, denaturing them and making epitopes more accessible for antibody binding.³⁵

Because food matrix may affect assay performance due to the presence of interfering matrix components,³⁶ experimental binary mixtures of Brazil nut in wheat flour were also analyzed. Wheat flour was chosen as a representative matrix to test how it may affect the ability of the assay to detect Brazil nut proteins, for most Brazil nut containing foodstuffs are cereal-based products. The practical LOD of the ELISA was ascertained by spiking wheat flour with different concentrations of Brazil nut and subjecting them to the assay (Figure 4B). Subsequently, the LOD and LOQ for the Brazil nut and wheat flour mixtures were established at 5 and 20 mg g^{-1} of Brazil nut, respectively.

Even though the threshold dose of Brazil nut protein required to elicit an allergic reaction in sensitive individuals is not known, there is scientific agreement that the detection limits for different allergenic ingredients in foodstuffs must be somewhere between 1 and 100 mg kg^{-1} , depending on the respective food.^{37–39} Therefore, for an optimal performance as a screening test, the ELISA method should be able to detect allergens at about the former interval. Hence, taken together these results suggests that the present Brazil nut ELISA is highly specific but not as sensitive as the developed PCR technique²⁹ or other published ELISA methods using polyclonal antibodies.^{12,14,15} However, the present method is particularly suitable to carry out the quality assurance of raw materials, where the sensitivity of the technique would entail a less critical role.

Determination of Brazil Nut in Commercial Food Products. The development of analytical methods to monitor food products for the presence of Brazil nut is important not only because an undeclared presence of this nut could cause a serious health problem in sensitized individuals but also because Brazil nuts are a susceptible target for economically motivated adulteration, due to their superior value when compared with other tree nuts or peanut.⁴⁰ The applicability of the developed method for detection of Brazil nut proteins in foodstuffs was assessed through analysis of 92 commercial food products (Table 3) that could contain Brazil nut in their composition. Among the samples analyzed, 18 were labeled as containing Brazil nut as an ingredient, 15 were labeled as “containing traces of Brazil nut”, 43 were labeled as “may contain traces of nuts”, and the remaining 16 did not declare containing nuts. Brazil nut protein was detected in 15 of the 18 processed foods including Brazil nut in the ingredient list. Regarding the three samples that did not show positive results in ELISA, real-time PCR analysis supported negative results for the chocolate samples, but amplified Brazil nut DNA was indicated from the nut bar sample. The absence of a positive signal or DNA amplification in chocolate samples that declared to contain Brazil nut might be ascribed to a fraudulent substitution with cheaper nuts. However, the absence of positive results in the nut bar could be explained because the content of Brazil nut is below the LOD of the developed ELISA. Concerning samples that declared traces of Brazil nut, none of the 15 chocolates showed positive results, in ELISA or in real-time PCR. One alternative interpretation for these results might be that the company elaborates Brazil nut containing products and products not containing Brazil nut at the same factory and prefers to warn allergic consumers about possible cross-contaminations. Finally, no positive results were found after ELISA analysis in commercial food products that declared to contain traces of tree nuts nor in commercial food products that declared not to contain nuts, and the real-time PCR analysis supported the ELISA findings.

In summary, the results obtained demonstrate that the affinity probe isolated from the commercial library Tomlinson I is specific for Brazil nut detection and can be used in an indirect phage-ELISA to detect concentrations up to 5 mg g^{-1} of Brazil nut in commercial foodstuffs. The present work describes for the first time the isolation of recombinant antibody fragments specific for an allergenic tree nut and demonstrates that they can be used to develop immunoassays for food allergen detection based on probes that can be produced in vitro when required and do not rely on animal immunization. As a genetically well-defined probe was obtained, improvement of

Table 3. Determination of the Presence of Brazil Nut Protein in Various Commercial Processed Food Products Using the Brazil Nut ELISA

| | no. of samples analyzed | Brazil nut ELISA ^a | Ber e 1 (BNS) real-time PCR ^a |
|---|-------------------------|-------------------------------|--|
| Commercial Food Products That Declared Brazil Nut as an Ingredient | | | |
| chocolate | 5 | + (3)/– (2) | + (3)/– (2) |
| food bar | 6 | + (5)/– (1) | + (6) |
| muesli | 2 | + (2) | + (2) |
| cereal | 4 | + (4) | + (4) |
| biscuit | 1 | + (1) | + (1) |
| Commercial Food Products That Declared Traces of Brazil Nut | | | |
| chocolate | 15 | – (15) | – (15) |
| Commercial Food Products That Declared To Contain Traces of Tree Nuts | | | |
| biscuit | 9 | – (9) | – (9) |
| bread | 3 | – (3) | – (3) |
| chocolate | 8 | – (8) | – (8) |
| cereal | 2 | – (2) | – (2) |
| rice cake | 1 | – (1) | – (1) |
| food bar | 5 | – (5) | – (5) |
| granola | 2 | – (2) | – (2) |
| ice cream | 3 | – (3) | – (3) |
| candy bar | 1 | – (1) | – (1) |
| sauce | 1 | – (1) | – (1) |
| cream | 3 | – (3) | – (3) |
| beverage | 5 | – (5) | – (5) |
| Commercial Food Products That Declared Not To Contain Nuts | | | |
| chocolate | 1 | – (1) | – (1) |
| bread | 2 | – (1) | – (1) |
| beverage | 3 | – (3) | – (3) |
| biscuit | 6 | – (6) | – (6) |
| precooked meal | 1 | – (1) | – (1) |
| ice cream | 1 | – (1) | – (1) |
| powdered infant cereals | 2 | – (2) | – (2) |

^a A plus (+) indicates absorbance values above the LOD (ELISA) or the presence of amplification after 50 cycles (real-time PCR), and a minus (–) indicates absorbance values lower than LOD or an absence of amplification after 50 cycles (real-time PCR).

the assay sensitivity by engineering enzyme ligands, affinity maturation of the phage-antibodies, or further selecting intact VH-Vk phages is possible.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: 34-913943747. E-mail: tgarcia@vet.ucm.es.

Funding

This study was supported by Grant No. AGL 2010-15279 from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (Spain). S.d.l.C. is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ABBREVIATIONS USED

BCA, biconchonic acid; BSA, bovine serum albumin; CDR, complementary determining regions; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FR, framework regions; Ig-fLCS, immunoglobulin free light chains; LOD, limit of detection;

LOQ, limit of quantification; OD, optical density; PBS, phosphate-buffered saline; RT, room temperature; SD, standard deviation; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; scFv, single chain variable fragment; VH, variable heavy; V_k, variable kappa light.

■ REFERENCES

- Thomson, C. D.; Chisholm, A.; McLachlan, S. K.; Campbell, J. M. Brazil nuts: An effective way to improve selenium status. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 379–384.
- Alcocer, M.; Rundqvist, L.; Larsson, G. Ber e 1 protein: The versatile major allergen from Brazil nut seeds. *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34*, 597–610.
- Roux, K. H.; Teuber, S. S.; Sathe, S. K. Tree nut allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2003**, *131*, 234–244.
- Schubert-Ullrich, P.; Rudolf, J.; Ansari, P.; Galler, B.; Führer, M.; Molinelli, A.; Baumgartner, S. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: An overview. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 69–81.
- Beyer, K.; Bardina, L.; Grishina, G.; Ashraf, A.; Teuber, S.; Niggemann, B.; Sampson, H. A. Identification of a new Brazil nut allergen—Ber e 2. *J. Allergy Clin. Immun.* **2008**, *121*, S247.
- Monaci, L.; Visconti, A. Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends Food Sci. Tech.* **2010**, *21*, 272–283.
- Madsen, C. B.; Crevel, R.; Chan, C.; Dubois, A. E. J.; DunnGalvin, A.; Flokstra-de Blok, B. M. J.; Gowland, M. H.; Hattersley, S.; O'B Hourihane, J.; Nørhede, P.; Pfaff, S.; Rowe, G.; Schnadt, S.; Vlieg-Boerstra, B. J. Food allergy: Stakeholder perspectives on acceptable risk. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *57*, 256–265.
- Commission Directive 2007/68/EC amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC regarding certain food ingredients. *Off. J. Eur. Union* **2007**, *L310*, 11–14.
- Regulation (EU) No 1169/2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004. *Off. J. Eur. Union* **2011**, *L304*, 18–63.
- Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004, 21 USC 301 note.
- Regulations Amending the Food and Drug Regulations (1220-Enhanced for Food Allergen and Gluten Sources and Added Sulphites). SOR/2011-28, February 4, 2011. *Canada Gazette Part II* **145** (4), 324–330.
- Ben Rejeb, S.; Abbott, M.; Davies, D.; Clérout, C.; Delahaut, P. Multi-allergen screening immunoassay for the detection of protein markers of peanut and four tree nuts in chocolate. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 709–715.
- Blais, B. W.; Omar, M.; Phillippe, L. Detection of Brazil nut proteins in foods by enzyme immunoassay. *Food Agric. Immunol.* **2002**, *14*, 163–168.
- Clemente, A.; Chambers, S. J.; Lodi, F.; Nicoletti, C.; Brett, G. M. Use of the indirect competitive ELISA for the detection of Brazil nut in food products. *Food Control* **2004**, *15*, 65–69.
- Sharma, G. M.; Roux, K. H.; Sathe, S. K. A sensitive and robust competitive enzyme-linked immunosorbent assay for Brazil nut (*Bertholletia excelsa* L.) detection. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 769–776.
- Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union* **2010**, *L276*, 33–79.
- Maynard, J.; Georgiou, G. Antibody engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2000**, *2*, 339–376.
- Carter, P. J. Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 343–357.

- (19) Weisser, N. E.; Hall, J. C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 502–520.
- (20) Hoogenboom, H. R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1105–1116.
- (21) Pande, J.; Szewczyk, M. M.; Grover, A. K. Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 849–858.
- (22) Wang, Y.; Zhang, X.; Zhang, C.; Liu, Y.; Liu, X. Isolation of single chain variable fragment (scFv) specific for Cry1C toxin from human single fold scFv libraries. *Toxicon* **2012**, *60*, 1290–1297.
- (23) Zhang, X.; Liu, Y.; Zhang, C.; Wang, Y.; Xu, C.; Liu, X. Rapid isolation of single-chain antibodies from a human synthetic phage display library for detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1B toxin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2012**, *81*, 84–90.
- (24) Garet, E.; Cabado, A. G.; Vieites, J. M.; González-Fernández, Á. Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: Palytoxin. *Toxicon* **2010**, *55*, 1519–1526.
- (25) Sharma, G. M.; Mundoma, C.; Seavy, M.; Roux, K. H.; Sathe, S. K. Purification and biochemical characterization of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* L.) seed storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5714–5723.
- (26) Doi, H.; Touhata, Y.; Shibata, H.; Sakai, S.; Urishu, A.; Akiyama, H.; Teshima, R. Reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of walnut proteins in processed foods. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7625–7630.
- (27) Menendez, A.; Scott, J. K. The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Anal. Biochem.* **2005**, *336*, 145–157.
- (28) Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835–855.
- (29) de la Cruz, S.; López-Calleja, I. M.; Alcocer, M.; González, I.; Martín, R.; García, T. TaqMan real-time PCR assay for detection of traces of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in food products. *Food Control* **2013**, *33*, 105–113.
- (30) Moreno, F. J.; Jenkins, J. A.; Mellon, F. A.; Rigby, N. M.; Robertson, J. A.; Wellner, N.; Mills, E. N. C. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1698*, 175–186.
- (31) Lee, C. M. Y.; Iorno, N.; Sierro, F.; Christ, D. Selection of human antibody fragments by phage display. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 3001–3008.
- (32) Christ, D.; Famm, K.; Winter, G. Repertoires of aggregation-resistant human antibody domains. *Protein Eng. Des. Sel.* **2007**, *20*, 413–416.
- (33) Thio, M.; Kormelink, T. G.; Fischer, M. J.; Blokhuis, B. R.; Nijkamp, F. P.; Redegeld, F. A. Antigen binding characteristics of immunoglobulin free light chains: Crosslinking by antigen is essential to induce allergic inflammation. *PLoS One* **2012**, *7*, e40986.
- (34) Scaravelli, E.; Brohé, M.; Marchelli, R.; van Hengel, A. J. The effect of heat treatment on the detection of peanut allergens as determined by ELISA and real-time PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 127–137.
- (35) Sathe, S. K.; Teuber, S. S.; Roux, K. H. Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnol. Adv.* **2005**, *23*, 423–429.
- (36) Blais, B. W.; Gaudreault, M.; Phillippe, L. M. Multiplex enzyme immunoassay system for the simultaneous detection of multiple allergens in foods. *Food Control* **2003**, *14*, 43–47.
- (37) Poms, R. E.; Klein, C. L.; Anklam, E. Methods for allergen analysis in food: A review. *Food Addit. Contam.* **2004**, *21*, 1–31.
- (38) Taylor, S. L.; Crevel, R. W. R.; Sheffield, D.; Kabourek, J.; Baumert, J. Threshold dose for peanut: Risk characterization based upon published results from challenges of peanut-allergic individuals. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1198–1204.
- (39) Threshold Working Group. Approaches to establish thresholds for major food allergens and for gluten in food. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 1043–1088.
- (40) Everstine, K.; Spink, J.; Kennedy, S. Economically motivated adulteration (EMA) of food: Common characteristics of EMA incidents. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 723–735.

CAPÍTULO 6

USO DE LA TECNOLOGÍA DE *PHAGE DISPLAY* PARA AISLAR ANTICUERPOS RECOMBINANTES DE TIPO SCFV PARA DETECTAR ALÉRGENOS DE ALMENDRA EN ALIMENTOS

CHAPTER 6

ISOLATION OF RECOMBINANT ANTIBODY FRAGMENTS (scFv) BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY FOR DETECTION OF ALMOND ALLERGENS IN FOOD PRODUCTS

Food Control 54 (2015) 322-330



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Isolation of recombinant antibody fragments (scFv) by phage display technology for detection of almond allergens in food products



Silvia de la Cruz ^{a,1}, Carolina Cubillos-Zapata ^{b,1}, Inés María López-Calleja ^a,
Satyabrata Ghosh ^a, Marcos Alcocer ^c, Isabel González ^a, Rosario Martín ^a, Teresa García ^{a,*}

^a Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain

^b Tumor Immunology Lab/Innate Immunity Group, IdiPAZ, Hospital La Paz, 28046, Madrid, Spain

^c Department of Nutritional Sciences, School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, LE12 5RD, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 September 2014
Received in revised form
20 January 2015
Accepted 9 February 2015
Available online 17 February 2015

Keywords:

Almond (*Prunus dulcis*)
Phage display
scFv
ELISA
Allergen labeling
Food allergen

ABSTRACT

Tree nut allergies are considered an important health issue in developed countries. To comply with the regulations on food labeling, reliable allergen detection methods are required. In this work we isolated almond-specific recombinant antibody fragments (scFv) from a commercial phage display library bypassing the use of live animals, hence being consistent with the latest policies on animal welfare. To this end an iterative selection procedure employing the Tomlinson I phage display library and a crude almond protein extract was carried out. Two different almond-specific scFv (named PD1F6 and PD2C9) were isolated after two rounds of biopanning, and an indirect phage ELISA was implemented to detect the presence of almond protein in foodstuffs. The isolated scFvs demonstrated to be highly specific and allowed detection of 40 ng mL⁻¹ and 100 ng mL⁻¹ of raw and roasted almond protein, respectively. The practical detection limit of the assay in almond spiked food products was 0.1 mg g⁻¹ (110–120 ppm). The developed indirect phage ELISA was validated by analysis of 92 commercial food products, showing good correlation with the results obtained by a previously developed real-time PCR method for the detection of almond in foodstuffs. The selected phage clones can be affinity matured to improve their sensitivity and genetically engineered to be employed in different assay formats.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Almond (*Prunus dulcis*, family Rosaceae) is a tree nut used as ingredient in a wide variety of food products due to its desirable organoleptic attributes, claimed health benefits, and prebiotic properties (Jenkins, Hu, Tapsell, Josse, & Kendall, 2008; Kamil & Chen, 2012; Kendall, Josse, Esfahani, & Jenkins, 2010; Mandalari, Nueno-Palop, Bisignano, Wickham, & Narbad, 2008). However, almond allergens can trigger adverse immune responses in sensitized individuals, including severe anaphylactic shock reactions

(Costa, Mafra, Carrapatoso, & Oliveira, 2012; Teuber, Comstock, Sathe, & Roux, 2003). To prevent health-threatening situations, authorities strongly recommend allergic consumers the total avoidance of the offending food. However, unintended exposure to almond-containing products can happen because of mislabeling of food products, cross-contamination during food processing, or undeclared presence of almond in a ingredient. In order to minimize the accidental ingestion of allergenic foods, labels must provide accurate information concerning the list of ingredients. Several countries have enacted labeling guidelines to safeguard allergic individuals (European Parliament and Council, 2011; Regulations Amending the Food and Drug Regulations, 2011). Nevertheless, enforcement of these regulations depend on the availability of sensitive and specific analytical methods that would permit to verify the accuracy of labels.

Current methods for almond detection include mainly DNA-based and immunochemical techniques. Food labeling regulations do not require the detection of allergenic proteins but the allergenic ingredient itself. According to this, DNA represents a more stable

Abbreviations: BCA, biconchonic acid; BSA, bovine serum albumin; CDR, complementary determining regions; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FR, framework regions; LOD, limit of detection; OD, optical density; PBS, phosphate buffered saline; SD, standard deviation; scFv, single chain variable fragment; VH, variable heavy; Vk, variable kappa light.

* Corresponding author. Tel.: +34 913943747.

E-mail address: tgarcia@vet.ucm.es (T. García).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.011>
0956-7135/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

target molecule than proteins, and it is not influenced by geographical or seasonal variations that affect protein composition (Poms, Klein, & Anklam, 2004). However, despite its high sensitivity, the use of DNA analysis in allergen detection is controversial, since it does not directly detect the allergen or any specific protein (Lau, 2014; Poms et al., 2004). Immunochemical techniques are based on the interaction between an antibody and an antigen, which can be an allergen or a marker protein. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most widely used technique for routine screening of allergens in foods, and up-to-date ELISA assays have been developed to detect almond proteins (Acosta, Roux, Teuber, & Sathe, 1999; Ben Rejeb, Abbott, Davies, Cléroux, & Delahaut, 2005; Hlywka, Hefle, & Taylor, 2000; Su et al., 2013). Although assays may differ in format, all of them have in common the use of antibodies raised in animals.

Phage display technology provides an alternative to traditional antibody production, allowing the generation of large quantities of affinity probes with a well defined and constant amino acid sequence. Moreover, it permits to bypass the use of live animals, hence being consistent with the latest policies on animal welfare (European Parliament and Council, 2010). Phage display technology employs libraries of recombinant bacteriophages that expose on their surface functional antibody binding sites, and it allows the isolation of recombinant antibodies with the desirable binding affinity against the antigen by an iterative selection procedure (Clementi et al., 2012). Due to its versatility, phage display technology has multiple applications (Bratkovi  , 2010). Regarding food science, phage display technology has been successfully applied to monitor the presence of *Salmonella typhimurium* in food (Sorokulova et al., 2005) or to detect spores of *Clostridium tyrobutyricum* in milk (Lavilla et al., 2010). For it does not depend on animal immunization, it can be used to obtain specific antibody fragments against toxic or allergenic compounds. Using this technology, Lauer, Otteleben, Jacobsen, and Reinard (2005) isolated a scFv against fumonisin B1, a highly toxic mycotoxin found in corn based products, and Garet, Cabado, Vieites, and González-Fernández (2010) reported the isolation of four scFv to detect palytoxin, a marine biotoxin, in shellfish. Phage display technology has also been used to isolate specific scFv that allow the detection of *Cryptosporidium parvum* sporozoites in water and foodstuff (Boulter-Bitzer, Lee, & Trevors, 2009).

The aim of this work was to isolate specific recombinant antibodies against almond proteins employing a phage-display library of single chain variable antibody fragments (scFv), and to develop a phage-ELISA to detect almond proteins in commercial food products using the isolated affinity probes.

2. Materials and methods

2.1. Materials and chemicals

Tomlinson I library, M13K07 helper phage, and *Escherichia coli* TG1 strain (K12 Δ (*lac-proAB*) *supE thi hsdD5/F' traD36 proA⁺B lacI^q lacZ Δ M15*) were obtained from Source BioScience (Nottingham, UK). The library has a size of 1.47×10^8 pfu mL⁻¹, and is based on a single human framework for VH (V3-23/DP-47 and JH4b) and Vk (O12/O2/DPK9 and Jk1), which encodes the most common human canonical structure. ScFv is displayed fused with the terminal phage gene III protein, and it is cloned in the ampicillin resistant phagemid vector pIT2.

Almonds "Marcona" cultivar and other tree nuts were acquired from local retailers in Madrid (Spain). After being shelled, they were stored at -20°C until further use. A total of 13 different almond varieties (Table 1) kindly provided by the IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroaliment  ries, Tarragona, Spain) and the

Table 1

Phage-ELISA results (OD 450 nm) obtained for different almond kernel cultivars with scFVs from clones PD1F6 and PD2C9.

| <i>Prunus dulcis</i> cultivars | PD1F6 | PD2C9 |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| Almond "Marcona" | 4.05 \pm 0.05 | 3.96 \pm 0.06 |
| Almond "Bitter" | 3.69 \pm 0.19 | 3.63 \pm 0.16 |
| Almond "Guara" | 4.37 \pm 0.20 | 4.55 \pm 0.03 |
| Almond "Glorieta" | 4.15 \pm 0.21 | 4.13 \pm 0.25 |
| Almond "Ferragnes" | 3.68 \pm 0.14 | 3.53 \pm 0.06 |
| Almond "Vairo" | 4.39 \pm 0.17 | 4.38 \pm 0.16 |
| Almond "Francoli" | 4.12 \pm 0.12 | 4.03 \pm 0.15 |
| Almond "Masbovera" | 3.33 \pm 0.10 | 3.36 \pm 0.17 |
| Almond "Belona" | 4.45 \pm 0.10 | 4.28 \pm 0.06 |
| Almond "Marinada" | 3.64 \pm 0.19 | 3.57 \pm 0.20 |
| Almond "Tarraco" | 4.42 \pm 0.14 | 4.41 \pm 0.24 |
| Almond "Constanti" | 4.07 \pm 0.08 | 4.00 \pm 0.09 |
| Almond "Soleta" | 4.49 \pm 0.10 | 4.49 \pm 0.07 |
| Almond "Marta" | 4.25 \pm 0.17 | 4.22 \pm 0.22 |

CEBAS-CSIC (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Murcia, Spain), were analyzed to check the specificity of the assay. Animal and plant species—including representative members of the Rosaceae family—employed in specificity assays (Table 2) were purchased in different local markets in Madrid. Finally, a total of 92 commercial food products were purchased from different retail markets and delicatessen stores (Spain).

HRP/anti-M13 monoclonal mouse antibody was purchased from GE Healthcare (Munchen, Germany). Tryptone, yeast extract and European bacteriological agar were purchased from Laboratorios Conda (Madrid, Spain). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

PBS composition is 0.01 M phosphate buffer, 0.0027 M potassium chloride and 0.137 M sodium chloride, pH 7.4. The protein extraction buffer consisted of 0.035 M phosphate solution containing 1 M NaCl, pH 7.5. 2xTY broth is 16 g L⁻¹ tryptone, 10 g L⁻¹ yeast extract and 5 g L⁻¹ NaCl. TYE agar is 15 g L⁻¹ bacto-agar, 10 g L⁻¹ tryptone, 5 g L⁻¹ yeast extract and 8 g L⁻¹ NaCl.

2.2. Preparation of protein extracts

All samples (Tables 1 and 2) were ground using a mortar and pestle, and stored in screw-capped vials at -20°C . Protein extracts were prepared by adding 200 mg of sample to 1800 μL of protein extraction buffer. After shaking for 10 min at room temperature in a vertical rotator (HulaMixer Sample Mixer, Life Technologies, Carlsbad, CA) to extract soluble proteins, the slurry was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C , and the supernatant was filtered through a 0.45 μm syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany). Bicinchoninic acid (BCA) assay (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA) was employed to determine protein concentration. Protein extracts were stored at -20°C until further use.

2.3. Preparation of binary mixtures

To evaluate the sensitivity of the assay, binary mixtures of almond Marcona in wheat flour (100–0.01 mg g⁻¹) were prepared using a food processor (Thermomix, Vorwerk, Germany). Concentration of 100 mg g⁻¹ was prepared by adding 50 g of ground almonds to 450 g of wheat flour. Then, 50 g of the former mixture was added to 450 g of wheat flour (10 mg g⁻¹). Remaining concentrations were made in a similar way. Additional mixtures of 50, 25, 5, and 0.5 mg g⁻¹ were prepared by mixing 250 g of wheat flour with 250 g of the mixtures containing 100, 50, 10 and 1 mg g⁻¹

Table 2

List of species not showing cross-reactivity with almond in the indirect phage-ELISA.

| Species | | |
|--|--|---|
| Nuts | | |
| Brazil nut (<i>Bertholletia excelsa</i>) | macadamia (<i>Macadamia integrifolia</i>) | pine nut (<i>Pinus pinea</i>) |
| cashew nut (<i>Anacardium occidentale</i>) | peanut (<i>Arachis hypogaea</i>) | pistachio (<i>Pistacia vera</i>) |
| hazelnut (<i>Corylus avellana</i>) | pecan nut (<i>Carya illinoensis</i>) | walnut (<i>Juglans regia</i>) |
| Vegetal Species | | |
| anise (<i>Pimpinella anisum</i>) | flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>) | paprika (<i>Capsicum annum</i>) |
| apple (<i>Malus domestica</i>) | garlic (<i>Allium sativum</i>) | pea (<i>Pisum sativum</i>) |
| apricot (<i>Prunus armeniaca</i>) | kiwifruit (<i>Actinidia deliciosa</i>) | peach (<i>Prunus persica</i>) |
| asparagus (<i>Asparagus officinalis</i>) | lentil (<i>Lens culinaris</i>) | pear (<i>Pyrus communis</i>) |
| aubergine (<i>Solanum melongena</i>) | lupine (<i>Lupinus albus</i>) | plum (<i>Prunus domestica</i>) |
| banana (<i>Musa acuminata</i>) | maize (<i>Zea mays</i>) | pumpkin seed (<i>Cucurbita maxima</i>) |
| barley (<i>Hordeum vulgare</i>) | mandarin orange (<i>Citrus reticulata</i>) | sesame (<i>Sesamum indicum</i>) |
| carrot (<i>Daucus carota</i>) | melon (<i>Cucumis melo</i>) | tiger nut (<i>Cyperus esculentus</i>) |
| cherry (<i>Prunus avium</i>) | oats (<i>Avena sativa</i>) | tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>) |
| chickpea (<i>Cicer arietinum</i>) | olive (<i>Olea europaea</i>) | vanilla (<i>Vanilla planifolia</i>) |
| cinnamon (<i>Cinnamomum verum</i>) | onion (<i>Allium cepa</i>) | wheat (<i>Triticum aestivum</i>) |
| cocoa (<i>Theobroma cacao</i>) | orange (<i>Citrus sinensis</i>) | zucchini (<i>Cucurbita pepo</i>) |
| common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>) | | |
| Animal Species | | |
| cattle (<i>Bos taurus</i>) | poultry (<i>Gallus gallus domesticus</i>) | swine (<i>Sus scrofa domestica</i>) |
| fish (<i>Salmo salar</i>) | | |
| Others | | |
| Brown sugar | milk | |

respectively. Protein extracts from binary mixtures were prepared following the procedure described in Section 2.2.

2.4. Preparation of phage display libraries for biopanning procedure

Phage display library was prepared for selection procedure following the manufacturer's protocol. Briefly, the library was amplified in 200 mL of 2xTY broth containing 100 µg mL⁻¹ ampicillin and 1% (w/v) glucose, and it was incubated with shaking (250 rpm) at 37 °C until reaching an optical density of 0.4 at 600 nm (OD₆₀₀). Then, 2 × 10¹¹ particles of helper phage were added to 50 mL of the former bacterial culture, and the flask was incubated in a water bath at 37 °C for 30 min. Bacterial cells were centrifuged at 3000 g for 10 min at 4 °C, resuspended in 100 mL of 2xTY broth containing 100 µg mL⁻¹ ampicillin, 50 µg mL⁻¹ kanamycin and 0.1% (w/v) glucose, and incubated with shaking (250 rpm) at 30 °C overnight. Next day, phage particles were precipitated with 20% polyethylene glycol – 6000, 2.5 M NaCl, and pelleted by centrifugation at 3300 g for 30 min at 4 °C. Phage pellet was resuspended in 4 mL of PBS, and centrifuged at 11,600 g for 10 min to remove any bacterial debris. Phages were titered, and kept at 4 °C for short term storage or at –80 °C in 15% glycerol for longer term storage.

2.5. Target immobilization

To avoid the isolation of unspecific phages which would produce false-positive results (Menendez & Scott, 2005), polystyrene paddles and magnetic beads were alternately used as coating surface. During the first round of selection, polystyrene paddles (Nunc, Denmark) with a surface area of 5.2 cm² were coated with 100 µg mL⁻¹ of almond extract in PBS (positive screening) or with 100 µg mL⁻¹ of peanut extract (negative screening), and incubated overnight at 4 °C. Previously to perform the experiment, paddles were blocked with 3% BSA at 37 °C for 1 h. For the second round of selection, proteins were coupled to Dynabeads M–280 Tosylactivated (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following manufacturer's

instructions. Briefly, 5 mg of Dynabeads were coated with 100 µg of almond proteins (positive panning) in 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.4, to a final volume of 150 µL and then, 100 µL of 3 M ammonium sulphate in Na-phosphate buffer was added. Coupling procedure was performed on a vertical rotator at 37 °C overnight. Next day, Dynabeads were blocked with 1 mL of 0.5% (w/v) BSA in PBS, 1 h at 37 °C with rotation. The same procedure was performed with the dynabeads used for negative panning, but employing a peanut protein extract as the ligand.

2.6. Selection of scFv clones against almond

Approximately 10¹² phage particles from Tomlinson I library in 2 mL of 3% (w/v) BSA in PBS were added to the peanut-coated polystyrene paddle and it was then incubated at 25 °C for 60 min on a rotator. After negative panning, supernatant containing unbound phage particles was added to the almond coated paddle, and it was incubated at 25 °C for 60 min with rotation, and for further 60 min without rotation. Unbound phages were removed by washing 10 times with PBS, and specifically bound phages were eluted by adding 500 µL of trypsin solution (1 mg/mL trypsin in PBS) for 10 min at room temperature with rotation. A total of 250 µL of the former solution was employed to infect 1.75 mL of a TG1 cell culture at an OD₆₀₀ of 0.4. After incubating 30 min at 37 °C in a water bath, infected cells were spread on a TYE agar plate containing 100 µg mL⁻¹ ampicillin and 1% (w/v) glucose, and grown overnight at 37 °C. Titre of eluted phage was also determined. Next day, *E. coli* colonies were scraped into 2 mL of 2xTY containing 15% glycerol and stored at –80 °C. To amplify the phages for the second round of selection, 50 µL of recovered bacteria from the first panning experiment were inoculated into 50 mL of 2xTY containing 100 µg mL⁻¹ ampicillin and 1% (w/v) glucose, and incubated at 37 °C until reaching an OD₆₀₀ of 0.4. Then, 10 mL of the culture was infected with 5 × 10¹⁰ particles of helper phage. Phage particles were rescued as described above. A second round of selection was performed as described above, but employing 2.5 mg of Dynabeads instead of polystyrene paddles, and increasing the number of washes to 20.

2.7. Polyclonal indirect Phage-ELISA

The enrichment of the phage display library with almond-binding phages was assessed through polyclonal phage-ELISA: (1) Flat-bottom polystyrene microtiter plates (F96 MaxiSorp Nunc immuno plates, Nunc, Denmark) were coated with 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of almond extract, peanut protein extract (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) or a BSA solution (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), in PBS; (2) microtiter plates were washed 3 times and blocked with 0.1% gelatin in PBS for 1 h at 37 °C; (3) after washing 3 times, 10 μL of precipitated phages from each round of selection (containing approximately 10^{10} phage particles) was added to 100 μL of 1% ovalbumin in PBS, and plates were incubated for 1 h at room temperature; (4) after washing 10 times, plates were incubated at room temperature for 1 h with 100 μL of a 1:5000 dilution of a HRP/anti-M13 monoclonal mouse antibody in 1% ovalbumin; (5) finally, plates were washed 5 times, and 100 μL of tetramethylbenzidine substrate solution was added to each well, and plates were incubated in the dark. Color development was performed for 10 min at room temperature and the reaction was stopped with 1 M sulphuric acid. OD₄₅₀ was measured with an iEMS Reader MF (Labsystems, Helsinki, Finland). All washing steps were performed with PBS. All experiments were performed in triplicate.

To assess the ability of single clones to recognize almond proteins, 150 individual colonies from the second round of selection were randomly picked. Single colonies were inoculated in cell culture microplates (Nunc, Denmark) containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin and 1% glucose, and plates were grown overnight at 37 °C with shaking (250 rpm). Next day, 5 μL from each well was used to infect a second microplate containing 200 μL 2xTY, with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin and 1% glucose. Plates were incubated for 2 h at 37 °C before adding 10^9 particles of helper phage per well. After 1 h of incubation at 37 °C, the plates were centrifuged at 1800 g for 10 min at 4 °C. Bacterial pellets were resuspended in 200 μL 2xTY containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin and 0.1% glucose, and incubated overnight at 30 °C. Next day, plates were centrifuged at 1800 g for 10 min, and supernatants were employed in monoclonal phage ELISA. To that end, immuno plates were coated overnight with 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of almond protein extract (positive control) or with 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of peanut protein extract (negative control) in PBS. ELISA assay was developed as described above, but employing 50 μL of the phage supernatant diluted in 100 μL of 1% ovalbumin instead of precipitated phages.

2.8. Sequence analysis

Phagemid DNA from almond-recognizing clones was amplified by PCR using GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, USA). PCR was carried out to check clone from single colonies for the presence of full length VH and V_K inserts with the following PCR program: 95 °C for 9 min, then, 95 °C for 30 s, 62 °C for 30 s, 72 °C for 30 s for 30 cycles, and final extension at 72 °C for 7 min. Primers used were *LMB3* (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') and *pHEN seq* (5'-CTA TGC GGC CCC ATT CA-3') for the whole scFv fragment. *LMB3* and *link seq new* (5'-CGA CCC GCC ACC GCC GCT G-3') were used to amplify the VH fragment, and *DPK9 FR1 seq* (5'-CAT CTG TAG GAG ACA GAG TC-3') and *pHEN seq*, to amplify the V_K fragment. PCR products were examined by electrophoresis on 2% agarose gel.

Phagemid DNA from the clones that presented a complete VH + V_K fragment was amplified with primers *LMB3* and *pHEN seq*, employing Velocity DNA Polymerase (Biolone, UK), with the following PCR program: 98 °C for 2 min, then, 98 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 15 s for 30 cycles, and final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were loaded in a 1.5% low melting agarose gel (Laboratorios Conda, Spain), containing Gel Red (Biotium, Hayward,

CA) in Tris acetate-EDTA buffer. DNA bands were purified with the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and sequenced at Parque Científico de Madrid (Spain).

Nucleotide sequences were compared using European Molecular Biology Open Software Suite (Emboss software), and then analyzed with IgBLAST to determine framework and complementary determining regions (CDR) of the VH and V_K chains. Amino acid sequences were deduced from the nucleotide sequences by Expasy website (www.expasy.org).

2.9. Monoclonal almond phage ELISA

The almond-phage ELISA was performed essentially as described in Section 2.7 with the following modifications: All protein extracts assayed (heterologous species, wheat flour/almond binary mixtures, and commercial samples) were prepared following the procedure described in Section 2.2., and they were diluted 1:200 in PBS. Multi-well plates were coated with 100 μL of the diluted extracts, and incubated at 4 °C overnight. Then, the plates were washed with PBS and the wells blocked with 0.1% gelatin at 37 °C for 1 h. Following another washing step, 100 μL of 1% ovalbumin in PBS, containing $3 \cdot 10^8$ PEG-NaCl precipitated phage particles of the selected almond-specific clone (PD1F6 or PD2C9) were added to each well. The plates were incubated at 37 °C with shaking for 1 h before being washed 3 times with PBS. The remaining steps were performed as described in Section 2.7. A standard curve of wheat flour/almond binary mixtures (100–0.01 mg g⁻¹) was included in each plate. A wheat flour protein extract was included as negative control in each plate. To avoid false positives, negative control wells were included for each sample analyzed, where the 1% ovalbumin did not contain phage particles, in order to check if proteins in the sample cross-reacted with the secondary antibody. Each sample was analyzed in triplicate.

2.10. Assay validation

The specificity of the assay was assessed by challenging the isolated clones to protein extracts obtained from different animal and plant species (Table 2), that had been previously diluted 1:200 in PBS. Each sample was analyzed in triplicate.

The limit of detection (LOD) was calculated following the guidelines of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Thompson, Ellison, & Wood, 2009), considering the minimum concentration of target protein that exhibits an absorbance value larger than the mean absorbance value of the blank (wells with PBS) plus 3 times the standard deviation (SD), after 20 experiments. The LOD for the binary mixtures of wheat flour matrix spiked with almond was also determined, but employing wells coated with wheat flour protein extract as blank.

Almond protein extract was tested in the concentration range from 0 to 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The concentration–response curve was obtained by plotting the absorbance values vs the protein concentration and the standard curve obtained for almond dilution was fitted to the four-parameter logistic equation using Origin 8.0 software (OriginLab Corp., USA):

$$y = (A - D) / \left[1 + (x/C)^B \right] + D,$$

where A is the maximum absorbance at infinite concentration, B is the curve slope at the inflection point, C is the x value at the inflexion point, and D is the minimum absorbance for no analyte (background signal).

Data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA and the Fisher's least significant difference (LSD) test ($p < 0.05$) using Statgraphics Centurion 15.2.14 (XV) (Statpoint Technologies, Inc., Warranton, VA).

To determine the effect of heat treatment on the isolated phage-scFvs' ability to identify heat treated almond protein, 70 g of ground almond were processed in an oven at 160 °C for 13 min, and 70 g were autoclaved for 15 min at 121 °C. Assays were performed in a similar way as for raw almond protein.

Additionally, a concentration–response curve was constructed employing binary mixtures of a wheat flour matrix spiked with decreasing concentrations of raw almonds that ranged from 100 mg g⁻¹ to 0.01 mg g⁻¹.

The applicability of the almond phage-ELISA was validated through the analysis of 92 commercial processed food products. Samples included breakfast cereals, ice cream, cookies, nut beverages, chocolate, or nutritional bars because those food types could contain, or might have been exposed to cross-contamination with almond. Furthermore, in order to confirm the results, samples were also analyzed by a real-time PCR method developed in our laboratory that employs almond specific primers and probe, and targets the ITS1 gene (López-Calleja et al., 2014).

3. Results and discussion

3.1. Libraries screening

Screening of phage display libraries is usually carried out employing purified molecules (Hoogenboom et al., 1998). If the desirable antigen is not commercially available, a secondary approach can be the purification of the target at laboratory-scale. However, plant proteins are products of multigene expression with many specific post translational modifications, hence purification is generally incomplete and time consuming. As we previously reported, isolation of a Brazil nut specific phage scFv was successfully achieved employing a complete Brazil nut protein extract as target (de la Cruz et al., 2013). Therefore, in order to isolate an almond-specific phage clone from the Tomlinson I phage display library, we decided to use a crude almond extract.

Enrichment of the phage display library in almond-binding clones through the different rounds of selection was tested in an indirect way by measuring the ratio between the input number of phage particles at the beginning of each experiment (which was maintained at 10¹² pfu mL⁻¹) and the number of phage particles recovered at the end. After the first round of selection, the number of phage particles recovered was 10⁵ pfu mL⁻¹, and after the second round this number increased to 2·10⁸ pfu mL⁻¹, which implies an increase in the output number of phage particles of about 2000 times after two rounds of affinity selection. This enhancement is in accordance with the expected enrichment of the phage display library with specific phage binders among selection rounds (Lee, Iorno, Sierro, & Christ, 2007). Thus, the results obtained indicated that the Tomlinson I library might be enriched with almond binding phages.

3.2. Polyclonal phage-ELISA

To confirm the suitability of the selection procedure, a polyclonal phage-ELISA was performed with phage pools from the naïve library, and from the first and the second rounds of panning. The observed results—higher absorbance values in wells coated with almond protein than wells coated with peanut protein when employing phages from the second round of selection—(Fig. 1) indicated that phage population that specifically recognized the almond protein had increased compared to the naïve library.

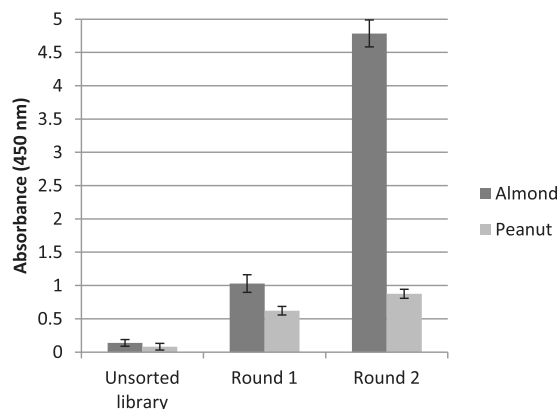


Fig. 1. Indirect phage-ELISA results obtained with polyclonal phages rescued at each round of selection against almond extract. Precipitated phages from each round of selection were analyzed by ELISA. Absorbance values are the mean of three independent determinations. Error bars show the standard deviation for each set of data.

According to this result, additional rounds of selection were not considered necessary.

3.3. Monoclonal phage-ELISA

To isolate and identify the scFvs recognizing almond protein, 150 *E. coli* TG1 colonies infected with phages coming from the second round of selection were randomly picked. A total of 32 out of 150 clones (21%) were selected for binding almond extract and not peanut extract used as negative control (absorbance values against almond/absorbance against negative control >4). Those 32 clones were selected for further analyses.

3.4. Sequence analysis of the positive clones

DNA from the 32 selected clones was amplified with *LMB3* and *pHEN seq* primers, and PCR products were analyzed in agarose gel in search for phage clones holding a complete VH and Vk insert (VH + Vk insert, approximately 935 bp). A total of 9 out of the 32 clones analyzed showed a band with the desirable size, and nucleotide sequencing revealed only six different sequences in the clones selected from the Tomlinson I library. One of them, finally named PD1F6, was shared by 4 clones, and the sequences obtained from the remaining 5 clones were all different. Deduced amino acid sequences of scFv from all clones, showing the CDRs and immunoglobulin framework regions (FRs), are illustrated in Fig. 2. After specificity analyses, the best clones, PD1F6 and PD2C9, were selected for an in-depth study.

3.5. Assay specificity and detection limit

Indirect phage ELISA assay using precipitated phage-antibody fragments from clones PD1F6 and PD2C9 was able to detect almond proteins from almond kernels belonging to all different cultivars analyzed (the average absorbance values in ELISA were 4.07 ± 0.36 for PD1F6 clone and 4.03 ± 0.39 for PD2C9 clone), therefore proving the capacity of the assay for detecting diverse almond varieties (Table 1). Absorbance values increased in a concentration-dependent manner, until reaching saturation levels. As heat processing can affect solubility and integrity of almond proteins (Sathe, Teuber, & Roux, 2005), the effect of heat treatment on the phage-ELISA results was tested. As it has been previously described (Venkatachalam, Teuber, Roux, & Sathe, 2002), a

| | | |
|-----|---|----------------|
| | H-CDR1 | H-CDR2 |
| 1F6 | QPGGSLRLSCAAS GFTTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSA ITSYGSDTY YADSVKGRFTISR | |
| 3G5 | QPGGSLRLSCAAS GFTTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSD INDTGSPTY FADSVKGRFTISR | |
| 2C9 | QPGGSLRLSCAAS GFTTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVST INNAGSSTC FADSVKGRFTISR | |
| 2G5 | QPGGSLRLSCAAS GFTTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSS ISDYGGGTN YADSVKGRFTISR | |
| 2E7 | QPGGSLRLSCAAS GFTTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSS ISDAGTSTN YADSVKGRFTISR | |
| 3C9 | QPGGSLRLSCAAS GFTTFSSYA MSWVRQAPGKGLGWVSC ISTCGYSTS YADSVKGGFTISR | |
| | H-CDR3 | Linker |
| 1F6 | DNSKNTLYLQMNSLRAEDTGVYY CAKSAYDFD YWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGG ST | |
| 3G5 | DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKYTSAFD YWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGG ST | |
| 2C9 | DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKDATTDF YWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGG ST | |
| 2G5 | DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKANGNFD YWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGG ST | |
| 2E7 | DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKYTSEFD YWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGG ST | |
| 3C9 | DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKTSSEFD YWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGG ST | |
| | L-CDR1 | L-CDR2 |
| 1F6 | DIQMTQSPSSLSASVGRVTTIT CRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLI YSASALQS GVPS | |
| 3G5 | DIQMTQSPSSLSASVGRVTTIT CRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLI YSASGLQS GVPS | |
| 2C9 | DIQMTQSPSSLSASVGRVTTIT CRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLI YAASLQS GVPS | |
| 2G5 | DIQMTQSPSSLSASVGRVTTIT CRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLI YAASYLQS GVPS | |
| 2E7 | DIQMTQSPSSLSASVGRVTTIT CRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLI YSASLQS GVPS | |
| 3C9 | DIQMTQSPSSLSASVGRVTTIT CRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLI YDASALQS GVPS | |
| | L-CDR3 | His-Tag |
| 1F6 | RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQGASDPT TFGQGTKVEIKRAAA HHHHHHGAA | |
| 3G5 | RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQAATPST TFGQGTKVEIKRAAA HHHHHHGAA | |
| 2C9 | RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQATNPNP TFGQGTKVEIKRAAA HHHHHHGAA | |
| 2G5 | RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSSTNPT TFGQGTKVEIKRAAA HHHHHHGAA | |
| 2E7 | RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQTAADPT TFGQGTKVEIKRAAA HHHHHHGAA | |
| 3C9 | RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYGANPS TFGQGTKVEIKRAAA HHHHHHGAA | |
| 1F6 | EQKLISEEDLNGAA- | |
| 3G5 | EQKLISEEDLNGAA- | |
| 2C9 | EQKLISEEDLNGAA- | |
| 2G5 | EQKLISEEDLNGAA- | |
| 2E7 | EQKLISEEDLNGAA- | |
| 3C9 | EQKLISEEDLIGAA- | |

Fig. 2. Amino acid sequences of the almond binding scFvs deduced from the nucleotide sequences by Expsy Web site. Positions of the respective complementary determining regions for the variable domains of heavy (H-CDR 1–3) and light (L-CDR 1–3) chains are indicated.

reduction on protein solubility was observed with the different treatments (protein concentration obtained from raw almond was 8.08 ± 0.82 mg/mL, from roasted almond was 1.45 ± 0.03 mg/mL and from autoclaved almond was 6.24 ± 0.43 mg/mL). However, the developed method still was able to detect heat treated almond proteins (Fig. 3). For PD1F6 clone, the lower concentration that could be reliably detected was of 40 ng mL⁻¹ for raw almond, of 70 ng mL⁻¹ for autoclaved almond, and of 100 ng mL⁻¹ for roasted almond, when protein extracts were diluted in PBS. For PD2C9 clones, the values were 90 ng mL⁻¹ for raw, 50 ng mL⁻¹ for autoclaved, and 250 ng mL⁻¹ for roasted almond.

Cross-reactivity assays using phage-antibodies PD1F6 and PD2C9 showed that none of the non-target protein extracts tested (Table 2) developed an absorbance signal higher than the LOD of almond proteins in PBS. Among the plant species analyzed, edible parts from different members of the *Prunoideae* subfamily (peach, apricot, plum and cherry) were included in order to discard undesirable cross-reactivity reactions due to the hypothetical presence of similar epitopes in these close-related species.

Food matrix components can interfere with the assay performance (Blais, Gaudreault, & Phillippe, 2003), so food matrix effect was included as another factor to consider in the assay. With that purpose, wheat flour was chosen as a representative matrix to mimic the effect of cereal-based products, and binary mixtures of wheat flour spiked with almond were analyzed. Under these conditions, the LOD achieved with the almond-ELISA was of 0.11 mg g⁻¹ (110 ppm) for clone PD1F6 and of 0.12 mg g⁻¹ (120 ppm) for clone PD2C9 (Fig. 4).

However, almond products can be constituted by a large number of food matrices that undergo a wide variety of food processes. Therefore, to quantify the amount of almond protein in a particular sample, it would be necessary to include a standard curve prepared with a food matrix as similar as the analyzed product as possible.

3.6. Determination of almond in commercial food products

The applicability of the indirect phage ELISA method developed for detection of almond proteins in foodstuffs was assessed through analysis of 92 commercial food products (Table 3) that contained or could contain almond in their composition. Among the samples analyzed, 17 were labeled as containing almond as ingredient, 17 labeled as “containing traces of almond”, 43 were labeled as “may contain traces of nuts” and the remaining 15 did not declare to contain any nuts. Almond protein was detected in 13 of the 17 processed foods that included almond in the ingredient list. Regarding the 4 samples that did not show positive results in ELISA, real-time PCR analysis supported negative results for the two chocolate samples, but amplified almond DNA from the two almond beverage samples. Lack of detection of almond protein or almond DNA in the chocolate samples might be due to a fraudulent substitution by other nuts, as real-time PCR is consistent with ELISA results. However, the absence of positive ELISA results in the beverage samples can be attributable to epitope denaturation during the UHT process. Almond milk is a colloidal dispersion obtained after the heat treatment of ground almonds with water. Mills, Jenkins, and Bannon (2003) argue that proteins will show an

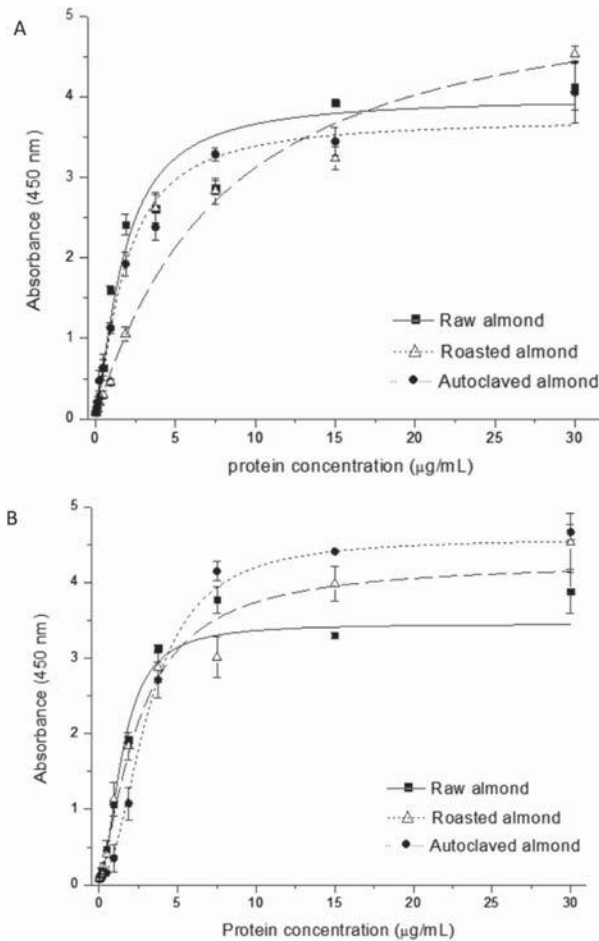


Fig. 3. Representative standard curves of the developed almond phage ELISA. Each curve shows the average value of six independent experiments and the standard deviation in each point of the curve. (A) Clone PD1F6 against dilutions of raw, roasted and autoclaved almond protein extracts. (B) Clone PD2C9 against dilutions of raw, roasted and autoclaved almond protein extracts (see Section 2.10 for details).

increase in thermostability when encountered in low-water systems such whole food matrices. Therefore, heating almond proteins in solution can enhance denaturation of proteins. To confirm that hypothesis, we heated the protein extracts at 100 °C for 1, 5 and 10 min, and we observed a lack of response in the ELISA after heating for 5 and 10 min. These results differ from those obtained when roasting or autoclaving ground or whole almond kernels, as the protein extracts obtained from the heat treated almonds were perfectly detected by the almond-specific phage-antibodies. Therefore, the presence of high water content during the thermal processing of the samples might have led to irreversible denaturation of the epitopes recognized by the phages. Dhakal et al., 2014 also found a reduction in immunoreactivity of an almond protein when heating samples at temperatures above 85 °C for 5 min.

Concerning the samples that declared traces of almond, just 1 out of 16 chocolates analyzed showed positive results, and the only biscuit sample analyzed was negative. Those results were supported by the real-time PCR. Frequently almond containing products are produced in factories along with other products non-containing almond. In such scenario, cross-contamination problems with allergens might happen, so companies prefer warning

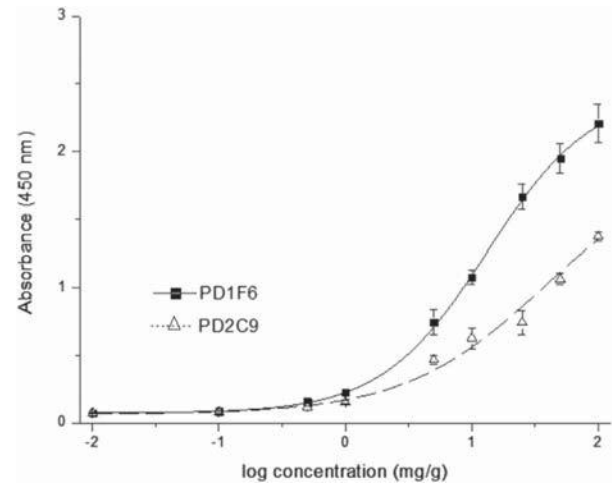


Fig. 4. Representative standard curves of the almond phage ELISA performed with protein extracts obtained from almond/wheat flour binary mixtures. Each curve shows the average value of six independent experiments and the standard deviation in each point of the curve.

allergic consumers against the possible presence of the allergen, even when the product actually would not contain almond. However, misuse of advisory labeling nullifies its objectives, because it might reduce the range of products available to allergic consumers, leading to dietary restriction, frustration and reckless behavior. Labeling alerts on possible cross-contamination with allergens is justifiable only on the basis of a risk analysis applied to a responsibly managed operation (Pérez, J. S. 2013). Therefore, it is still necessary to develop approaches for the application of advisory labeling.

Finally, in the products analyzed that declared to contain traces of tree nuts and also those that did not declare to contain nuts, we observed discrepancies in some samples between almond ELISA and real-time PCR results. However, it should be noted that the real-time PCR method is able to detect almond concentrations down to 0.1 ppm. In those products that were negative in ELISA but positive in real-time PCR, the C_p values obtained were above 35, that when substituted in the corresponding regression line (López-Calleja et al., 2014), means a concentration value of about 30 ppm, which is below the LOD achieved with the almond phage-ELISA (110 ppm).

Although the threshold dose for an allergen to elicit an allergic response varies within the allergen and the individual (Taylor et al., 2002), the general consensus is that an adequate food allergen detection method requires enough sensitivity to detect amounts of the target protein at levels as low as 1–100 ppm (Wensing et al., 2002). Thus the ELISA method developed in this work combines high specificity and easy-to-use methodology, and the LOD of detection achieved is in the upper limit of those considered appropriate to protect allergic consumers from undeclared almond in food products.

Almond detection assays published in literature mainly entail almond DNA identification by real-time PCR (Costa, Oliveira, & Mafra, 2013; Köppel et al., 2009; López-Calleja et al., 2014; Röder, Vieths, & Holzhauser, 2011) or protein detection by immunochemical methods (Acosta et al., 1999; Ben Rejeb et al., 2005; Hlywka et al., 2000; Su et al., 2013). Immunochemical methods developed to date have employed polyclonal or monoclonal antibodies raised in animals to report the presence of the target molecule. Some of these methods, in spite of demonstrating

Table 3
Determination of the presence of almond in various commercial processed food products using almond phage-ELISA and real-time PCR.

| Label statement | Product | Number of samples analyzed | Almond phage ELISA ^a | ITS real-time PCR ^a |
|--|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Almond declared as ingredient | nut bar | 4 | +(4) | +(4) |
| | breakfast cereals | 9 | +(9) | +(9) |
| | chocolate beverage | 2 | –(2) | –(2) |
| Contains traces of almonds | chocolate | 2 | –(2) | +(2) |
| | biscuit | 16 | +(1)/–(15) | +(1)/–(15) |
| | biscuit | 1 | –(1) | –(1) |
| May contain traces of tree nuts | biscuit | 11 | –(11) | +(3) ^b /–(8) |
| | food bar | 10 | –(10) | +(3) ^b /–(7) |
| | chocolate | 8 | Traces (2)/–(6) | +(4) ^b /–(4) |
| | sauce | 1 | –(1) | –(1) |
| | cashew butter | 1 | –(1) | –(1) |
| | bread | 3 | –(3) | +(3) ^b |
| | beverage | 3 | –(3) | +(2) ^b /–(1) |
| | breakfast cereal | 2 | –(2) | +(1) ^b /–(1) |
| | chocolate cream | 1 | Traces (1) | +(1) ^b |
| | precooked meal | 1 | –(1) | +(1) ^b |
| | ice cream | 2 | –(2) | +(1) ^b /–(1) |
| | chocolate beverage | 1 | –(1) | –(1) |
| | sesame bar | 3 | –(3) | +(2) ^b /–(1) |
| | ice cream | 1 | Traces (1) | +(1) ^b |
| | biscuit | 1 | –(1) | –(1) |
| chocolate cream | 4 | –(4) | –(4) | |
| bread | 1 | –(1) | –(1) | |
| Not declaring to contain nuts or traces | bread | 2 | –(2) | +(1) ^b /–(1) |
| | powdered infant cereals | 2 | –(2) | –(2) |

^a A plus (+) indicates absorbance values above the LOD (ELISA) or the presence of amplification after 50 cycles (real-time PCR), and a minus (–) indicates absorbance values lower than LOD or an absence of amplification after 50 cycles (real-time PCR).

^b Cp values >35, corresponding to almond concentration lower than 30 ppm.

adequate sensitivity, show cross-reactivity problems with several tree nuts and other ingredients (Ben Rejeb et al., 2005; Hlywka et al., 2000), immunoreactivity failure after heat treatments (Acosta et al., 1999), or the drawback of variability attributed to the nature of polyclonal antibodies employed at any stage of the ELISA. The main goal of the phage-ELISA developed herein is the use of recombinant antibody fragments isolated from a phage display library instead of traditional antibodies, taking into account the advantages of using bacterial expression systems, like speed and economy. However, unlike traditional antibodies, that undergo a natural affinity maturation process, recombinant antibody technology requires artificial affinity maturation to improve the affinity of the antibody candidate (Renaut et al., 2012).

The purpose of our research was to demonstrate that it was possible (1) to isolate a specific scFv against almond protein from a naïve commercial phage display library, (2) by employing a whole protein extract instead of a purified protein, (3) and that the isolated scFv could be employed in an ELISA to detect almond protein when displayed fused to the PIII protein of a filamentous phage. The selected phage antibodies are highly specific for detection of almond in food products, and as a stable biological reagent, their sensitivity can be further improved by affinity maturation. Furthermore, the scFv can be genetically engineered with a large diversity of expression tags such as enzymes and fluorescent probes that could be used in a myriad of assay formats.

Acknowledgments

This study was supported by Grant No. AGL 2010-15279 from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain, and the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (Spain). Silvia de la Cruz Ares is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain (AP2010-0028).

References

- Acosta, M. R., Roux, K. H., Teuber, S. S., & Sathe, S. K. (1999). Production and characterization of rabbit polyclonal antibodies to almond (*Prunus dulcis* L.) major storage protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4053–4059.
- Ben Rejeb, S., Abbott, M., Davies, D., Cléroux, C., & Delahaut, P. (2005). Multi-allergen screening immunoassay for the detection of protein markers of peanut and four tree nuts in chocolate. *Food Additives and Contaminants*, 22, 709–715.
- Blais, B. W., Gaudreault, M., & Phillippe, L. M. (2003). Multiplex enzyme immunoassay system for the simultaneous detection of multiple allergens in foods. *Food Control*, 14, 43–47.
- Boulter-Bitzer, J. I., Lee, H., & Trevors, J. T. (2009). Single chain variable fragment antibodies selected by phage display against the sporozoite surface antigen S16 of *Cryptosporidium parvum*. *Experimental Parasitology*, 125, 124–129.
- Bratkovi  , T. (2010). Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 749–767.
- Clementi, N., Mancini, N., Solforosi, L., Castelli, M., Clementi, M., & Burioni, R. (2012). Phage display-based strategies for cloning and optimization of monoclonal antibodies directed against human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 8273–8292.
- Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I., & Oliveira, M. B. P. P. (2012). Almond allergens: molecular characterization, detection, and clinical relevance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1337–1349.
- Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2013). Novel approach based on single-tube nested real-time PCR to detect almond allergens in foods. *Food Research International*, 51, 228–235.
- de la Cruz, S., López-Calleja, I. M., Alcocer, M., González, I., Martín, R., & García, T. (2013). Selection of recombinant antibodies by phage display technology and application for detection of allergenic Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10310–10319.
- Dhakal, S., Liu, C., Zhang, Y., Roux, K. H., Sathe, S. K., & Balasubramaniam, V. M. (2014). Effect of high pressure processing on the immunoreactivity of almond milk. *Food Research International*, 62, 215–222.
- European Parliament and Council. (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, L 276, 33–79.
- European Parliament and Council. (2011). Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004. *Official Journal of the European Union*, L 304, 18–63.
- Garet, E., Cabado, A. G., Vieites, J. M., & González-Fernández, A. (2010). Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: Palytoxin. *Toxicology*, 55, 1519–1526.
- Hlywka, J. J., Hefle, S. L., & Taylor, S. L. (2000). A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of almonds in foods. *Journal of Food Protection*, 63, 252–257.
- Hoogenboom, H. R., de Bruine, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W., & Roovers, R. C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, 4, 1–20.
- Jenkins, D. J. A., Hu, F. B., Tapsell, L. C., Josse, A. R., & Kendall, C. W. C. (2008). Possible benefit of nuts in type 2 diabetes. *The Journal of Nutrition*, 138, 1752S–1756S.
- Kamil, A., & Chen, C. Y. O. (2012). Health benefits of almonds beyond cholesterol reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6694–6702.
- Kendall, C. W. C., Josse, A. R., Esfahani, A., & Jenkins, D. J. A. (2010). Nuts, metabolic syndrome and diabetes. *The British Journal of Nutrition*, 104, 465–473.
- Köppel, R., Dvorak, V., Zimmerli, F., Breitenmoser, A., Eugster, A., & Waiblinger, H. U. (2009). Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *European Food Research and Technology*, 230, 367–374.
- Lau, T. L. T. (2014). Molecular testing for food allergens. In G. Siragakis, & D. Kizis (Eds.), *Food allergen testing: Molecular, immunochemical and chromatographic techniques* (pp. 29–48). Wiley Blackwell.
- Lauer, B., Ottleben, I., Jacobsen, H. J., & Reinard, T. (2005). Production of a single-chain variable fragment antibody against fumonisin B1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 899–904.

- Lavilla, M., Marzo, I., de Luis, R., Perez, M. D., Calvo, M., & Sánchez, L. (2010). Detection of *Clostridium tyrobutyricum* spores using polyclonal antibodies and flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 488–498.
- Lee, C. M. Y., Iorno, N., Sierro, F., & Christ, D. (2007). Selection of human antibody fragments by phage display. *Nature Protocols*, 2, 3001–3008.
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., Pegels, N., González, I., Martín, R., & García, T. (2014). Sensitive and specific detection of almond (*Prunus dulcis*) in commercial food products by real-time PCR. *LWT – Food Science and Technology*, 56, 31–39.
- Mandalari, G., Nueno-Palop, C., Bisignano, G., Wickham, M. S. J., & Narbad, A. (2008). Potential prebiotic properties of almond (*Amygdalus communis* L.) seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4264–4270.
- Menendez, A., & Scott, J. K. (2005). The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Analytical Biochemistry*, 336, 145–157.
- Mills, E. N. C., Jenkins, J. A., & Bannon, G. A. (2003). Plant seed globulin allergens. In E. N. C. Mills, & P. R. Shewry (Eds.), *Plant food allergens* (pp. 141–157). UK: Wiley Blackwell.
- Pérez, J. S. (2013). Guidance on food allergen management for food manufacturers. http://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/press-releases_documents/temp_file_final_allergen_a4_web1.pdf.
- Poms, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21, 1–31.
- Regulations Amending the Food and Drug Regulations (1220-Enhanced for Food Allergen and Gluten Sources and Added Sulphites). (2011). SOR/2011-28, February 4. Canada Gazette Part II, 145, 324–330.
- Renaut, L., Monnet, C., Dubreuil, O., Zaki, O., Crozet, F., Bouayadi, K., et al. (2012). Affinity maturation of antibodies: optimized methods to generate high-quality scFv libraries and isolate IgG candidates by high-throughput screening. In P. Chames (Ed.), *Antibody engineering* (pp. 451–461). Humana Press.
- Röder, M., Vieths, S., & Holzhauser, T. (2011). Sensitive and specific detection of potentially allergenic almond (*Prunus dulcis*) in complex food matrices by Taqman[®] real-time polymerase chain reaction in comparison to commercially available protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytica Chimica Acta*, 685, 74–83.
- Sathe, S. K., Teuber, S. S., & Roux, K. H. (2005). Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnology Advances*, 23, 423–429.
- Sorokulova, I. B., Olsen, E. V., Chen, I. H., Fiebor, B., Barbaree, J. M., Vodyanoy, V. J., et al. (2005). Landscape phage probes for *Salmonella typhimurium*. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 55–72.
- Su, M., Venkatachalam, M., Liu, C., Zhang, Y., Roux, K. H., & Sathe, S. K. (2013). A murine monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for almond (*Prunus dulcis* L.) detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10823–10833.
- Taylor, S. L., Hefle, S. L., Bindslev-Jensen, C., Bock, S. A., Burks, A. W., Christie, L., et al. (2002). Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109, 24–30.
- Teuber, S. S., Comstock, S. S., Sathe, S. K., & Roux, K. H. (2003). Tree nut allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 3, 54–61.
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2009). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74, 835–855.
- Venkatachalam, M., Teuber, S. S., Roux, K. H., & Sathe, S. K. (2002). Effects of roasting, blanching, autoclaving, and microwave heating on antigenicity of almond (*Prunus dulcis* L.) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3544–3548.
- Wensing, M., Penninks, A. H., Hefle, S. L., Koppelman, S. J., Buijnzeel-Koopen, C. A. F. M., & Knulst, A. C. (2002). The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110, 915–920.

CAPÍTULO 7

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN DE FAGO-ANTICUERPOS RECOMBINANTES (scFv) ESPECÍFICOS OBTENIDOS FRENTE A EXTRACTOS PROTEICOS DE NUEZ DE BRASIL Y DE ALMENDRA

CHAPTER 7

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE PROTEINS BOUND BY SPECIFIC PHAGE-DISPLAYED RECOMBINANT ANTIBODIES (scFv) OBTAINED AGAINST BRAZIL NUT AND ALMOND EXTRACTS

Manuscrito enviado al *Journal of the Science of Food and Agriculture* para su evaluación

ABSTRACT

BACKGROUND: Almonds and Brazil nuts are widely consumed allergenic nuts whose presence must be declared according to food labelling regulations. Their detection in food products has been achieved by ELISA methods with recombinant antibodies (scFv) isolated against complete Brazil nut and almond protein extracts. The screening of phage-scFv libraries against complete protein extracts confers a series of advantages over the use of purified proteins, as recombinant proteins might alter their native folding. However, using this strategy, the nature of the target detected by phage-displayed antibodies remains unknown.

RESULTS: Electrophoretic, chromatographic, immunological and spectrometric techniques revealed that the Brazil nut (BE95) and almond (PD1F6 and PD2C9) specific phage-scFvs detected conformational epitopes of the Brazil nut and almond 11S globulins, recognized by WHO/IUIS as Ber e 2 and Pru du 6 major allergens. Circular dichroism data indicated that severe heat treatment would entail loss of epitope structure, disabling scFv for target detection.

CONCLUSIONS: The presence of important Brazil nut and almond allergens (Ber e 2 and Pru du 6) in foodstuffs can be determined by using phage-display antibodies BE95, PD1F6 and PD2C9 as affinity probes in ELISA.

KEYWORDS

11S globulin, amandin, almond, Brazil nut, scFv.

INTRODUCTION

Food allergy has become a serious public health problem in developed countries, with an estimated prevalence of 3% when considering data from food challenges studies from Europe, USA and Australia/New Zealand.¹ Food allergy involves an abnormal immune response to food proteins, triggering the production of specific type E immunoglobulins (IgE) against the allergens. Currently, the only reliable method for preventing food allergic reactions is the total avoidance of the offending food. In this sense, many countries have approved regulations enforcing the declaration of food allergens in foodstuffs. As an example, European Regulation No 1169/2011 provides a list of mandatory particulars to be indicated on the label, which comprises 14 products causing allergies or intolerances: cereals containing gluten, crustaceans, eggs, fish, peanuts, soybeans, milk,

tree nuts, celery, mustard, sesame, sulphur dioxide and sulphites, lupine and molluscs.

Due to their organoleptic properties and allegedly health benefits, Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) and almond (*Prunus dulcis*) are extensively incorporated in food products, so high population exposure is observed.²⁻⁴

Therefore, in order to meet legal requirements, food industries and official regulatory agencies need sensitive and accurate techniques that could provide information of the presence of tree nuts in food products. ELISA, the enzyme-linked immunosorbent assay, takes advantage of antibodies that specifically recognize and bind a particular antigen, which can be either a marker protein or the allergen itself.^{5,6} Traditionally, those specific antibodies have been raised in animals.⁷⁻⁹ However, there is a tendency towards the

replacement of antibodies raised in animals with antibodies synthesized *in vitro*, products of synthetic libraries.¹⁰⁻¹² Filamentous bacteriophage libraries that display antibody fragments fused to one of the phage coat proteins have been successfully used for this purpose.^{13,14}

In two previous works,^{15,16} we reported the isolation of a specific scFv against Brazil nut (named BE95) and two specific scFv against almond (named PD1F6 and PD2C9) from the commercial phage library Tomlinson I, using crude protein extracts from Brazil nut or almond as targets to perform the selection procedure. Those phage-clones were successfully used in indirect phage-ELISA to detect the presence of Brazil nut and almond in commercial food products. However, as library screenings were performed employing a whole nut protein extract, the identity of the targets still remains unknown. Hence, the main objective of this work was to identify and characterise the specific protein or proteins from the tree nut extracts detected by each of the scFv antibodies.

MATERIALS AND METHODS

Materials and Chemicals

Phage clones BE95, PD1F6 and PD2C9 employed to detect Brazil nut and almond proteins were isolated from Tomlinson I library (Source BioSciences, Nottingham, UK) after two rounds of *biopanning*, in two independent experiments, as described elsewhere.^{15,16}

Brazil nut and almond (Marcona cultivar) kernels were acquired from a local retailer in Madrid (Spain). After being shelled separately to avoid cross-contamination, they were stored at -20 °C until further use.

All chemicals used in this work were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

Preparation of protein extracts

To prepare protein extracts, shelled kernels maintaining the testa were ground to a fine powder using a mortar and pestle, and stored in screw-capped vials at -20 °C until further use. Protein from 2 g of ground Brazil nut or almond was extracted with 20 mL of extraction buffer (0.035 M phosphate buffer containing 1 M NaCl, pH 7.5), by shaking for 1 h at 25 °C in a vertical rotator (HulaMixer Sample Mixer, Life Technologies, Carlsbad, CA). The slurry obtained was centrifuged at 10 000 g for 30 min at 4 °C, and supernatant was filtered through a 0.20 µm syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany). Protein content was measured with the bicinchoninic acid (BCA) assay (Thermo Fisher Scientific Inc.) employing bovine serum albumin (BSA) as the standard protein. Aliquots of the protein extracts were kept at -20 °C until used.

To assess that phage clones were indeed recognizing proteins and not any other component of the extract, when mentioned, a digestion with two different proteases was performed. Proteinase K treatment was carried out by adding 400 µg of enzyme to 500 µL of a 50 µg mL⁻¹ protein extract, and incubating for 1 h at 37 °C. Trypsin digestion was performed by adding 500 µg of enzyme to 450 µL of a 50 µg mL⁻¹ protein extract, and incubating for 30 min at 37 °C. Both reactions were stopped by adding a protease inhibitor cocktail (Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail, Thermo Scientific), following manufactures' instructions.

SDS-PAGE and western blotting analysis

SDS-PAGE was performed using precast polyacrylamide gels (4-20 % Mini-Protean TGX Gel, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Electrophoresis was run at constant voltage (150 V) using a Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) until tracking dye reached the bottom of the gel. Discontinuous native

PAGE electrophoresis was performed according to Ornstein (1964),¹⁷ preparing an 8 % resolving gel, pH 8.8, with a 4 % stacking gel, pH 6.8. Continuous native PAGE electrophoresis was performed according to McLellan (1982),¹⁸ with a 6 % gel, pH 7.4. When required, after electrophoresis, half of the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and the other half was transferred for western blotting analysis into a methanol-activated polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immun-Blot PVDF membranes, Bio-Rad) using a Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Running conditions were performed at 400 mA for 1 h, using a transfer buffer containing 25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glycine, and 20 % methanol. After transferring the proteins, the membrane was blocked with 5 % (w/v) dry skimmed milk (Central Lechera Asturiana, Spain) in PBS (0.01 M phosphate buffer, 0.0027 M potassium chloride, 0.137 M sodium chloride, pH 7.4) for 1 h at 37 °C. Then, the membrane was washed 3 times with PBS, and incubated with approximately $5 \cdot 10^7$ phage particles in 5 % (w/v) dry skimmed milk in PBS overnight at 4 °C. Next day, membrane was washed 3 times with PBS, and incubated with a 1:5000 dilution of HRP/anti-M13 monoclonal mouse antibody (GE Healthcare, München, Germany) in 5 % skimmed milk, for 1 h at room temperature. After washing 3 times with PBS, the membrane was incubated with a chemiluminescent substrate (Clarity western ECL, Bio-Rad) at room temperature for 5 min, to visualize bands. Commassie stained gels and western blotting membranes were scanned using a ChemiDoc XRS system (Bio-Rad).

Size-exclusion chromatography

Size-exclusion chromatography separation was carried out in a fast protein liquid chromatography (FPLC) system (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden). Protein extract (1 mL) of Brazil nut, prepared as described before, was injected into a HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR column (GE, Healthcarre UK

Ltd., Buckinghamshire, UK) previously equilibrated with extraction buffer. The flow rate was maintained at 1 mL min^{-1} . Eluted fractions were collected in 1.5 mL tubes and stored at -20 °C until further use. To assess the ability of the scFv to recognize different peaks, protein fractions coming from size-exclusion chromatography were analysed by an indirect-phage ELISA using BE95 phage clone.

Indirect phage-ELISA

Flat-bottom polystyrene 96-multiwell plates (F96 MaxiSorp Nunc immunoplates, Nunc, Denmark) were coated with 100 μL of a 1:5 (v/v) dilution in PBS of each of the different chromatographic peaks, and plates were incubated overnight at 4 °C. Next day, plates were washed 3 times, and blocked with 1% ovalbumin in PBS for 1 h at 37 °C. After 3 washes, 100 μL of 1 % ovalbumin in PBS containing $\sim 3 \cdot 10^8$ phage particles were added to each well. After 1 h of incubation at room temperature, plates were washed 10 times. One hundred microliters of a 1:5000 dilution of HRP/anti-M13 monoclonal mouse antibody in 1% ovalbumin was added, and plates were incubated at room temperature for an extra hour. Finally, plates were washed 5 times, and 100 μL of tetramethylbenzidine substrate solution was added to each well. Colour development was performed in the dark for 10 min at room temperature, before stopping the reaction with 1 M sulphuric acid. OD_{450} was measured in an iEMS Reader MF (Labsystems, Helsinki, Finland). All washing steps were performed with PBS.

Anion exchange chromatography of amandin

Almond soluble proteins for anion exchange chromatography were obtained from 1 g of ground almond dispersed in 10 mL of ultrapure H_2O (Milli-Q, Merck Millipore, MA, USA). The mixture was shaken in a vertical rotator for 1 h at room temperature. The sample was centrifuged at 10

000 g for 30 min, and the supernatant was filtered through a 0.20 μm syringe filter. Chromatography was performed in an ÄKTA purifier FPLC system (GE Healthcare, Sweden) following the procedure described in Albillos et al., 2008,¹⁹ with some modifications. Briefly, 1 mL of protein extract was diluted in 10 mL of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.9, and loaded onto a 1 mL Mono Q HR 5/5 anion exchange column (GE Healthcare) previously equilibrated with Tris-HCl buffer. Sample was eluted with Tris-HCl and a gradient of 0-0.3 M NaCl over 20 minutes. Fractions corresponding to different peaks were collected and analysed by indirect phage-ELISA and SDS-PAGE followed by immunoblot.

Analytical Ultracentrifugation

Chromatographic peaks containing the protein of interest were dialyzed against 10 mM phosphate buffer with 2.7 mM KCl and 40 mM NaCl, pH 7.4, and concentrated using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck Millipore, Darmstadt, Germany.) with a nominal molecular weight limit of 10 kDa.

Sedimentation velocity experiments were carried out at 45 000 rpm in an Optima XL-A analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA), using an AN50Ti rotor and standard cells with double-sector epon-charcoal centrepieces. Measurements were performed at 20 °C with 400 μL of sample at protein concentrations of 314 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for amandin and 37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for Ber e 2. Differential sedimentation coefficients were calculated by least-squares boundary modeling of the experimental data and corrected to $s_{20,w}$ values with the program SEDFIT,²⁰ using a partial specific volume of 0.73 mL g^{-1} . Solvent density and viscosity at 20 °C were computed using the SEDNTERP program.²¹ The experiments were performed at Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid (Spain).

Peptide identification

Electrophoresis gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Gel bands of interest were cut out with a scalpel and immersed in 5 % acetic acid solution. Peptide mass fingerprinting was performed using a 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyser mass spectrometer (AB SCIEX, MA, USA), at the Unidad de Proteómica, Universidad Complutense de Madrid (Spain). Mascot search engine software (<http://www.matrixscience.com>) was employed to interpret mass spectra data into protein identities using the SwissProt database. Search parameters employed were: trypsin enzymatic cleavage, one possible missed cleavage allowed; peptide mass tolerance of ± 80 ppm; fragment mass tolerance of ± 0.3 Da; peptides were assumed to be monoisotopic; carbamidomethyl fixed modification; and methionine oxidation variable modification.

Circular dichroism

Circular dichroism (CD) spectra were recorded with a Jasco-810 spectropolarimeter (JASCO Ltd, Spain) equipped with a Peltier temperature controller using a bandwidth of 1 nm and a response time of 4 s. Measurements were performed at pH 7.4, in 10 mM phosphate buffer using protein samples at 0.8 DO_{280} (near-UV region) and 0.4 DO_{286} (near- and far-UV regions) for amandin, and 0.12 DO_{280} for Ber e 2. Collected spectra were the average of three accumulations and buffer baseline was subtracted. Thermal denaturation was monitored by registering the spectrum as the temperature was raised from 20 to 97 °C for amandin and from 25 to 85 °C for Ber e 2, at a rate of 1 °C min^{-1} , and following the ellipticity change at 283 nm at steps of 0.2 °C. The non-linear fitting of the thermal denaturation profile of amandin to a sigmoidal function was performed using the Origin 8.0 software (OriginLab Corp.). Experiments were performed at the Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid (Spain).

RESULTS AND DISCUSSION

Seed storage proteins can represent up to 50 % of the total amount of proteins in nuts. 11S globulins (legumin-like proteins), 7S globulins (vicilin-like proteins) and 2S albumins are seed storage proteins able to elicit allergic responses in sensitized individuals.²² In particular, Brazil nut 2S sulphur-rich seed storage albumin (Ber e 1), 11S globulin (Ber e 2) and almond 11S globulin (amandin, Pru du 6), are recognized as major allergens by the World Health Organization and International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS). Other major tree nuts allergens from the profilin, pathogenesis-related, and IgE binding families have also been described.²²⁻²⁶

Phage-scFv clones PD1F6 and PD2C9 detected specifically almond proteins when used in indirect phage-ELISA assays, achieving a detection limit (LOD) of 110-120 mg kg⁻¹, whereas phage-scFv clone BE95 was able to specifically detect Brazil nut proteins with a LOD of 5000 mg kg⁻¹. Furthermore, almond and Brazil nut specific phage scFv were able to detect their target proteins when assaying commercial food products that declared the offending food in the label.^{15,16}

In order to characterise the specific protein or proteins recognized by each of the scFv antibodies, a SDS-PAGE in denaturing conditions of almond and Brazil nut protein extracts was performed (**Figure 1A**). In the case of almond, the most prominent bands had a molecular weight of ~40, ~45 kDa, and ~20, ~22 kDa, which according to Sathe et al. (2002) correspond to the complex heterohexameric 11S seed storage protein (also known as amandin or Pru du 6).²⁷ On the other hand, Brazil nut electrophoretic profile exhibited multiple bands, with molecular weights of the most prominent ones being of ~35, ~20 and ~18 kDa. According to Sun et al., 1987, those bands correspond to the 11S complex protein fraction (Ber e 2), which possesses six major polypeptides

ranging from ~24 to ~32 kDa.²⁸ Sharma et al. (2010) also described Ber e 2 as being composed of two major types of polypeptides: a ~30-32 kDa (acidic subunit) and a ~20-21 kDa (basic subunit), both linked by a disulfide bond.²⁹

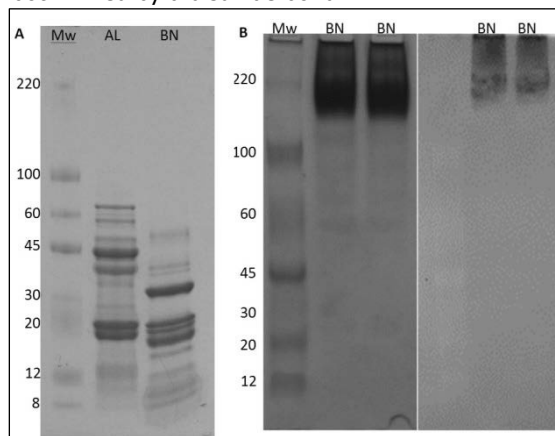


Figure 1. (A) SDS-PAGE electrophoresis (under reducing conditions) of almond and Brazil nut protein extracts. Mw: protein marker; AL: almond protein extract; BN: Brazil nut protein extract. Molecular mass of standards is indicated in the left margin of the figure. (B) (Left) Non-denaturing, continuous buffer system- electrophoresis of Brazil nut protein extracts. (Right) Western-blotting results of PVDF membrane probed with BE95 phage-clone.

The ability of phage clones BE95, PD1F6 and PD2C9 to recognize SDS-PAGE separated proteins was assessed by immunoblotting. However, after many attempts of performing the western blotting assay, no binding of the phage scFv to any of the nut proteins was observed under SDS-denaturing conditions. These results support the idea that phage clones express scFv that might recognize conformational epitopes. Recognition of conformational epitopes depends on preservation of tertiary structure of the protein, which is destroyed under the denaturing conditions employed during the SDS-PAGE. However, it is also possible that the phage-scFv used in the present work, selected against a whole protein extract, might recognize targets other than proteins.³⁰⁻³² Hence, electrophoresis and western blotting of Brazil nut and almond whole extracts were performed in non-denaturing conditions, following the procedure described in Ornstein (1964),¹⁷ which employs a discontinuous buffer system. Once the proteins were transferred to the membrane and incubated with the appropriate scFv clone, a smear

of chemiluminescence was observed in lanes loaded with almond protein and incubated with phage clones PD1F6 and PD2C9, indicating that those phage clones might recognize proteins products isolated from almond (data not shown). Using the same procedure, no positive signal was obtained for Brazil nut proteins after incubation with BE95 phage clone. A continuous buffer system was then used for the non-denaturing separation of proteins from Brazil nut extract. As the target protein could be affected by pH, gel and running buffer were adjusted to pH 7.4, similar to PBS used to prepare dilutions during the ELISA assay. Using this method, the smeared bands shown in **Figure 1B** were obtained. These results suggested that phage clones might indeed recognize a conformational epitope that suffered denaturation during the SDS-PAGE procedure. In order to confirm whether BE95 phage-scFv clone detected a protein or any other component of the nut, Brazil nut protein extracts were also digested with proteases (trypsin and proteinase K), or thermally treated at 95 °C for 10 min, and extracts were used to coat ELISA plates. No phage binding appeared in either protease treated extracts or boiled extracts assayed by ELISA (**Figure 2**). These results further confirmed that proteins were the main targets of BE95 phage. Although non-denaturing western blotting conditions produced some binding results, the lack of resolution of the technique did not allow the identification of the target proteins.

As thermal treatment of protein extracts seemed to affect the ability of phage clones to recognize target proteins, a second approach entailing the repetition of SDS-PAGE under milder conditions (*i.e.* without boiling sample buffer) followed by western blotting analysis was carried out. Under these conditions, almond-phage clones were able to recognize a protein band larger than 150 kDa, which according to the molecular size might correspond to amandin. The same strategy was

repeated for Brazil nut protein extract and BE95

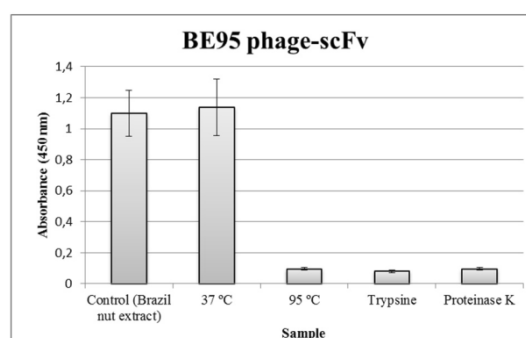


Figure 2. Indirect phage-ELISA results obtained from Brazil nut digested with proteases and thermally treated.

phage-clone, without any positive binding results.

Immunoreactivity of Brazil nut protein fractions obtained by size-exclusion chromatography

Size-exclusion chromatography of the Brazil nut protein extract resulted in a 280 nm profile with 3 major peaks (A, B, and F) and 4 smaller ones (C, D, E and G) (**Figure 3A**). ELISA analysis of samples from the eluted fractions showed that phage-scFv antibody BE95 recognizes one of the proteins integrating peaks A and B (data not shown). Therefore, to increase the resolution of chromatographic separation, 1 mL of fraction B was loaded again onto the size-exclusion column. This time, the obtained chromatogram exhibited two separate peaks (**Figure 3A inset**), whose fractions were again subjected to ELISA. **Figure 3B** shows that BE95 clone was able to recognize mainly the components from the first peak, experiencing a gradual decrease in immunoreactivity with components belonging to the second peak. Coomassie staining of the SDS-PAGE gel was not sensitive enough to detect the proteins present in fractions 5 and 10 coming from the second round of size-exclusion chromatography (**Figure 3C**). Nevertheless, the lane loaded with peak B from the first round of size-exclusion chromatography showed 4 major bands, of ~32, ~22, ~20 and ~15 kDa. As the first peak comprises the largest molecular weight proteins, results seem to suggest

that Brazil nut phage clones was binding to 11S globulins. 11S storage proteins are complex multimeric proteins, existing as trimers and hexamers, held together by non-covalent interactions that in some seeds represent over

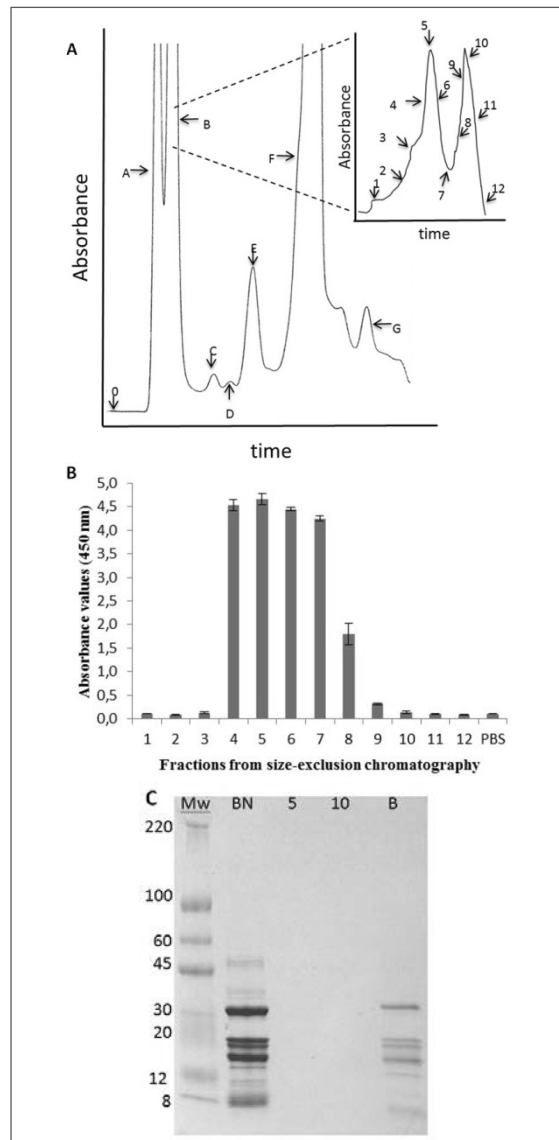


Figure 3. Size-exclusion fractionation of Brazil nut proteins. **(A)** Chromatographic profile of Brazil nut protein extract. (Inset) Size-exclusion fractionation of peak B. **(B)** Indirect phage-ELISA results performed with different fractions eluted from peak B. **(C)** SDS-PAGE electrophoresis (under reducing condition) of fractions obtained from peak B. Mw: protein marker; BN: Brazil nut extract; 5 and 10: peaks eluted in size-exclusion fractionation of fraction B; B: sample of the fraction loaded into the column. Molecular mass of each standard (kDa) is indicated in the left margin of the inset.

50 % of the total protein.³³ They comprise of acidic (30- 40 kDa) and basic (20 kDa) polypeptide chains linked by a single intermolecular disulfide bond.²⁷ Furthermore, estimated molecular masses of

polypeptides comprising 11S globulin from Brazil nut are consistent with earlier findings.^{28,29}

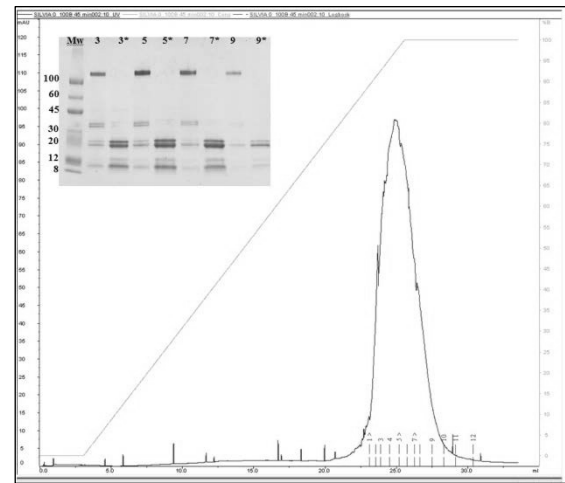


Figure 4. Ion exchange chromatography profile of amandin (almond 11S globulin). (Inset) SDS-PAGE electrophoresis (under reducing conditions) of fractions eluted off the column. Mw: protein marker; 3, 5, 7, 9: different eluted fractions. The molecular mass of each standard (kDa) is indicated in the left margin of the inset. *Samples heated for 10 min at 95 °C in the presence of sample buffer.

Ion exchange chromatography separation of amandin

In order to confirm whether almond 11S storage protein was indeed the major target for PD1F6 and PD2C9 phage antibodies, an ion exchange chromatography procedure for the purification of amandin was carried out, which resulted in a chromatographic profile with a single peak (**Figure 4**). The purity of the protein was confirmed by SDS-PAGE analysis of peak fractions 3, 5, 7 and 9. In order to prove whether this protein peak was indeed a complex multimeric protein, each fraction was diluted in sample buffer and half of the volume was boiled for 10 min at 95 °C, while the other half was directly loaded onto a gel. **Figure 4 (inset)** shows that in non-heated samples, a large band with a molecular weight higher than 150 kDa, and also two bands somewhat above 30 kDa appeared. These bands were not present when the protein samples were heated. In non-boiled samples, fainter bands with molecular weights around 20kDa and 10-12 kDa were also present, but their intensity greatly increased in heated samples. These results suggest that the bands above 30 kDa are associated forms

of the smaller components. Interestingly, as it was evident that a large multimeric protein can be obtained with SDS buffer under milder conditions, the western blotting analysis was then repeated. In those conditions, phage clones PD1F6 (**Figure 5**) and PD2C9 (data not shown) were able to recognize the largest molecular weight protein band from almond total protein extract, and also from the purified amandin.

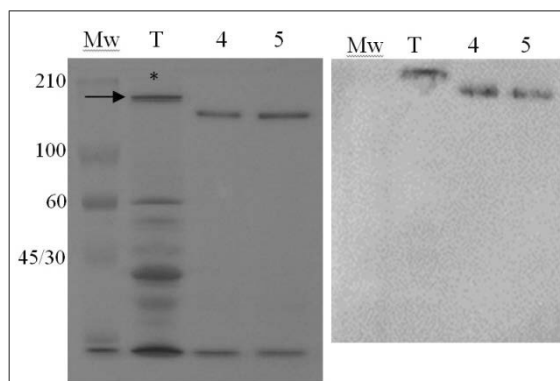


Figure 5. Western blotting analysis results for almond proteins. (Left) SDS-PAGE electrophoresis (8% monomer acrylamide/bis resolving gel). Mw: protein marker; T: total almond protein extract; 4-5: fractions from ion exchange chromatography. The molecular mass of each standard (kDa) is indicated in the left margin of the figure. (Right) PVDF membrane probed with PD1F6 phage-clone. PD2C9 phage clone showed the same behaviour (data not shown). Selected band was excised and analysed by MALDI TOF/TOF.

Analytical Ultracentrifugation

To further characterize the degree of purification and quaternary structure of the amandin isolated by ion exchange chromatography, and the Brazil nut 11S globulin isolated by size exclusion chromatography, sedimentation velocity experiments were performed. On the basis of ultracentrifugation studies, Brazil nut seed storage proteins have been reported to be composed of 11S legumin (also known as excelsin or Ber e 2; the most abundant), 2S albumin and 7S vicilin.²⁸ In almond, four fractions of 2S, 9S, 14S and 19S have been identified, being 14S amandin the major component.³⁴ As shown in **Figure 6A**, the distribution of the sedimentation coefficients of amandin displays a single peak with a $s_{20,w}$ of 13.3

S, a value intermediate between those of 13.0 and 14 S previously reported for the amandin hexamer.³⁴ In contrast, the globulin isolated from Brazil nut shows a major, symmetric peak ($\sim 85\%$) at 11.95 S (**Figure 6B**), which agrees with the $s_{20,w}$ values (11.6 - 11.8 S) reported for the hexamer of excelsin,^{35,36} and two minor components at 7.30 S (11.5%) and 4.88 S (3.4%), the former of which might correspond to the trimeric form of excelsin or to a minor fraction of the 7S vicilin, for which a sedimentation coefficient of 7.1 has been reported.²⁹

Peptide identification

To identify almond proteins isolated thus far, 8 electrophoretic bands were excised and trypsinized to be identified by MALDI-TOF/TOF (**Figure 7A**). As shown in **Table 1**, all bands were identified as different isoforms of the 11S seed storage protein (amandin, Pru du 6). Up to date, two isoforms of amandin have been identified: Pru du 6.01 (prunin-1, Pru1) and Pru du 6.02 (prunin-2, Pru2). These isoforms share 64% amino acid sequence identity and 77% similarity. Amandin isoforms are each composed of two polypeptides, a large 40 kDa acidic α -chain and a small 20 kDa basic β -chain, which are linked by a disulfide bond. SDS-PAGE analysis of amandin shows the presence of double bands at ~ 35 - 43 kDa, which indicate the presence of different post-translationally processed N-terminal domains. In its native state, amandin is a hexamer, with a molecular weight of 427.3 ± 47.6 kDa.^{27,37,38} Amandin has also shown to be the major allergen recognized by IgE from almond-allergic patients.^{27,39} Interestingly, although the two isoforms have been cloned and expressed, not all sera from allergic patients bind the individual purified isoforms. This observation, and the work carried out with the murine MAb 4C10,³⁸ further stress the importance of conformational epitopes on the allergic sensitisation. It is noteworthy to mention that ion-exchange chromatography

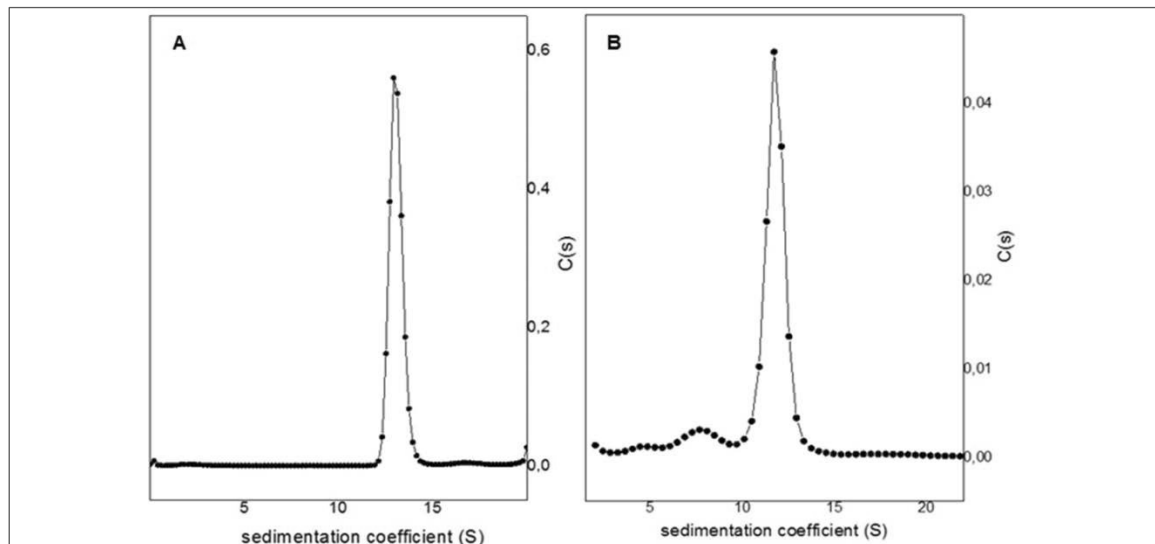


Figure 6. (A) Distribution of the amandin sedimentation coefficients in PBS at 20 °C. (B) Distribution of the sedimentation coefficients of Ber e 2 at 20 °C in PBS.

purified amandin showed a smaller molecular weight band when compared with amandin from the complete extract, which was also analysed to verify protein identity (**Figure 5, Table 1**). As it is observed in **Figure 7A**, basic β -chain molecular

the difference in molecular weight that exhibited the largest band of amandin in SDS-PAGE must be due to a cleavage suffered by the acidic α -chain peptide.

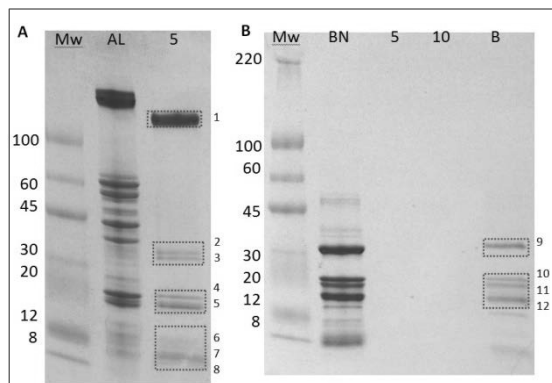


Figure 7. (A) SDS-PAGE electrophoresis under reducing conditions, but without boiling in sample buffer, of fraction 5 from almond ion exchange chromatography. Mw: protein marker; AL: almond extract; 5: peak eluted off ion exchange chromatography. Selected bands were excised and analysed by MALDI TOF/TOF. (B) SDS-PAGE electrophoresis under reducing conditions of fraction B from Brazil nut size exclusion chromatography. Mw: protein marker; BN: Brazil nut extract; 5 and 10: peaks eluted in size-exclusion fractionation of fraction B; B: sample of the fraction loaded into the column. Selected bands were excised and analysed by MALDI TOF/TOF. Molecular mass of each standard (kDa) is indicated in the left margin of the inset.

weight from purified amandin is in accordance with the same protein from the complete almond extract (20 kDa). However, there is a disagreement between acidic α -chain peptide bands from purified amandin and complete almond extract. Therefore,

On the other hand, SDS-PAGE electrophoresis of fraction B from size-exclusion chromatography of Brazil nut protein extract (**Figure 7B**) revealed 4 bands that were excised and trypsinized to perform a MALDI-TOF/TOF analysis. Furthermore, a sample from fraction 5 of the size exclusion fractionation of peak B was also analysed. **Table 2** shows that all electrophoretic bands, as well as peak 5 liquid sample, were identified as 11S globulin from Brazil nut. However, theoretical tryptic cleavage had to be done employing the sole database entry existing for 11S globulin from Brazil nut (gi|30313867). Despite showing high sequence coverage and ion score values confirmation, there was no possible way to elucidate if the sample analyzed contained more than one isoform for 11S globulin. Previous studies have reported that purified 11S globulins from Brazil nut contain multiple bands on SDS-PAGE, and that the protein is post-translationally cleaved, yielding an N-terminal acidic subunit and a C-terminal basic subunit linked by an interchain disulfide bond, as 11S globulins from different species.^{33,37,40}

Table 1: Almond peptides identified by MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometry and Mascot Database Search.

| Gel band | Protein identification | Accession number | Sequence coverage | Total score | Ion scores | Peptide sequences |
|----------|--|-----------------------------------|-------------------|-------------|------------------------------|---|
| 1 | prunin 1 precursor [<i>Prunus dulcis</i>] | gi 307159112 | 35% | 380 | 80 136 87 | R.ISTLNSHNLPILR.F R.ALPDEVLANAYQISR.E K.YNRQETIALSSSQQR.R |
| | prunin 2 precursor, partial [<i>Prunus dulcis</i>] | gi 307159114 | 37% | 285 | 65 20 104 | R.ADFYNPQGGR.I R.EGQLFLIPQNHAVITQASNEGFYISFR.T R.ALPDEVLQNAFR.I |
| 2 | prunin 1 precursor [<i>Prunus dulcis</i>] | gi 307159112 | 31% | 182 | 123 | R.ALPDEVLANAYQISR.E |
| 3 | Chain A, Crystal Structure Of Pru Du Amandin, An Allergenic Protein From <i>Prunus dulcis</i> | gi 258588247 | 44% | 650 | 46 89 131 139 96 | R.GVLGAVFSGCPETFEESQSSQQR.Q R.ISTLNSHNLPILR.F K.TEENAFINTLAGR.T R.ALPDEVLANAYQISR.E K.YNRQETIALSSSQQR.R |
| 4 | prunin [<i>Prunus dulcis</i>] | gi 460806 | 29% | 451 | 80 135 98 53 | R.ISTLNSHNLPILR.F R.ALPDEVLANAYQISR.E K.YNRQETIALSSSQQR.R R.QETIALSSSQQR.R |
| 5 | prunin 2 precursor, partial [<i>Prunus dulcis</i>] | gi 307159114 | 28% | 322 | 33 84 16 112 | R.LSQNIGDPSRADFYNPQGGR.I R.ADFYNPQGGR.I R.EGQLFLIPQNHAVITQASNEGFYISFR.T R.ALPDEVLQNAFR.I |
| 6 | prunin 1 precursor [<i>Prunus dulcis</i>] | gi 307159112 | 7% | 87 | 52 21 | R.GNLDFVQPPR.G R.QQEQLQQR.Q |
| 7 | prunin 1 precursor [<i>Prunus dulcis</i>] | gi 307159112 | 27% | 279 | 74 58 85 | R.QSQLSPQNCQLNQLQAR.E R.GVLGAVFSGCPETFEESQSSQQR.Q R.KFYLGNPENEFNQGGQSQPR.Q |
| 8 | prunin 1 precursor [<i>Prunus dulcis</i>] | gi 307159112 | 25% | 197 | 15 28 56 45 | R.IQAEAGQIETWNFNQEDFCAGVAASR.I R.GVLGAVFSGCPETFEESQSSQQR.Q R.KFYLGNPENEFNQGGQSQPR.Q R.GNLDFVQPPR.G |
| * | Idem bands 1, 3 and 5 + | gi 258588247 + gi 307159114 | 31% | 146 | | |
| | Idem band 1, 2, 6, 7, 8 pru2, partial [<i>Prunus dulcis</i>] | gi 307159112 + gi 460816 | 47% | 195 | | |

Table 2: Brazil nut peptides identified by MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometry and Mascot Database Search.

| Gel band | Protein identification | Accession number | Sequence coverage | Total score | Ion scores | Peptide sequences |
|---------------|---|------------------|-------------------|-------------|----------------|---|
| 9 | 11S globulin [<i>Bertholletia excelsa</i>] | gi 30313867 | 23% | 92 | 33 31 | R.LEAEAGVSEVWDYTDQQFR.C R.NTIRPQGLLLPVYTNAPK.L |
| 10 | 11S globulin [<i>Bertholletia excelsa</i>] | gi 30313867 | 32% | 116 | 28 | R.GETVFDNLR.E |
| 11 | 11S globulin [<i>Bertholletia excelsa</i>] | gi 30313867 | 33% | 188 | 58 51 | K.GVLYENAMMPLWR.L K.LNRDEAVLFQPGSR.S |
| 12 | 11S globulin [<i>Bertholletia excelsa</i>] | gi 30313867 | 2% | 48 | 48 | R.HFFLAGNIQR.S |
| Peak 5 | 11S globulin [<i>Bertholletia excelsa</i>] | gi 30313867 | 9% | 199 | 83 36 90 | S.EVWDYTDQQFR.C R.NTIRPQGLLLPVYTNAPK.L T.FIQNIDNPAEADFYNP.R |

Circular dichroism analysis and thermal stability of target proteins

ELISA and western blotting analysis of purified amandin and Brazil nut 11S globulin demonstrated that Brazil nut specific BE95 phage-scFv, and

almond specific PD1F6 phage-scFv were unable to recognize their target proteins following heat denaturation. In order to understand the thermal stability of amandin and Brazil nut 11S globulin, changes in ellipticity of these proteins as a function

of temperature were followed and monitored by CD. The Far-UV CD spectrum of amandin at 20 °C displayed two minima around 209 and 224 nm and remain nearly unchanged from 20 to 80 °C (**Figure 8A**), in agreement with previous observations.⁴¹ Thermally induced changes in this region of the

spectra are moderate above 209 nm, which hamper to follow amandin denaturation. The loss of tertiary and quaternary structure was therefore monitored by following the ellipticity variation at the near-UV region of the CD spectrum where amandin displays a maximum at 284 nm (**Figure 8B**). The signal

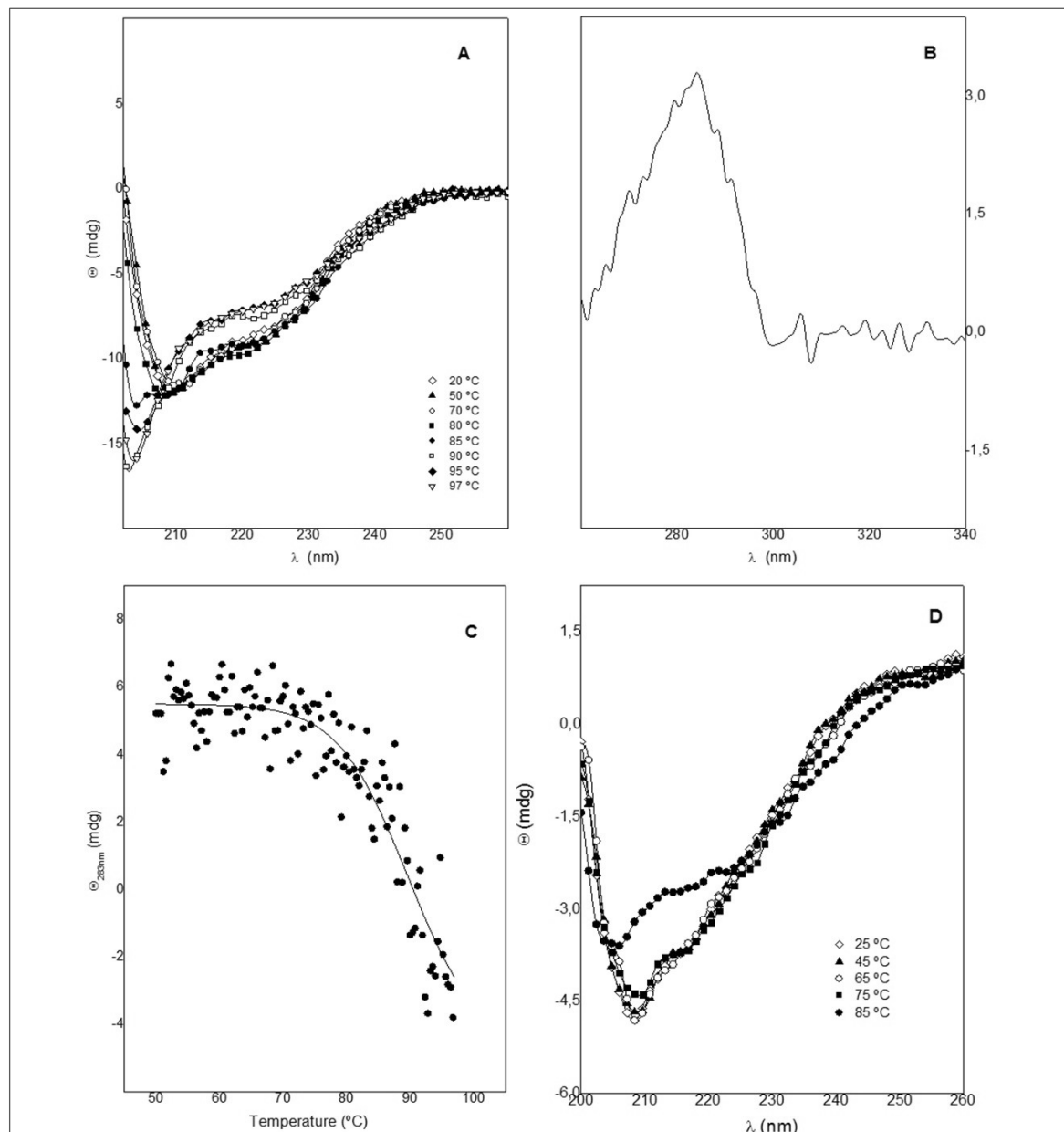


Figure 8. (A) Far-UV CD spectra of amandin at different temperatures. (B) Near-UV spectrum of amandin at 20 °C. (C) Variation of amandin ellipticity at 283 nm with temperature. (D) Far-UV CD spectra of Ber e 2 globulin at different temperatures.

disappears between 75 and 97 °C (**Figure 8C**) but a reliable estimation of the half transition temperature is precluded by the absence of the post-transition region. When involved in tertiary/quaternary interaction network,

phenylalanines generally absorb in the 258-268 nm, tyrosines in the 274-286 nm and triptophanes in 260-300 nm.⁴² In the case of Ber e 2, the far-UV CD spectrum at 25 °C revealed two minima at around 208 and 216 nm (**Figure 8D**), in

agreement with the spectrum reported for this protein.²⁹ Furthermore, changes in ellipticity, monitored by CD, revealed that no major changes in the secondary structure were observed within the 25-75 °C range. Nevertheless, when temperature reached 85 °C, the intensity of minima decreased and the major minimum slightly blue-shifted. The limited concentration of Brazil nut 11S protein available (37.25 µg mL⁻¹) avoided further studying its thermal stability.

These results explain the lack of immunoreactivity in Western-blot analysis of amandin boiled in sample buffer before electrophoretic separation, but not in the absence of heat treatment. The negative results obtained with the phage-scFvs in ELISA after boiling the nut extracts can be also explained by the lack of thermal stability of the target proteins at temperatures higher than 85 °C.

Nevertheless, absence of target recognition after boiling protein extracts contrasted with the ability of the same phage-scFv to recognize the target protein when ground nuts underwent severe heat treatments (roasting at 160 °C for 13 min, or autoclaving for 15 min at 121 °C), previously to the preparation of the protein extracts, as described before.¹⁵⁻¹⁶ In this sense, Mills et al. (2003), stated that proteins show an increase in thermostability when encountered in low-water systems, such as whole food matrices.³³ Therefore, it can be argued that heating proteins in solution might enhance denaturation of proteins, which would explain why phage-scFv were still able to detect their target proteins in processed foods when analysed by ELISA.

In summary, ion exchange chromatography, mass spectrometry (MS) and western blotting analysis results supported that PD1F6 and PD2C9 phage-scFv clones, isolated against a complete almond protein extract, recognized a conformational epitope of almond 11S globulin legumin-like protein, also named amandin, which corresponds to

the almond major allergen Pru du 6. On the other hand, size exclusion fractionation and MS results revealed that BE95 phage-scFv clone, isolated against a whole Brazil nut protein extract, recognized a conformational epitope of the Brazil nut 11S globulin, corresponding to allergen Ber e 2. Performance of phage library screening procedure using a complete protein extract is consistent with the isolation of phage-scFv targeting the major seed storage allergenic proteins contained in the extract. Lack of recognition of the target proteins observed after severe heat treatments of protein extracts was in accordance with the results obtained in CD.

The results obtained in this work revealed that isolated phage-displayed scFv target the native forms of two major allergens from Brazil nut and almond, and they would serve as a useful tool to detect the presence of allergenic tree nuts in foodstuffs.

ABBREVIATIONS USED

BCA, bicinchoninic acid assay ; BSA, bovine serum albumin; CD, circular dichroism; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FPLC, fast protein liquid chromatography; IgE: type E immunoglobulin; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization; MS, mass spectrometry; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline; PVDF, polyvinylidene difluoride; TOF, time of flight.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Margarita Menéndez (Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid) for her scientific guidance regarding circular dichroism and analytical ultracentrifuge analysis, and critical reading of the manuscript. This study was supported by Grant No. AGL 2013-48018-R from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain, and Grant No. S2013/AB12747 from the Comunidad de Madrid (Spain). Silvia de la Cruz

(AP2010-0028) and Aina García (FPU014/01248) are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, and Raquel Madrid (BES-2014-068553) from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain. The proteomic analysis was performed in the Proteomics Unit of Universidad Complutense de Madrid that belongs to ProteoRed, PRB2-ISCI, supported by grant PT13/0001.

REFERENCES

- (1) EFSA NDA Panel (European Food Safety Authority Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), Scientific opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal* **12**: 3894 (2014).
- (2) Bolling BW, Chen CYO, McKay DL and Blumberg JB, Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutr Res Rev* **24**: 244–275 (2011).
- (3) Kamil A and Chen CYO, Health benefits of almonds beyond cholesterol reduction. *J Agric Food Chem* **60**: 6694–6702 (2012).
- (4) Ros E. Health benefits of nut consumption. *Nutrients* **2**: 652–682 (2010).
- (5) Kirsch S, Fourdrilis S, Dobson R, Scippo ML, Maghuin-Rogister G and De Pauw E, Quantitative methods for food allergens: a review. *Anal Bioanal Chem* **395**: 57–67 (2009).
- (6) Poms RE, Anklam E and Kuhn M, Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *J AOAC Int* **87**: 1391–1397 (2004).
- (7) Ben Rejeb S, Abbott M, Davies D, Cléroux C and Delahaut P, Multi-allergen screening immunoassay for the detection of protein markers of peanut and four tree nuts in chocolate. *Food Addit Contam* **22**: 709–715 (2005).
- (8) Sharma GM, Roux KH and Sathe SK, A sensitive and robust competitive enzyme-linked immunosorbent assay for Brazil nut (*Bertholletia excelsa* L.) detection. *J Agric Food Chem* **57**: 769–776 (2009).
- (9) Su M, Venkatachalam M, Liu C, Zhang Y, Roux KH and Sathe SK, A murine monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for almond (*Prunus dulcis* L.) detection. *J Agric Food Chem* **61**: 10823–10833 (2013).
- (10) Hoogenboom HR, Overview of antibody phage-display technology and its applications, in *Antibody Phage Display*, ed. by O'Brien PM and Aitken R. Humana Press, Totowa, pp. 1–37 (2002).
- (11) Kavanagh O, Elliott CT and Campbell K, Progress in the development of immunoanalytical methods incorporating recombinant antibodies to small molecular weight biotoxins. *Anal Bioanal Chem* **407**: 2749–2770 (2015).
- (12) Pande J, Szewczyk MM and Grover AK, Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv* **28**: 849–858 (2010).
- (13) Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM and Hamid M, ScFv Antibody: principles and clinical application. *J Immunol Res* Article ID 980250, 15 pages (2012).
- (14) Hoogenboom HR, Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* **23**: 1105–1116 (2005).
- (15) de la Cruz S, Cubillos-Zapata C, López-Calleja IM, Ghosh S, Alcocer M, González I, Martín R and García T, Isolation of recombinant antibody fragments (scFv) by phage display technology for detection of almond allergens in food products. *Food Control* **54**: 322–330 (2015).
- (16) de la Cruz S, López-Calleja IM, Alcocer M, González I, Martín R and García T, Selection of recombinant antibodies by phage display technology and application for detection of allergenic Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in processed foods. *J Agric Food Chem* **61**: 10310–10319 (2013).
- (17) Ornstein L, Disc electrophoresis-I background and theory. *Ann N Y Acad Sci* **121**: 321–349 (1964).
- (18) McLellan T, Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH. *Anal Biochem* **126**: 94–99 (1982).
- (19) Albillos SM, Jin T, Howard A, Zhang Y, Kothary MH and Fu TJ, Purification, crystallization and preliminary X-ray characterization of prunin-1, a major component of the almond (*Prunus dulcis*) allergen amandin. *J Agric Food Chem* **56**: 5352–5358 (2008).
- (20) Schuck P, Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* **78**: 1606–1619 (2000).
- (21) Laue TM, Shah BD, Ridgeway TM and Pelletier SL, Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins, in *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, ed. by Harding SE, Rowe AJ and Horton JC. Cambridge, UK: Royal Soc Chem, pp. 90–125 (1992).
- (22) Willison LN, Sathe SK and Roux KH, Production and analysis of recombinant tree nut allergens. *Methods* **66**: 34–43 (2014).
- (23) Abolhassani M and Roux KH, cDNA cloning, expression and characterization of an allergenic 60s ribosomal protein of almond (*Prunus dulcis*). *Iran J Allergy Asthma Immunol* **8**: 77–84 (2009).
- (24) Breiteneder H and Radauer C, A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* **113**: 821–830 (2004).
- (25) Garrido-Fernández S, Garcia BE, Sanz ML, Ariz S and Tabar A, The role of lipid transfer proteins in the

- almond tree and almond fruit as contact and airborne allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol* **19**: 61–63 (2009).
- (26) Marion D, Douliez JP, Gautier MF and Elmorjani K, Plant lipid transfer proteins: relationships between allergenicity and structural, biological and technological properties, in *Plant Food Allergens*, ed. by Mills ENC and Shewry PR. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 57–69 (2003).
- (27) Sathe SK, Wolf WJ, Roux KH, Teuber SS, Venkatachalam M and Sze-Tao KWC, Biochemical characterization of amandin, the major storage protein in almond (*Prunus dulcis* L.). *J Agric Food Chem* **50**: 4333–4341 (2002).
- (28) Sun SSM, Leung FW and Tomic JC, Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) proteins: fractionation, composition, and identification of a sulfur-rich protein. *J Agric Food Chem* **35**: 232–235 (1987).
- (29) Sharma GM, Mundoma C, Seavy M, Roux KH and Sathe SK, Purification and biochemical characterization of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* L.) seed storage proteins. *J Agric Food Chem* **58**: 5714–5723 (2010).
- (30) Alcocer MJC, Doyen C, Lee HA and Morgan MRA, Properties of polyclonal, monoclonal, and recombinant antibodies recognizing the organophosphorus pesticide chlorpyrifos-ethyl. *J Agric Food Chem* **48**: 4053–4059 (2000).
- (31) Venkatachalam M and Sathe SK, Chemical composition of selected edible nut seeds. *J Agric Food Chem* **54**: 4705–4714 (2006).
- (32) Xu ZL, Dong JX, Wang H, Li ZF, Beier RC, Jiang YM, Lei HT, Shen YD, Yang JY and Sun YM, Production and characterization of a single-chain variable fragment linked alkaline phosphatase fusion protein for detection of O,O-diethyl organophosphorus pesticides in a one-step enzyme-linked immunosorbent assay. *J Agric Food Chem* **60**: 5076–5083 (2012).
- (33) Mills ENC, Jenkins JA, Bannon GA, Plant seed globulin allergens, in *Plant Food Allergens*, ed. by Mills ENC and Shewry PR. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 141–157 (2003).
- (34) Wolf WJ and Sathe SK, Ultracentrifugal and polyacrylamide gel electrophoretic studies of extractability and stability of almond meal proteins. *J Sci Food Agric* **78**: 511–521 (1998).
- (35) Kamiya N, Sakabe K, Sakabe N, Sasaki K, Sakakibara M and Noguchi H, Structural properties of Brazil nut 11 globulin, excelsin. *Agric Biol Chem* **47**: 2091–2098 (1983).
- (36) Svedberg T and Sjögren B, The molecular weights of amandin and of excelsin. *J Am Chem Soc* **52**: 279–287 (1930).
- (37) Jin T, Albillos SM, Guo F, Howard A, Fu TJ, Kothary MH and Zhang YZ, Crystal structure of prunin-1, a major component of the almond (*Prunus dulcis*) allergen amandin. *J Agric Food Chem* **57**: 8643–8651 (2009).
- (38) Willison LN, Zhang Q, Su M, Teuber SS, Sathe SK and Roux KH, Conformational epitope mapping of Pru du 6, a major allergen from almond nut. *Mol Immunol* **55**: 253–263 (2013).
- (39) Roux KH, Teuber SS, Robotham JM and Sathe SK, Detection and stability of the major almond allergen in foods. *J Agric Food Chem* **49**: 2131–2136 (2001).
- (40) Guo F, Jin T, Howard A and Zhang YZ. Purification, crystallization and initial crystallographic characterization of Brazil nut allergen Ber e 2. *Acta Cryst* **63**: 976–979 (2007).
- (41) Albillos SM, Menhart N and Fu TJ, Structural stability of amandin, a major allergen from almond (*Prunus dulcis*), and its acidic and basic polypeptides. *J Agric Food Chem* **57**: 4698–4705 (2009).
- (42) Martin SR and Schilstra MJ, Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. *Methods Cell Biol* **84**: 263–293 (2008).

CHAPTER 7: APPENDIX A

SUPPLEMENTARY DATA

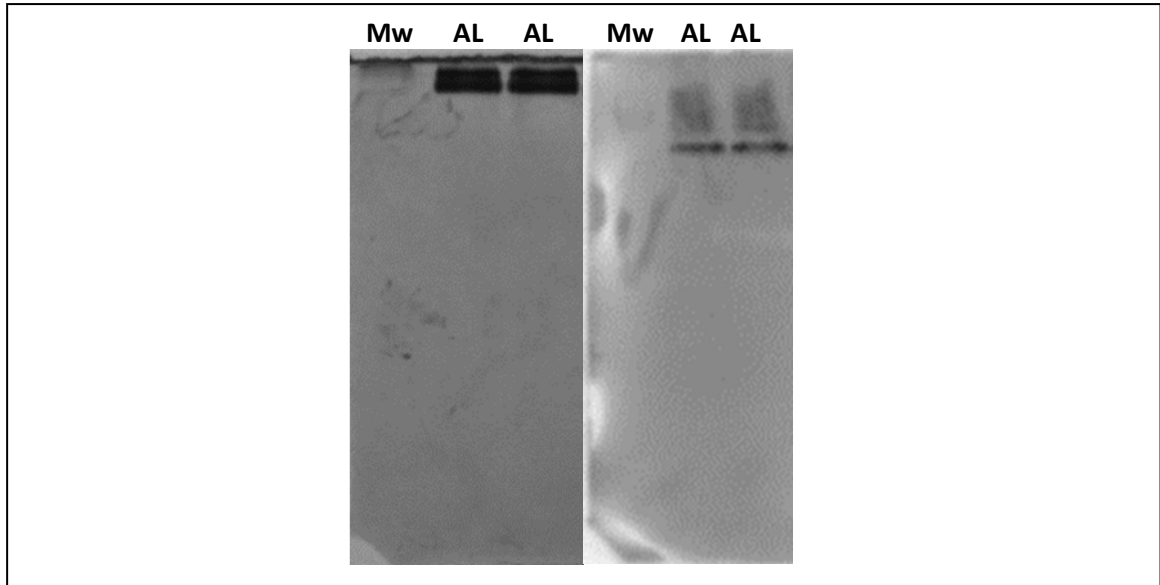


Figure I. Dot blot analysis of almond protein. (Left) Native-PAGE (12% acrylamide/bisacrylamide resolving gel). Mw: Molecular weight standard; AL: almond extract. (Right) PVDF membrane developed with phage clone PD1F6. PD2C9 phage clone exhibited a similar behavior (data not shown).

CAPÍTULO 8

PRODUCCIÓN DE scFv BIOTINILADOS *in vivo* ESPECÍFICOS
FRENTE A PROTEÍNAS DE ALMENDRA (*Prunus dulcis*) EN
Pichia pastoris RECOMBINANTE

CHAPTER 8

*PRODUCTION OF in vivo BIOTINYLATED scfv SPECIFIC TO
ALMOND (Prunus dulcis) PROTEINS BY RECOMBINANT
Pichia pastoris*

Journal of Biotechnology 227(2016) 112-119



Production of *in vivo* biotinylated scFv specific to almond (*Prunus dulcis*) proteins by recombinant *Pichia pastoris*



Silvia de la Cruz^a, Marcos Alcocer^b, Raquel Madrid^a, Aina García^a, Rosario Martín^a, Isabel González^a, Teresa García^{a,*}

^a Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough LE12 5RD, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2015
Received in revised form 1 April 2016
Accepted 12 April 2016
Available online 13 April 2016

Keywords:

Avidin
In vivo biotinylation
Pichia pastoris
Prunus dulcis
Multimeric scFv

ABSTRACT

The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has demonstrated its suitability for large-scale production of recombinant proteins. As an eukaryotic organism *P. pastoris* presents a series of advantages at expression and processing of heterologous proteins when compared with *Escherichia coli*. In this work, *P. pastoris* has been used to express a scFv from a human synthetic library previously shown to bind almond proteins. In order to facilitate purification and post processing manipulations, the scFv was engineered with a C-terminal tag and biotinylated *in vivo*. After purification, biotinylated scFv were bound to avidin conjugated with HRP producing a multimeric scFv. The multimeric scFv showed to maintain their ability to recognize almond protein when assayed in ELISA, reaching a LOD of 470 mg kg⁻¹. This study describes an easy method to produce large quantities of *in vivo* biotinylated scFv in *P. pastoris*. By substituting the enzyme or fluorochromes linked to avidin, it will be possible to generate a diverse number of multimeric scFv as probes to suit different analytical platforms in the detection of almond in food products.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Escherichia coli has been widely adopted for the production of single-chain variable fragments (scFv). However, antibody fragments produced in prokaryotic expression systems can result in unstable proteins, leading to low scFv yields (Arbabi-Ghahroudi et al., 2005; Miller et al., 2005). In this sense, *Pichia pastoris* has become an interesting alternative to *E. coli* in recombinant antibody production. It presents the advantages of single-celled organisms, such as ease of handling and cost-effectiveness, combined with the benefits of eukaryotic systems that include post-translational modifications, protein processing and a reasonably sophisticated quality control of protein folding. Additionally, it is a more manageable and sturdy system than higher eukaryotes, such as insects and mammalian tissue culture cells systems, that besides being auxotrophic can employ cheap methanol as the sole source of carbon and energy (Cai et al., 2009; Cregg et al., 2000).

A scFv consists of the variable regions of the antibody heavy and light chains connected into a single polypeptide chain with a short

flexible linker (Ahmad et al., 2012). One of the strategies aimed to enhance the avidity of antibody fragments has been to imitate the native IgG molecule by means of an engineered tetrameric complex of biotinylated recombinant antibodies fused to a core of streptavidin or avidin (Cloutier et al., 2000; Kipriyanov et al., 1995; Thie et al., 2009). Biotin molecule is typically employed as it possesses high affinity towards streptavidin (Kd = 4 × 10⁻¹⁴ M) (Cronan and Reed, 2000; Li and Sousa, 2012).

Although chemical or enzymatic *in vitro* biotinylation has been used for decades, the ability to target one particular amino acid residue *in vivo* has recently become very attractive (Chapman-Smith et al., 2001; Kay et al., 2008; Predonzani et al., 2008; Scholle et al., 2006; Thie et al., 2009). In particular, the *E. coli* biotin protein ligase (BirA) has shown to catalyze the covalent attachment of a biotin molecule to a specific lysine within the biotin acceptor domain (BAD) (Beckett et al., 1999; Cull and Schatz, 2000; Li and Sousa, 2012). This reaction has the particularity of being conserved throughout evolutionary boundaries, so enzymes from different species were described to biotinylate carboxylases from different sources (Zempleni et al., 2009).

In this work we describe the *in vivo* biotinylation of a scFv employing a single clone of *P. pastoris* co-transformed with two different expression plasmids, and the subsequent multimerization

* Corresponding author.

E-mail addresses: tgarcia@vet.ucm.es, tgarcia@ucm.es (T. García).

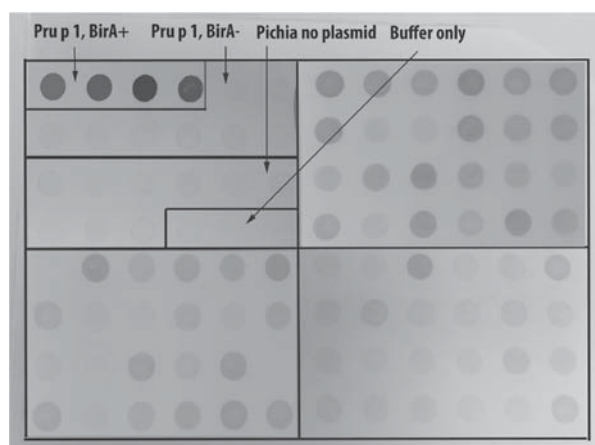


Fig. 1. Representative screening of 24 wells expression plates after methanol induction. After induction for 72 h the supernatants were dot blotted into PVDF membrane and probed with avidin–Alkaline Phosphatase. Pru p 1, a peach allergen was used as positive control. No to very low expression of Pru p 1 was detected in the absence of BirA. The other 3 panels are representative expression of different scFv clones under the BirA+ background. The selection of the higher expressers is carried out visually.

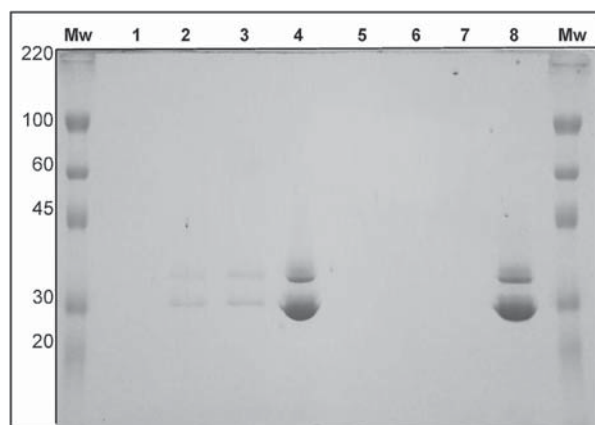


Fig. 2. SDS-PAGE electrophoresis of culture supernatants from the different *P. pastoris* clones employed in this work, after methanol induction (lanes 1–3) and without induction (lanes 5–7). Lanes 1 and 5: *P. pastoris* non-transformed strain (X-33); 2 and 6: *P. pastoris* pMJA181-D8 clone; 3 and 7: *P. pastoris* PdBSF clone; 4 and 8: purified scFv. Molecular marker: ColorBurst Electrophoresis Marker (Sigma-Aldrich).

of the biotinylated scFv on avidin to produce a complex antibody aimed to detect almond proteins in ELISA immunoassays.

2. Materials and methods

2.1. Materials and reagents

E. coli XL1-Blue Chemically Competent Cells (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) were employed for the propagation of plasmids, and *P. pastoris* X-33 strain (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used for scFv and BirA enzyme expression. *P. pastoris* expression vectors pPICZ α B and pPIC6 α A were purchased from Life Technologies. Restriction enzymes *Pst*I, *Not*I, *Xba*I, *Eco*RI and *Sac*I, calf intestinal alkaline phosphatase, T4 DNA ligase, and GoTaq DNA Flexi Polymerase were purchased from Promega (Madison, WI, USA). Q5High-Fidelity DNA Polymerase was purchased from New England Biolabs (Hitchin, UK). Synthetic oligonucleotides were purchased from Sigma-Aldrich (Gillingham, UK). Plasmid

purification kit (QIAGEN Plasmid Midi Kit), PCR product purification kit (QIAquick PCR Purification Kit) and gel extraction kit (QIAquick Gel Extraction Kit) were purchased from Qiagen (Cologne, Germany). HiTrap Protein L Column was purchased from GE Healthcare Life Sciences (München, Germany). Selection antibiotic Zeocin was purchased from Life Technologies, and blasticidin was purchased from InvivoGen (Toulouse, France). Peptone, tryptone, yeast extract, and European bacteriological agar were purchased from Pronadisa (Madrid, Spain). Methanol was purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise stated.

2.2. Vectors construction

The pMJA179 vector was constructed as follows: nucleotide sequence encoding the almond-specific PD1F6-scFv (GenBank accession no. LN889750) was amplified from the corresponding phagemid using a high fidelity DNA polymerase with primers MJA254 and MJA253 (Table A, Supplementary material), the former adding a new *Pst*I restriction site to the scFv sequence. After PCR reaction, purified PCR product was digested with *Pst*I and *Not*I. The resulting fragment was inserted between the *Pst*I and *Not*I sites in the pPICZ α B plasmid, following a basic protocol described in Bloch and Grossmann, 1995.

The pMJA180 vector was constructed as follows: Genomic DNA from TOP10 *E. coli* strain (Life Technologies) was extracted with a phenol/chloroform/isoamyl alcohol mixture, and then precipitated with 100% ethanol. After precipitation, DNA pellet was washed with 70% ethanol, and resuspended in buffer TE, according to the procedure described in Moore and Dowhan, 2002. Nucleotide sequence codifying BirA enzyme (GenBank accession no. P06709) was PCR amplified using primers MJA255 and MJA256, the former including an *Eco*RI restriction site, the latter incorporating a *Sac*II site. The amplified fragment was ligated between *Eco*RI and *Sac*II sites of pPIC6 α A plasmid.

The pMJA181 vector was constructed as follows: BAD sequence was obtained by enforcing hybridization between reverse-phase chromatography-purified primers MJA257 and MJA258. Primer sequences were obtained from Predonzani et al., 2008; with some modifications to include *Not*I and *Xba*I restriction sites. After resuspending primers to a final concentration of 100 μ M, 25 μ L of each primer were mixed, heated at 95 $^{\circ}$ C for 10 min, and cooled down to room temperature. The procedure was repeated 3 times. Hybridized BAD nucleotide sequence was then digested with *Not*I and *Xba*I, and inserted between the *Not*I and *Xba*I sites in the pMJA179 vector. Correct orientation of the insert (scFv + BAD) was assessed by DNA sequencing with primers pMJA254 and pMJA259 at Source BioScience (Nottingham, UK).

To direct the scFv + BAD and the BirA enzyme into the secretory pathway, the codifying sequences were inserted in frame with the methanol inducible 5'-AOX1 promoter, the α -factor secretion signal and the AOX1 transcription terminator.

2.3. Transformation of *E. coli*

Transformation of *E. coli* cells was performed according to manufacturer's protocol. Once transformed, cells were spread on pre-warmed low salt Luria-Bertani agar plates (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar, pH 7.5) containing the selective antibiotic (25 μ g mL $^{-1}$ Zeocin for plasmids pMJA179 and pMJA181, and 100 μ g mL $^{-1}$ blasticidin for plasmid pMJA180). Plates were incubated overnight (o/n) at 37 $^{\circ}$ C.

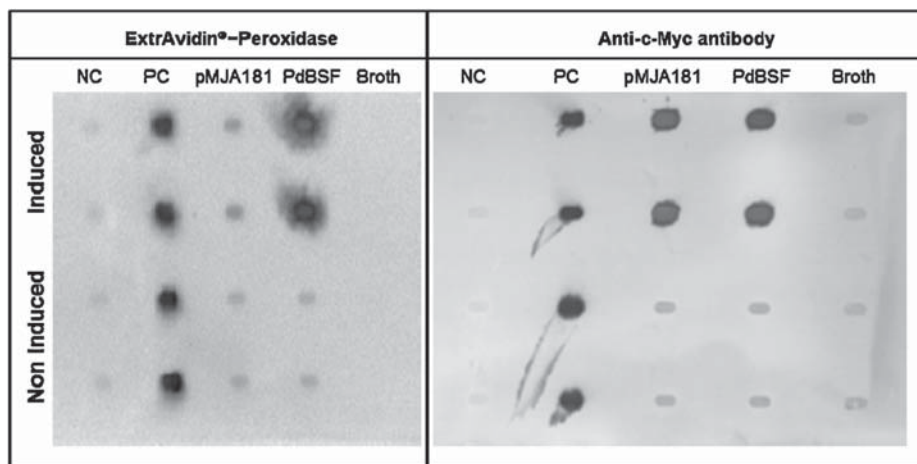


Fig. 3. Dot-blotting analysis of culture supernatants produced by the different *P. pastoris* clones obtained in this work, either revealed with ExtrAvidin-peroxidase (left) or mouse monoclonal anti-c-Myc antibody (right). NC: negative control, *P. pastoris* X-33 non-transformed clone; PC: positive control, biotinylated scFv targeting walnut protein; pMJA181-D8: *P. pastoris* clone transformed with pMJA181 plasmid; PdBSF: *P. pastoris* clone co-transformed with pMJA181 and pMJA180 plasmids.

2.4. Transformation of *P. pastoris*

The pMJA181 expression vector was linearized by *SacI* digestion, ethanol precipitated, and transformed into *P. pastoris* X-33 with a BioRad MicroPulser electroporation apparatus, following the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hemel Hempsted, UK). Transformed cells were grown on Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol Medium (YPDS) agar plates (1% YE, 2% peptone, 2% dextrose, 1 M sorbitol, 2% agar) with $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Zeocin for 72 h at 30°C . Ninety-five isolated colonies were inoculated in $200 \mu\text{L}$ of Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (YPD) with $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Zeocin, and grown o/n at 30°C with shaking (200 rpm) to be screened for scFv production. Next day, $20 \mu\text{L}$ of each clone was inoculated in 1 mL of Buffered Glycerol-complex Medium (BMGY) (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate pH 6.0, 1.34% YNB, 1% glycerol, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin) in 24-well plates (Costar, Corning Life Sciences, NY, USA) with $100 \mu\text{g/mL}$ Zeocin. Cells were incubated o/n at 30°C with shaking. Next day, plates were centrifuged (1800g, 10 min, 4°C), supernatant was removed, and cells were resuspended in Buffered Methanol-complex Medium (BMMY) (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate pH 6.0, 1.34% YNB, 1% methanol, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin) to induce scFv expression. Methanol (1% v/v) was replenished every 12 h for 72 h. Finally, plates were centrifuged (1800g, 10 min, 4°C) and the supernatant was analyzed by dot-blotting analysis in search for higher expressers scFv clones.

Appropriate production of scFv by the selected clone was assessed by SDS-PAGE, using 12% resolving polyacrylamide gel, pH 8.8 but without boiling the sample buffer. Electrophoresis was run at constant voltage (150 V) using a Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad).

2.5. Dot-blotting analysis

Five hundred microliters of supernatant from 95 selected *P. pastoris* clones were filtered through a dot blot microfiltration unit (Life Technologies) to coat a PVDF membrane (Immun-Blot, Bio-Rad). Membrane was then blocked with 3% BSA (w/v) TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) at 37°C for 1 h. After washing the membrane 3 times for 5 min with TBST (0.05% v/v Tween-20), it was incubated with anti-c-myc antibody (Sigma-Aldrich, SKU M5546) (1:100 v/v) in 1% BSA (w/v) TBST at 37°C for 2 h

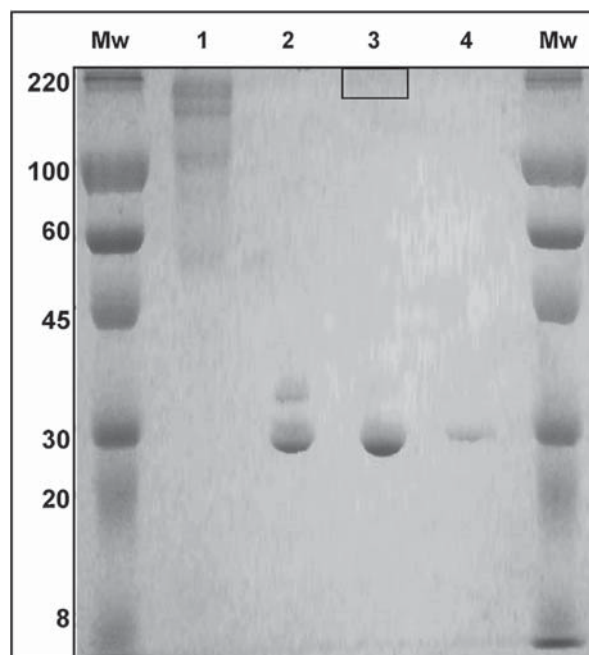


Fig. 4. SDS-PAGE electrophoresis in non-reducing conditions of multimeric-scFv. Line 1: ExtrAvidin-peroxidase ($M_w \approx 112 \text{ kDa}$); line 2: scFv ($M_w \approx 30 \text{ kDa}$); line 3: multimeric-scFv ($M_w \approx 220 \text{ kDa}$); line 4: flow-through recovered from Amicon Ultra-50 Centrifugal Filter Unit. Highlighted band was excised and analyzed by MALDI-TOF/TOF.

After washing 3 times with TBST, the membrane was incubated for 2 h at 37°C with a goat-anti-mouse IgG-ALP antibody (Sigma-Aldrich, SKU A3562) (1:20000 v/v) diluted in 1% BSA (w/v) TBST. Then, the membrane was washed 3 times with TBST and once with distilled water. Finally, a ready-to-use solution of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate and nitroblue tetrazolium (Novex AP Chromogenic Substrate, Life Technologies) was used to detect the alkaline phosphatase enzyme activity. Reaction was stopped by rinsing the membrane with water.

Table 1
Peptides identified by MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometry.

| Protein identification | Accession number | Sequence coverage | Total score | Ion scores | Peptide sequences |
|--|------------------|-------------------|-------------|------------|------------------------------|
| Peroxidase C1A (<i>Armoracia rusticana</i>) | P00433 | 35% | 246 | 49 | R.DTIVNELR.S |
| | | | | 47 | R.TEKDAFGNANSAR.G |
| | | | | 61 | R.MGNITPLTGTQQQIR.L |
| | | | | 22 | R.TVSCADLLTIAAQSVTLAGGPSWR.V |
| Ig heavy chain V-III región 23 (<i>Homo sapiens</i>) | P01764 | 33% | 84 | 49 | K.NTLYLQMNLSR.A |
| pMJA181-scFv | | 35% | 306 | 129 | R.EAEAAAEVQLLESGGLVQPGGSLR.L |
| | | | | 49 | K.NTLYLQMNLSR.A |
| | | | | 50 | |

2.6. *In vivo* biotinylation of scFv

One of the best scFv-expresser clones was chosen based on the intensity of the signals obtained in the blotting membrane from the different supernatants analyzed. The selected clone was transformed with the second *P. pastoris* expression vector, pMJA180, and transformed cells were grown on YPDS agar plates containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zeocin and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ blasticidin. After 72 h, isolated colonies were picked from the selective agar plate, induced with methanol following the microscale induction described before, and supernatants were once again analyzed by dot-blotting to check for the presence of biotinylated scFv. Dot-blotting was carried out as stated before, but incubating the membrane with Avidin-Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich, SKU A7294) (1:100,000 v/v) in 1% BSA, or alternatively with ExtrAvidin-Peroxidase (Sigma-Aldrich, SKU E2886) (1:5000 v/v) in 1% BSA, and developing the membrane with a chemiluminescent substrate (Clarity Western ECL, Bio-Rad).

One clone called PdBSF (*Prunus dulcis* Biotinylated Soluble Fragment, PdBSF), which showed high color intensity in the dot-blotting analysis, was used hereafter. The insertion of both plasmids was assessed by PCR with the primer pairs MJA254/MJA259 and MJA255/MJA256. To that end, genomic DNA from PdBSF clone was isolated following the procedure described by Harju et al., 2004; with several modifications. Briefly, a single well-grown colony was resuspended into 200 μL of lysis buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% (w/v) SDS, 2% (v/v) Triton X-100, pH 8.0). Then, tubes were frozen at -80°C for 2 min, and boiled for 1 min. This procedure was repeated twice. Two hundred microliters of chloroform were added to each sample, and tubes were vortexed for 2 min and centrifuged for 3 min at high speed. The aqueous layer was transferred to a new tube, and DNA was precipitated with ethanol.

Once the insertion of both expression plasmids was confirmed, PdBSF was inoculated into 10 mL of YPD with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zeocin and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ blasticidin, and incubated o/n at 30°C . Next day, 1 mL of this culture was inoculated in 600 mL Buffered Glycerol-complex Medium (BMGY) (1% YE, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 1% glycerol) containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zeocin and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ blasticidin, and incubated for 18 h at 30°C with shaking. Then, it was centrifuged at 4000g for 15 min at 4°C and resuspended in 600 mL Buffered Methanol-complex Medium (BMMY) (1% YE, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB, $8 \times 10^{-5}\%$ biotin, 1% methanol). Methanol was replenished every 12 h for 72 h. Finally, the induced culture was centrifuged at 4000g for 20 min at 4°C to remove yeast cells, and the biotinylated scFv purified from the supernatant as described in Section 2.7.

2.7. Purification of biotinylated scFv

The supernatant containing biotinylated scFv was filtered through a 0.4 μm membrane filter (Millipore, Darmstadt, Germany) and loaded onto a 1×1 mL HiTrap protein L column (GE Health-

care Life Sciences) attached to an ÄKTA purifier FPLC system (GE Healthcare, Sweden). Chromatography was performed as described by Rouet et al., 2012 with several modifications. Briefly, 300 mL of supernatant was loaded onto the column previously equilibrated with 10 mL of PBS buffer (0.01 M phosphate buffer, 0.0027 M potassium chloride and 0.137 M sodium chloride, pH 7.4). The column was then washed with 20 mL of PBS, and the biotinylated scFv eluted with 10 mL of 0.1 M glycine-HCl (pH 2.7). Fractions showing OD₂₈₀ above 0.05 were manually collected in 1.5 mL microcentrifuge tubes pre-filled with 400 μL of 200 mM Tris-HCl (pH 8.0). Flow rate was maintained at 1 mL min⁻¹. The entire process was repeated with the remaining 300 mL of supernatant.

Recovered fractions were pooled and dialyzed against PBS buffer employing Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Millipore) with an MWCO of 10 kDa. Protein concentration was measured in a Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), adjusted to 2 mg mL⁻¹ of total protein, and stored in 100 μL aliquots at -80°C until further use.

2.8. Multimerization of biotinylated scFv

Multimerization was performed following the guidelines provided by the NIH Tetramer Core Facility (<http://tetramer.yerkes.emory.edu/support/protocols#10>), using as a core a molecule of avidin conjugated with peroxidase (ExtrAvidin-HRP, Sigma-Aldrich), at a concentration of 2.5 mg/mL, with a molar ratio (ExtraAvidin: peroxidase) of ≈ 0.7 . Briefly, 0.5 μL avidin solution was added every 10 min up to a total of 10 times to an aliquot of 200 μg of biotinylated scFv. The procedure was carried out at room temperature in the dark, and with continuous but gentle rotation in a sample mixer (HulaMixer Sample Mixer, Life Technologies). After multimerization, tubes were kept in the dark at 4°C until further use.

2.9. ScFv multimerization assessment

After multimerization, scFvs were concentrated using an Amicon Ultra 50 kDa filtration unit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and analysed by SDS-PAGE 12% in non-reducing conditions. Electrophoresis gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Gel bands of interest were cut out with a scalpel and immersed in a solution 5% (v/v) of acetic acid. Peptide mass fingerprinting was performed using a 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyser mass spectrometer (AB SCIEX, MA, USA), at the Unidad de Proteómica, Universidad Complutense de Madrid (Spain). Mascot search engine software (<http://www.matrixscience.com>) was employed to interpret mass spectra data into protein identities using the SwissProt database. Search parameters employed were: trypsin enzymatic cleavage, one possible missed cleavage allowed; peptide mass tolerance of ± 80 ppm; fragment mass tolerance of ± 0.3 Da; peptides were assumed to be monoisotopic; carbamidomethyl fixed modification; and methionine oxidation variable modification.

MRFPSIFTAV LFAASSALAA PVNTTTEDET AQIPAEAVIG YSDLEGDFDV AVLFPNSNSTN
 NGLLFINTTI ASIAAKEEGV SLEKREAEAA **AEVQLLESGG** **GLVQPGGSLR** **LSCAASGFTF**
SSYAMSWVRQ **APGKGLEWVS** **AITSYGSDTY** **YADSVKGRFT** **ISRDNKNTL** **YLQMNLSRAE**
DTGVYYCAKS AYDFDYWGQG TLVTVSSGGG GSGGGGSGGG GSTDIQMTQS PSSLSASVGD
 RVTITCRASQ **SISSYLNWYO** **QKPGKAPKLL** **IYSASALQSG** **VPSRFSGSGS** GTDFTLTISS
 LQPEDFATYY CQQGASDPTT FGQGTKVEIK RAAAGLNDIF EAQKIEWHEG ALEQKLISEE
 DLNSAVDHHH HHH

Fig. 5. ScFv amino acid sequence. Matched peptides of MS spectrum after Mascot search are highlighted to show sequence coverage obtained.

To further assess scFv multimerization, ultracentrifugation analyses were carried out. Sedimentation velocity experiments were carried out at 45000 rpm in an OptimaXL-A analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA), using an AN50Ti rotor and standard cells with double-sector epon-charcoal centrepieces. Measurements were performed in PBS at 20 °C with 400 µL of sample at protein concentrations absorbing 0.6 OD (1.2 cm optical pathway). Differential sedimentation coefficients were calculated by least-squares boundary modelling of the experimental data and corrected to $s_{20,w}$ values with the program SEDFIT (Schuck, 2000), using a partial specific volume of 0.73 mL g⁻¹. Solvent density and viscosity at 20 °C were computed using the SEDNTERP program (Laue et al., 1992). The ultracentrifugation experiments were performed at Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid (Spain).

2.10. Preparation of protein extracts

Binary mixtures of wheat flour containing Marcona cultivar (100,000 to 10 mg kg⁻¹) were prepared as described elsewhere (de la Cruz et al., 2015). Protein extracts from binary mixtures and commercial food products were prepared by adding 200 mg of milled sample to 1800 µL of protein extraction buffer (0.035 M phosphate solution containing 1 M NaCl, pH 7.5.). After shaking for 10 min at room temperature to facilitate the extraction of soluble proteins, the slurry was centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C, and the supernatant was filtered through a 0.45 µm syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany). Bicinchoninic acid (BCA) assay (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA) was used to determine protein concentration. Protein extracts were kept at -20 °C until further use.

2.11. Indirect ELISA with multimerized scFv

The ability of multimerized scFv to recognize almond protein was assessed through indirect ELISA. One hundred microliters of protein extract from binary mixtures or food samples (diluted 1:200 in PBS) was used to coat 96-multi-well polystyrene plates (F96 MaxiSorp, Nunc immune plates, Nunc, Denmark). Plates were incubated o/n at 4 °C. Next day, plates were washed 3 times with TBST. Wells were blocked with 3% BSA (w/v) in TBS for 1 h at 37 °C. After another washing step, 100 µL of 2 µg mL⁻¹ multimerized scFv diluted in 1% BSA in TBST was added to each well. Plates were incubated at 37 °C for 2 h. After incubation, plates were washed 3 times with TBST and once with distilled water. Then, 100 µL of tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution was added to each well, and incubated in the dark. Color development was performed for 10 min at room temperature, and reaction was stopped with 1 M sulphuric acid. OD₄₅₀ was measured with an iEMS Reader MF (Labsystems, Helsinki, Finland). All experiments were performed in triplicate. As negative controls, different wells coated with protein extracts were also incubated with 2 µg mL⁻¹ of monomeric scFv (without ExtrAvidin) or with 0.125 µg mL⁻¹ of ExtrAvidin-HRP (without scFv) to check for non-specific reactions.

A calibration curve of different concentrations of almond in wheat flour (100,000–10 mg kg⁻¹) was included in each plate. Standard curve was obtained by plotting the absorbance values v

the log of almond protein concentration, and it was fitted to an exponential decay curve using Origin 8.0 software (OriginLab Crop., USA).

3. Results and discussion

3.1. Vectors construction and co-transformation into *P. pastoris*

P. pastoris can direct heterologous proteins either to the cytoplasm (intracellular) or to secrete them into the culture medium. For proteins to be secreted, the expressed protein must contain a signal sequence targeting the secretory pathway (Cregg et al., 2000). In this work, recombinant proteins were expressed as fusions to the secretory N-terminal sequence of *S. cerevisiae* α-mating factor prepro-peptide. Furthermore, the vectors used induce the integration of the construct into *P. pastoris* genome, thus conferring genetic stability of the recombinant elements (Macaulay-Patrick et al., 2005).

By engineering a BAD sequence into the C-terminus of the scFv (plasmid pMJA181, Fig. A, Supplementary material) a potential biotinylation site has been created. In addition to BAD sequence, the scFv expressed by the *P. pastoris* clones contained a *c-myc* epitope (EQKLISEEDL) and a poly histidine tail. Thus, it was possible to assess the production of soluble scFv by dot-blotting analysis of the supernatants coated to PVDF membrane by detecting them with an anti-c-myc antibody. The screening of high expresser clones is an essential step in *Pichia* as random and multiple plasmid integration events can result in variable expression levels of heterologous proteins (Nordén et al., 2011; Zhu et al., 2009). Ninety-five *P. pastoris* clones transformed with pMJA181 were induced to produce scFv, and their supernatants checked by dot-blotting analysis to assess the production of soluble fragments. After developing the membrane with a chromogenic substrate, 55 spots (57% of clones) showed high color intensity, being indicative of a correct scFv expression. One of those 55 clones (named pMJA181-D8) was randomly selected to prepare competent cells to proceed with incorporation of the BirA codifying sequence after the second transformation with pMJA180 vector (Fig. B, Supplementary material). It is noteworthy to mention that Zeocin resistant clones somehow resistant to usual doses of blasticidin employed in yeast were observed. Therefore, to ensure the selection of co-transformed clones, blasticidin concentration had to be increased up to 500 µg mL⁻¹. The level of antibiotic resistance reflects the recombinant gene dosage of transformed *P. pastoris* (Nordén et al., 2011), so it is usual to find that the best *P. pastoris* expressors also show higher antibiotic resistance (Arbulu et al., 2015; Jiménez et al., 2014).

3.2. Expression and purification of biotinylated scFv

After the re-screening and selection of the best *in vivo* biotinylated clone (PdBSF) (Fig. 1), the presence of the scFv and BirA codifying sequences were confirmed by PCR with a 780 kb band for scFv linked to BAD nucleotide sequence, and a band of about 975 kb, corresponding to BirA nucleotide sequence. Moreover, pMJA181-D8 clone only possessed pMJA181 vector, and, as expected, the

non-transformed *P. pastoris* strain showed no DNA amplification with these pairs of primers.

To produce large yields of biotinylated scFv, *P. pastoris* cells were grown in buffered media (BMGY and BMMY) as pH values of 6.5–8.0 were described as optimum for scFv production (Shi et al., 2003), and the addition of peptone to the culture medium may enhance product stability through repression of protease induction caused by nitrogen limitation (Macauley-Patrick et al., 2005).

Concomitant transcription of two plasmids would theoretically allow PdBSF clone to express both the scFv and the BirA enzyme. Therefore, BirA present in supernatant would catalyze the binding of a biotin molecule to the acceptor peptide fused to the scFv, resulting in a straightforward *in vivo* biotinylated scFv. Here, *in vivo* biotinylation is presented as an alternative to *in vitro* biotinylation, which requires the previous production and purification of the enzyme, as described elsewhere (Li and Sousa, 2012). On the other hand, the presence of a BAD fused to the scFv provides a specific substrate for BirA to be selectively biotinylated, avoiding biotinylation alternatives such as amine coupling methods, that could decrease the antigen-binding activities (Kumada, 2014).

In order to characterize these products SDS-PAGE of culture supernatants (Fig. 2) was carried out and showed the production of 30–35 kDa proteins when clones pMJA181-D8 and PdBSF were induced with methanol (lanes 2 and 3), thus demonstrating the capability of transformed clones to produce the scFv. Protein concentration of those bands greatly increased after purification of scFv (lanes 4 and 8). However, when transformed clones were not methanol induced, bands indicating the presence of the scFv were absent. Dot-blotting membranes coated with supernatants from pMJA181-D8 and PdBSF clones after methanol induction (Fig. 3, right) and developed with anti-c-myc antibody, confirmed the ability of both transformed clones to produce scFv. On the other hand, dot-blotting analysis of the same supernatants developed with ExtrAvidin-Peroxidase (Fig. 3, left) showed that only the scFv produced by the co-transformed *P. pastoris* clone (i.e. PdBSF clone) was biotinylated, thus confirming the co-expression and proper function of the BirA enzyme, and the effective production of biotinylated scFv by a single *P. pastoris* clone.

Supernatant containing biotinylated scFv was purified by affinity chromatography. The columns used (HiTrap protein L) contain an agarose matrix combined with recombinant protein L, which presents affinity towards the variable region of the kappa light chain of immunoglobulins and immunoglobulin fragments (Malpiedi et al., 2013; Muzard et al., 2009; Zheng et al., 2012). The purification process rendered 30 mg L⁻¹ of biotinylated scFv that were distributed in 100 µL aliquots of 2 mg mL⁻¹.

3.3. Multimerization assessment

To be used in ELISA, biotinylated scFv antibodies were fused to a core of ExtrAvidin-HRP to obtain multimeric scFv. SDS-PAGE in non-reducing conditions of multimeric scFv (Fig. 4) showed a subtle band with a molecular weight of about 220 kDa, which might coincide with the expected size of the tetramers (≈ 230 kDa). To confirm the results, the highest molecular weight band from lane 3 was excised and trypsinized to be identified by MALDI-TOF/TOF. The results obtained showed that the band contained a mixture of peroxidase from *Armoracia rusticana* and Ig from *Homo sapiens* (Table 1), thus being consistent with the presence of a tetramerized scFv. Moreover, when comparing MS results to scFv's amino acid sequence, coverage of 35% was found (Fig. 5) altogether with ion scores shown in Table 1.

To further assess the extension of tetramerization, sedimentation velocity experiments were performed. On the basis of ultracentrifugation studies, differences between the sedimentation coefficient (S) of scFv and the scFv with ExtrAvidin-HRP were

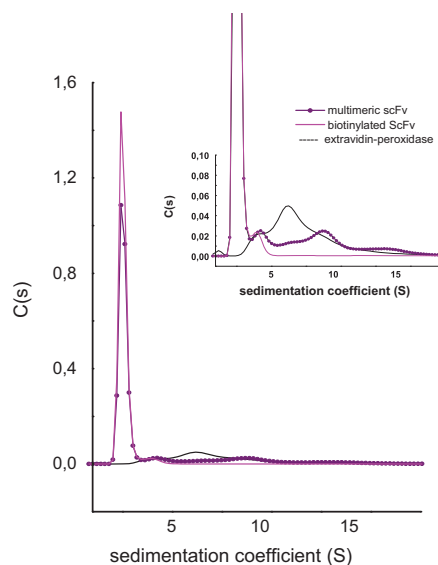


Fig. 6. Distribution of the multimeric-scFv, monomeric scFv and Extravidin-Peroxidase sedimentation coefficients in PBS at 20 °C. Inset shows an amplified portion of the figure.

observed (Fig. 6). Even though Extravidin-HRP is not a homogeneous reagent, its main peak showed an S value of 6.5 with an apparent Mw of 108 kDa. When ExtrAvidin-HRP reacted with the biotinylated scFv (2.50 S, MW_{app} 27.1 kDa), a new species of 8.75 S appeared, with MW_{app} 168 kDa, consistent with the addition of at least two biotinylated scFv molecules to a single ExtrAvidin-peroxidase core. Nevertheless, it is possible that conjugation of peroxidase to avidin would hide biotin binding sites in the avidin molecule, hampering the production of complete tetramers. Other biotin binding proteins should be tried in further experiments.

3.4. Indirect ELISA with multimeric scFv

Due to its feasible adaptation to different applications, biotin-avidin (and its homologs) interaction continues spreading over a wide range of scientific areas. For instance, the high affinity of the moiety makes it an attractive tool for development of novel sensors (Dundas et al., 2013).

Phage display is a reliable tool to isolate antibody fragments from highly diverse antibody libraries. However, one of the drawbacks of selected antibodies is the lack of affinity maturation undergone by classical antibodies raised in animals. A typical strategy to improve antibody affinity entails the introduction of additional mutations to the specific phage binders, in a process that usually involves antibody engineering techniques such as error-prone PCR and CDR shuffling (Kobayashi and Oyama, 2011). In this sense, the multimerization of scFv on avidin or streptavidin is presented as an alternative to increase antibody's functional affinity (Cloutier et al., 2000; Kipriyanov et al., 1995).

Indirect ELISA using multimerized scFv was able to detect almond protein in the wheat flour binary mixtures assayed, with absorbance values increasing in a concentration-dependent manner, down to 500 mg kg⁻¹. The limit of detection (LOD) achieved with multimerized scFv-ELISA was of 470 mg kg⁻¹. The representative standard curve obtained is shown in Fig. 7. Results also confirmed that despite the variation in size (due to presence of BAD peptide), scFv expressed in *P. pastoris* maintained their functionality. However, it should be noted that the monomeric scFv did not show positive signal when tested in a parallel assay

Table 2

Determination of the presence of almond in various commercial processed food products using multimerized-scFv ELISA and phage-ELISA.

| Label statement | Product | Multimerized-scFv ELISA ^a | phage- ELISA ^b |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Almond declared as ingredient | Food bar | 5.29 | 7.1 |
| | Breakfast cereals | 2 | 1.8 |
| | Chocolate | <LOD | <LOD |
| | Milled Flaxseed | 2.5 | 3 |
| | Breakfast cereals | 6.56 | 4.5 |
| | Nut bar | 0.65 | 1.9 |
| | Granola | 1.82 | 5.4 |
| May contain traces of tree nuts | Chocolate | <LOD | <LOD |
| | Biscuits | <LOD | <LOD |
| Almond not declared as ingredient | Chocolate | <LOD | <LOD |

^a Almond concentration (expressed in w/w percentage) estimated after interpolating absorbance values obtained in ELISA in corresponding standard curves performed with binary mixtures of almond in a wheat flour matrix.

^b Results obtained following the method described in de la Cruz et al., 2015.

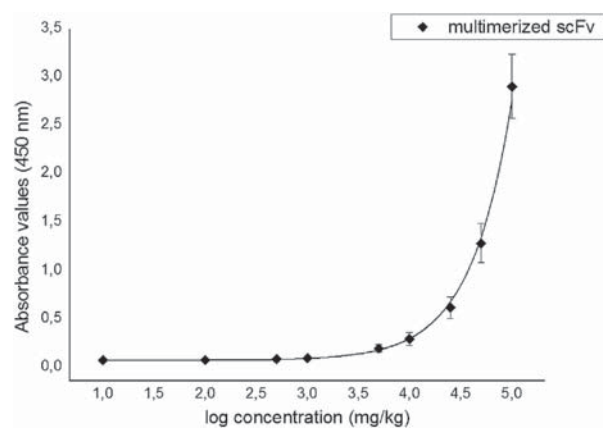


Fig. 7. Representative standard curve of the multimerized scFv-ELISA performed with protein extracts obtained from almond/wheat flour binary mixtures. The curve shows the average value of six independent experiments and the standard deviation in each point of the curve.

employing the anti-c-myc antibody raised in mouse, and the anti-mouse antibody conjugated with alkaline phosphatase as the detection antibodies, and SigmaFast *p*-Nitrophenyl phosphate tablets substrate, revealing that monomeric soluble fragments lacked the ability to detect almond proteins when employed in ELISA (in these conditions, multimeric scFv were still functional). To confirm the results, monomeric scFv were also tested in dot-blotting, with the same negative results (data not shown).

To confirm whether the multimeric-scFv still possessed the same specificity to detect almond protein in foodstuffs that exhibited its phage counterpart, 10 of the 92 commercial food products previously assayed (de la Cruz et al., 2015) were selected and tested. Among the samples analyzed, 7 declared to contain almond as ingredient, two declared the possibility of containing traces of tree nuts and the last one did not declared almond as an ingredient (Table 2). The ELISA results obtained with multimeric scFv were in accordance with the ones obtained with the phage-scFv ELISA. However, as ELISA performed with multimerized scFv is faster and requires less handling, it would be a more appropriate method to be used when a large number of samples is to be analyzed. In the recent years, the use of soluble scFv expressed in *P. pastoris* system has been proposed for detection of different biomolecules, such as Metolcarb (an insecticide), and heart failure or tumor biomarkers (Cai et al., 2014; Maeng et al., 2012; Sommaruga et al., 2011; Maeng et al., 2012; Sommaruga et al., 2011). Moreover, *P. pastoris* has been used to produce modified scFv molecules, like scFv-Fc fusion proteins aimed to detect rabies antigen (Wang et al., 2012) and T cell

leukemia lymphoma CD25 marker (Wan et al., 2013), or to express anti-keratin 8 divalent scFv (scFv)₂ antibodies (Jafari et al., 2011).

In vivo biotinylation of scFv was initially described by Cloutier et al., 2000; who produced “streptabodies” in an *E.coli* strain carrying the plasmid encoding the BirA enzyme after transformation with a vector encoding a scFv linked to BAD. However, due to the presence of N-terminal leader peptide (pelB), scFv expressed in *E.coli* are driven to periplasmic compartment, where they can aggregate as a result of high protein concentration (Lowe et al., 2011). In a different study, Predonzani et al., 2008 reported a bigenic plasmid that allowed the co-expression of a BAD fused scFv and the BirA enzyme in mammalian cells (HEK293 and HEK293T/17). Nevertheless, the advantage of replacing mammalian cells with *Pichia pastoris* lies in the latter not requiring a complex growth medium or culture conditions, its easy genetic manipulation, and potential for a large scale production at high cell density (Frenzel et al., 2013).

In this work, we report for the first time the *in vivo* biotinylation of a scFv expressed in a single *P. pastoris* clone co-transfected with two different expression vectors. The system allows the production of large quantities of biotinylated scFv that once purified, are multimerized using an avidin-HRP core. The large complex maintained the ability to recognize the target almond protein in food products down to 470 ppm when used in indirect ELISA. Because the scFv multimers have demonstrated to be functional, it is possible to produce multimers on avidin molecules with suitable modifications (fluorophores, magnetic particles, etc.), so they can be used as probes in biosensors or microarrays aimed to detect proteins in complex food matrices.

4. Abbreviations used

AP: alkaline phosphatase; AOX: alcohol oxidase; BAD: biotin acceptor domain; BCA: bicinchoninic acid; BirA: biotin ligase; CDR: complementary determining regions; HRP: horse radish peroxidase; LOD: limit of detection; MWCO: molecular weight cut off; scFv: single chain variable fragment.

Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2013-48018-R from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain, and Grant No. S2013/AB12747 from the Comunidad de Madrid (Spain). Silvia de la Cruz (AP2010-0028) and Aina García (FPU014/01248) are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, and Raquel Madrid (BES-2014-068553) from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain. The proteomic analysis was performed in the Proteomics Unit of Complutense University of Madrid that belongs to ProteoRed, PRB2-ISCI, supported by grant PT13/0001.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.024>.

References

- Ahmad, Z.A., Yeap, S.K., Ali, A.M., Ho, W.Y., Alitheen, N.B.M., Hamid, M., 2012. ScFv antibody: principles and clinical application. *Clin. Dev. Immunol.*, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/980250>, Article ID 980250.
- Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., Mackenzie, R., 2005. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev.* 24, 501–519, <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-005-6193-1>.
- Arbulu, S., Jiménez, J.J., Gútierez, L., Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E., 2015. Cloning and expression of synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by recombinant *Pichia pastoris*. *BioMed Res. Int.*, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/767183>, Article ID 767183.
- Beckett, D., Kovaleva, E., Schatz, P.J., 1999. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 8, 921–929, <http://dx.doi.org/10.1110/ps.8.4.921>.
- Bloch, K.D., Grossmann, B., 1995. Restriction endonucleases. In: Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, <http://dx.doi.org/10.1002/0471142727>.
- Cai, H., Chen, L., Wan, L., Zeng, L., Yang, H., Li, S., Li, Y., Cheng, J., Lu, X., 2009. High-level expression of a functional humanized anti-CTLA4 single-chain variable fragment antibody in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 41–48, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1744-3>.
- Cai, F., Li, T., Xie, Y., He, X., 2014. Expression of functional single-chain variable domain fragment (scFv) antibody against Metolcarb in *Pichia pastoris*. *Ann. Microbiol.* 64, 589–597, <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-013-0692-z>.
- Chapman-Smith, A., Mulhern, T.D., Whelan, F., Cronan, J.E., Wallace, J.C., 2001. The C-terminal domain of biotin protein ligase from *E. coli* is required for catalytic activity. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 10, 2608–2617, <http://dx.doi.org/10.1110/ps.22401>.
- Cloutier, S.M., Couty, S., Tersikh, A., Marguerat, L., Crivelli, V., Pugnières, M., Mani, J.C., Leisinger, H.J., Mach, J.P., Deperthes, D., 2000. Streptavidin, a high avidity molecule made by tetramerization of *in vivo* biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin. *Mol. Immunol.* 37, 1067–1077, [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00023-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00023-2).
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16, 23–52, <http://dx.doi.org/10.1385/MB:16:1:23>.
- Cronan, J.E., Reed, K.E., 2000. Biotinylation of proteins *in vivo*: a useful posttranslational modification for protein analysis. *Methods Enzymol.* 326, 440–458, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26069-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26069-2).
- Cull, M.G., Schatz, P.J., 2000. Biotinylation of proteins *in vivo* and *in vitro* using small peptide tags. *Methods Enzymol.* 326, 430–440, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26068-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26068-0).
- Dundas, C.M., Demonte, D., Park, S., 2013. Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9343–9353, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5232-z>.
- Frenzel, A., Hust, M., Schirrmann, T., 2013. Expression of recombinant antibodies. *Front. Immunol.* 4, 1–20, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00217>.
- Harju, S., Fedosyuk, H., Peterson, K.R., 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol.* 4, 8, <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-4-8>.
- Jafari, R., Holm, P., Piercecchi, M., Sundström, B.E., 2011. Construction of divalent anti-keratin 8 single-chain antibodies (scFv)₂, expression in *Pichia pastoris* and their reactivity with multicellular tumor spheroids. *J. Immunol. Methods* 364, 65–76, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2010.11.003>.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Gútierez, L., Arbulu, S., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2014. Use of synthetic genes for cloning, production and functional expression of the bacteriocins enterocin A and bacteriocin E 50–52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Biotechnol.* 56, 571–583, <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-014-9731-7>.
- Kay, B.K., Thai, S., Volgina, V.V., 2008. High throughput protein expression and purification. In: Doyle, S.A. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 185–198, <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-196-3>.
- Kipriyanov, S.M., Breitling, F., Little, M., Dübel, S., 1995. Single-chain antibody streptavidin fusions: tetrameric bifunctional scFv-complexes with biotin binding activity and enhanced affinity to antigen. *Hum. Antibodies Hybrid.* 6, 93–101.
- Kobayashi, N., Oyama, H., 2011. Antibody engineering toward high-sensitivity high-throughput immunosensing of small molecules. *Analyst* 136, 642–651, <http://dx.doi.org/10.1039/c0an00603c>.
- Kumada, Y., 2014. Site-specific immobilization of recombinant antibody fragments through material-binding peptides for the sensitive detection of antigens in enzyme immunoassays. *Biochim. Biophys. Acta* 1844, 1960–1969, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.07.007>.
- Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M., Pelletier, S.L., 1992. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In: Harding, S.E., Rowe, A.J., Horton, J.C. (Eds.), *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*. Cambridge, UK: Royal Soc. Chem, pp. 90–125.
- Li, Y., Sousa, R., 2012. Expression and purification of *E. coli* BirA biotin ligase for *in vitro* biotinylation. *Protein Expr. Purif.* 82, 162–167, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.12.008>.
- Lowe, D., Dudgeon, K., Rouet, R., Schofield, P., Jermutus, L., Christ, D., 2011. Aggregation, stability, and formulation of human antibody therapeutics. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 84, 41–61, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386483-3.00004-5>.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249–270, <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1208>.
- Maeng, B.H., Choi, J., Sa, Y.S., Shin, J.H., Kim, Y.H., 2012. Functional expression of recombinant anti-BNP scFv in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and application as a recognition molecule in electrochemical sensors. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1027–1034, <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-011-0901-5>.
- Malpiedi, L.P., Díaz, C.A., Nerli, B.B., Pessoa, A., 2013. Single-chain antibody fragments: purification methodologies. *Process Biochem.* 48, 1242–1251, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.008>.
- Miller, K.D., Weaver-Feldhaus, J., Gray, S.A., Siegel, R.W., Feldhaus, M.J., 2005. Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 42, 255–267, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2005.04.015>.
- Moore, D., Dowhan, D., 2002. Manipulation of DNA. In: Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, <http://dx.doi.org/10.1002/0471142727> (pp. 2.1. 1–2.1.10).
- Muzard, J., Adi-Bessalem, S., Juste, M., Laraba-Djebari, F., Aubrey, N., Billiard, P., 2009. Grafting of protein L-binding activity onto recombinant antibody fragments. *Anal. Biochem.* 388, 331–338, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2009.02.035>.
- Nordén, K., Agemark, M., Danielson, J.A., Alexandersson, E., Kjellbom, P., Johanson, U., 2011. Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol.* 11, 47, <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-11-47>.
- Predonzani, A., Arnoldi, F., López-Requena, A., Burrone, O.R., 2008. *In vivo* site-specific biotinylation of proteins within the secretory pathway using a single vector system. *BMC Biotechnol.* 8, 41, <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-8-41>.
- Rouet, R., Lowe, D., Dudgeon, K., Roome, B., Schofield, P., Langley, D., Andrews, J., Whitfield, P., Jermutus, L., Christ, D., 2012. Expression of high-affinity human antibody fragments in bacteria. *Nat. Protoc.* 7, 364–373, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.448>.
- Scholte, M.D., Kriplani, U., Pabon, A., Sishtla, K., Glucksmann, M.J., Kay, B.K., 2006. Mapping protease substrates by using a biotinylated phage substrate library. *ChemBioChem* 7, 834–838, <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200500427>.
- Schuck, P., 2000. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* 78 (3), 1606–1619.
- Shi, X., Karkut, T., Chamankhah, M., Altling-Mees, M., Hemmingsen, S.M., Hegedus, D., 2003. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 28, 321–333, [http://dx.doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00706-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00706-4).
- Sommaruga, S., Lombardi, A., Salvadè, A., Mazzucchelli, S., Corsi, F., Galeffi, P., Tortora, P., Prosperi, D., 2011. Highly efficient production of anti-HER2 scFv antibody variant for targeting breast cancer cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 613–621, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3306-3>.
- Thie, H., Binius, S., Schirrmann, T., Hust, M., Dübel, S., 2009. Multimerization domains for antibody phage display and antibody production. *New Biotechnol.* 26, 314–321, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.07.005>.
- Wan, L., Zhu, S., Zhu, J., Yang, H., Li, S., Li, Y., Cheng, J., Lu, X., 2013. Production and characterization of a CD25-specific scFv-Fc antibody secreted from *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3855–3863, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4632-9>.
- Wang, D.D., Su, M.M., Sun, Y., Huang, S.L., Wang, J., Yan, W.Q., 2012. Expression, purification and characterization of a human single-chain Fv antibody fragment fused with the Fc of an IgG1 targeting a rabies antigen in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 86, 75–81, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2012.08.015>.
- Zempleni, J., Wijeratne, S.S.K., Hassan, Y.I., 2009. Biotin. *BioFactors* 35, 36–46, <http://dx.doi.org/10.1002/biof.8>.
- Zheng, Z., Chinnasamy, N., Morgan, R.A., 2012. Protein L: a novel reagent for the detection of Chimeric Antigen Receptor (CAR) expression by flow cytometry. *J. Transl. Med.* 10, 29, <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-10-29>.
- Zhu, T., Guo, M., Tang, Z., Zhang, M., Zhuang, Y., Chu, J., Zhang, S., 2009. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* 107, 954–963, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04279.x>.
- de la Cruz, S., Cubillos-Zapata, C., López-Calleja, I.M., Ghosh, S., Alcocer, M., González, I., Martín, R., García, T., 2015. Isolation of recombinant antibody fragments (scFv) by phage display technology for detection of almond allergens in food products. *Food Control* 54, 322–330, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.011>.

CHAPTER 8: APPENDIX B

SUPPLEMENTARY DATA

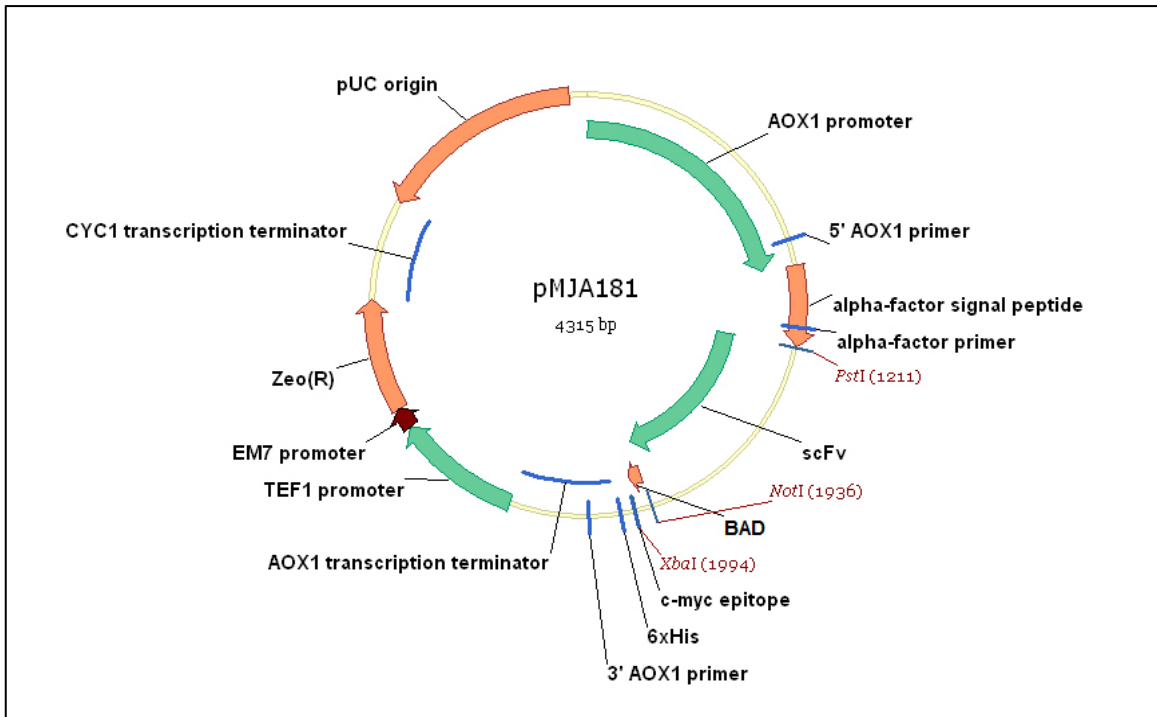


Figure I. pMJA181 vector containing scFv and BAD nucleotide sequences constructed in pPICZaB plasmid (Zeo^r; integrative plasmid carrying the secretion signal sequence from the *S. cerevisiae* alpha factor prepro-peptide and functional sites for the integration at the 5'AOX1 locus of *P. pastoris* X-33).

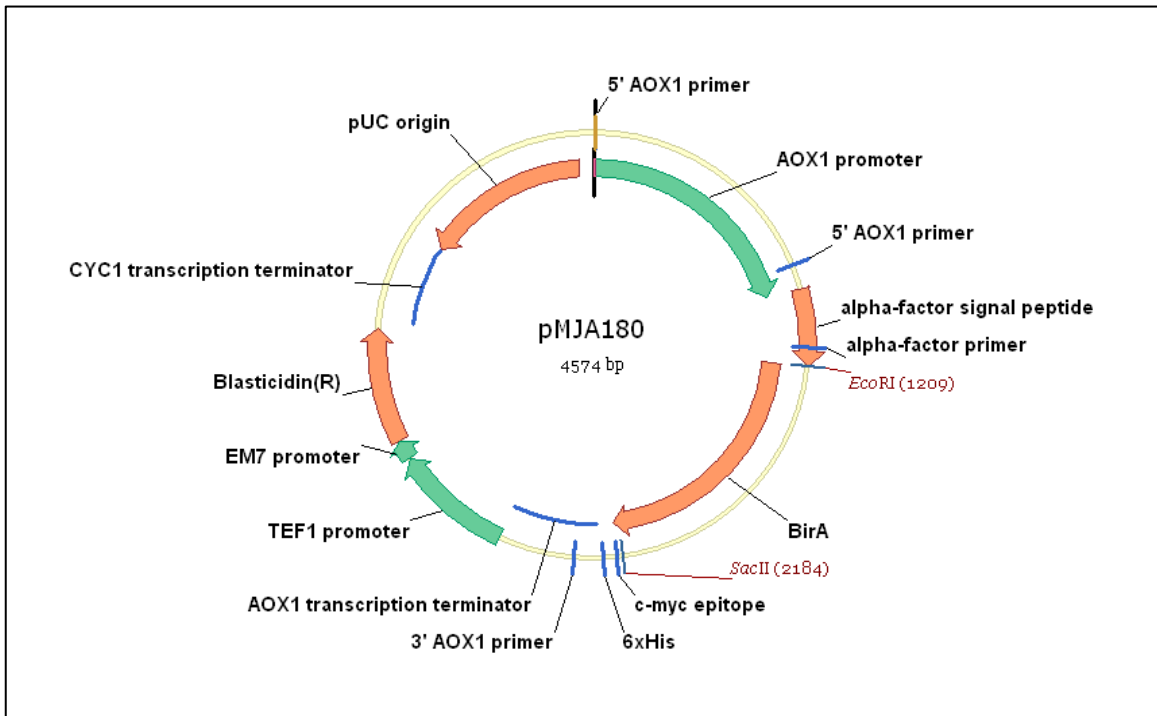


Figure II. pMJA180 vector containing BirA nucleotide sequence constructed in pPIC6aA plasmid (Blasticidin^r; integrative plasmid carrying the secretion signal sequence from the *S. cerevisiae* alpha factor prepro-peptide and functional sites for the integration at the 5'AOX1 locus of *P. pastoris* X-33).

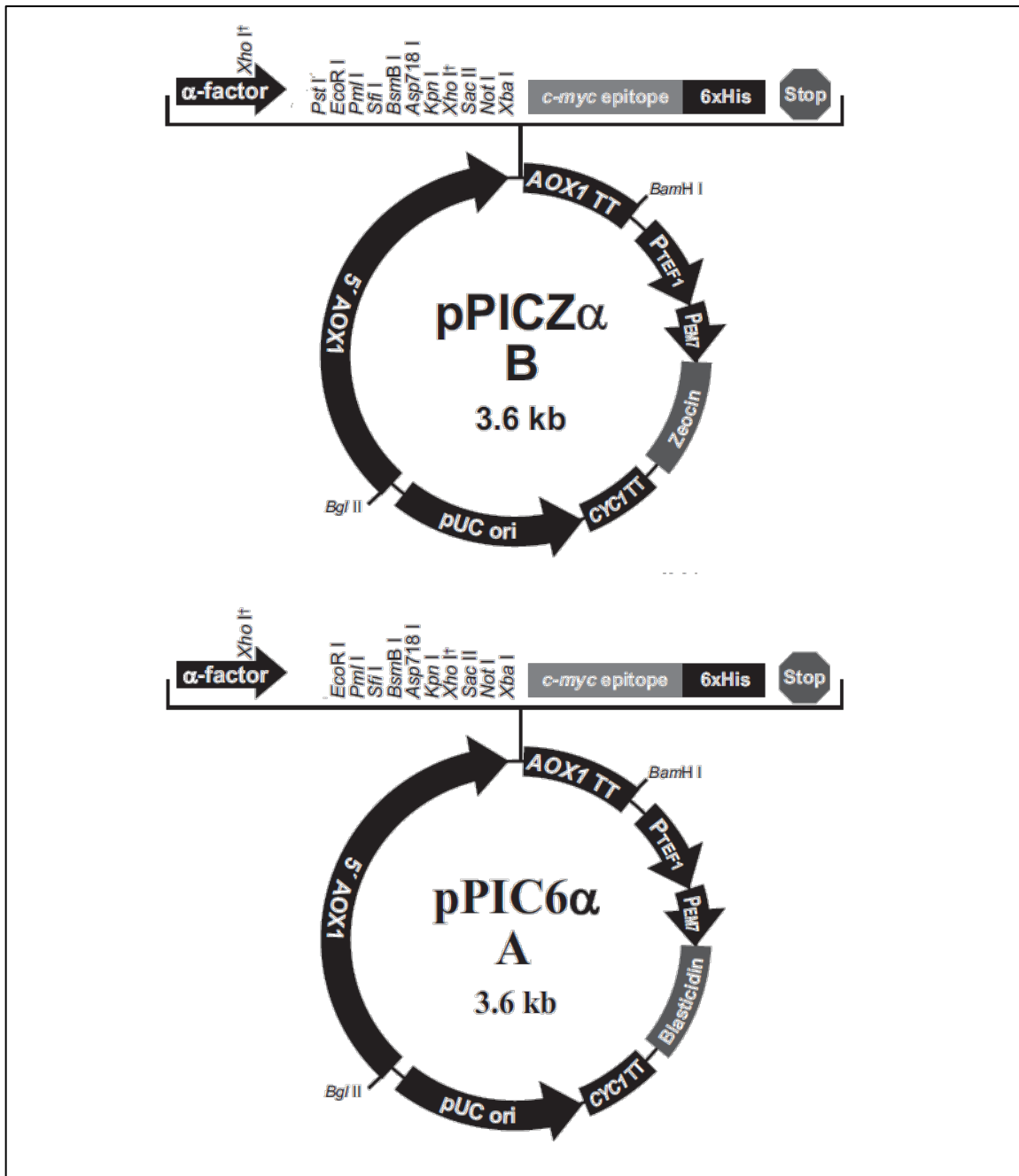


Figure III. Vector maps of pPICZ α B and pPIC6 α A summarizing the features of the vectors (Invitrogen™).

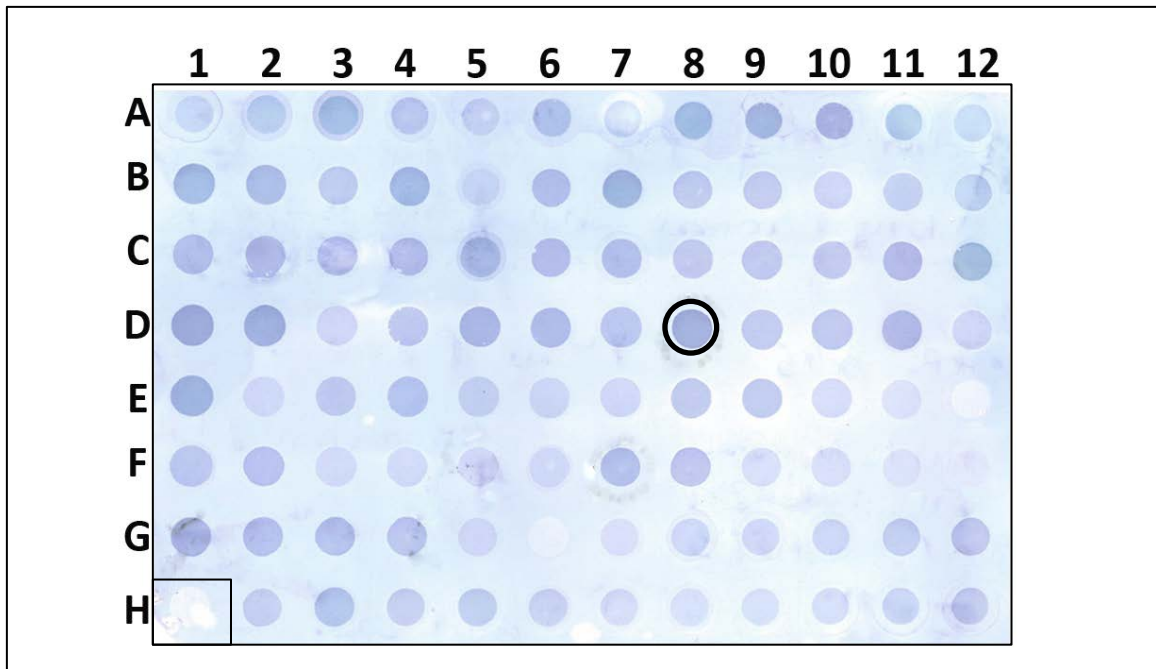


Figure IV. Dot blotting analysis of supernatants from 95 different *P. pastoris* clones transformed with pMJA181 plasmid after methanol induction to produce scFv conjugated with BAD. Clone pMJA181-D8 was selected for further experiments, as stated in the text. Supernatant coating H1 well is a negative control which came from a *P. pastoris* transformed with pPICZαB vector (*i.e.* plasmid without the scFv insert).

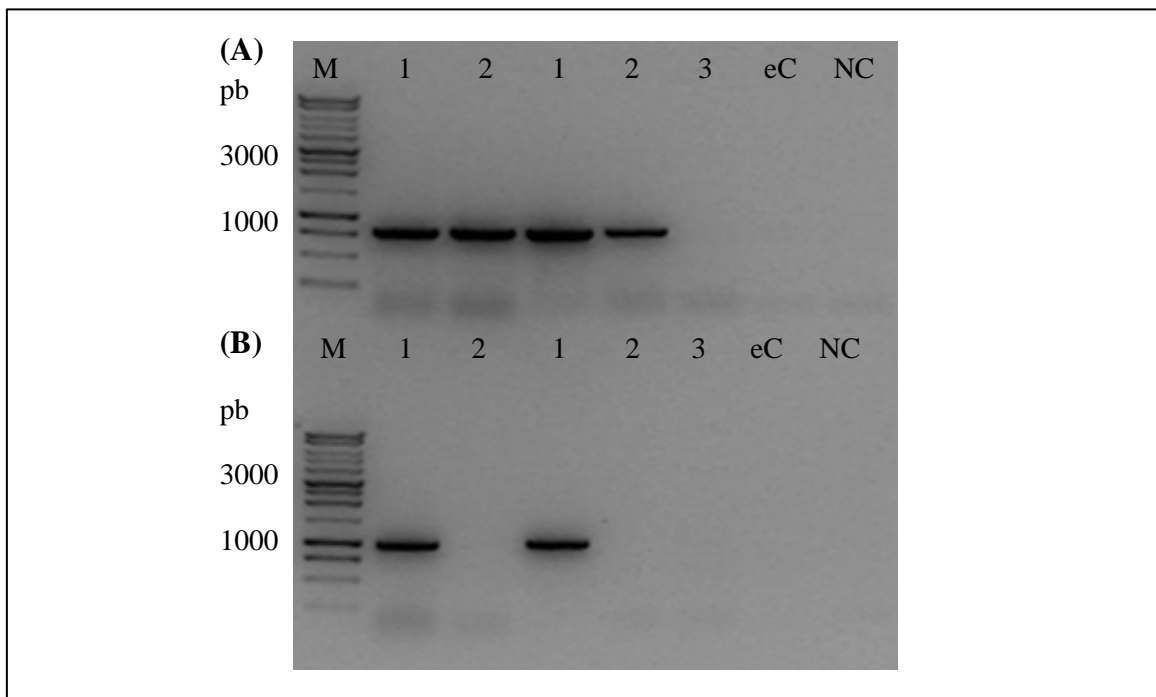


Figure V. Gel electrophoresis showing the PCR products obtained with primers **(A)** MJA254/MJA259, specific for scFv + BAD fragment, and **(B)** MJA255/MJA256, specific for BirA enzyme. (1) PdBSF clone; (2) pMJA181-D8 clone; (3) *P. pastoris* X-33; eC= DNA extraction negative control; NC= PCR negative control; M= 1 Kb ladder (Promega).

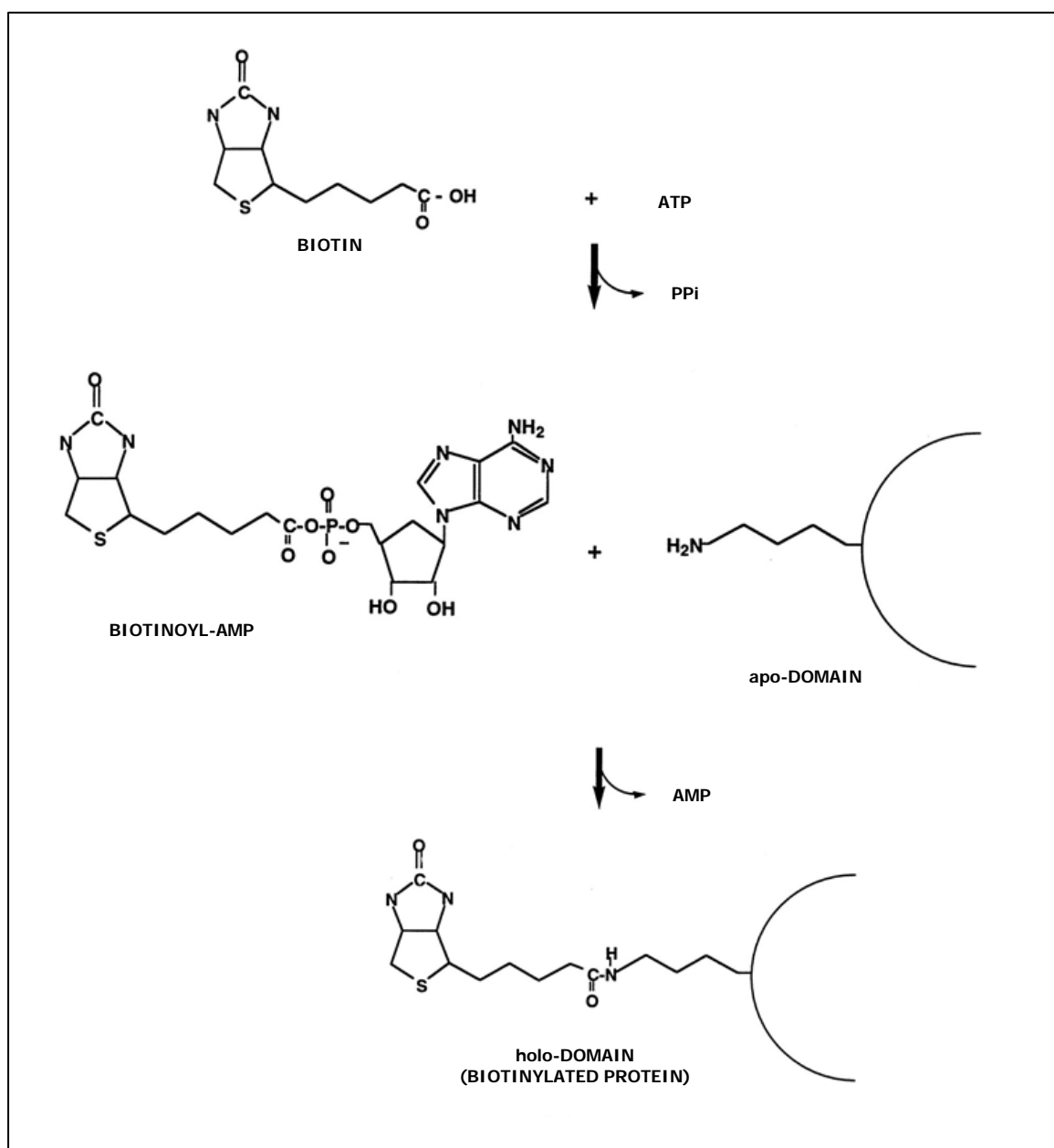


Figure VI. Biotin ligase reaction. During the first half of reaction, BirA catalyzes the attack of an oxygen atom of the biotin carboxylate on P α of ATP to form biotinoyl-AMP and pyrophosphate. Biotinoyl-AMP remains bound in the active site. In the presence of the apo form of the biotin-accepting domain of a biotin-requiring enzyme, the nucleophilic ϵ -amino group of the lysine to be modified attacks the mixed anhydride carbon atom, forming the amide bond between biotin and the lysine side chain with AMP as the other product. Once the amide bond is formed, the biotin moiety remains attached for the lifetime of the protein molecule (from Cronan *et al.*, 2000).

Table I: List of primers employed in this work.

| Primer | Sequence (5'→3') |
|---------------|--|
| MJA253 | CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTTC |
| MJA254 | AATTAAGTGCAGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGT |
| MJA255 | ATATTATGAATTCATGAAGGATAACACCGTGCCACTGA |
| MJA256 | ATAATATCCGCGGTTATTTTTCTGCACTACGCAGGGATATTTTC |
| MJA259 | CACCTTCGTGCCATTCGATTTTCT |
| MJA257 | AATTGCGGCCGCGGTCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGGCACGAAGGTGCTCTAGAAATT |
| MJA258 | AATTTCTAGAGCACCTTCGTGCCATTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTTCAGACCCGCGGCCGCAATT |

CAPÍTULO 9

DISCUSIÓN INTEGRADORA

El objetivo general de este trabajo de investigación ha consistido en el desarrollo de técnicas genéticas e inmunológicas para detectar la presencia de nuez de Brasil y de almendra en alimentos. Debido a sus características organolépticas y a las propiedades beneficiosas para la salud que se les atribuyen, estas dos especies de frutos de cáscara se utilizan ampliamente en la industria alimentaria, por lo que la gran mayoría de la población tiene acceso a su consumo. Sin embargo, como también pueden desencadenar reacciones alérgicas en individuos sensibles, distintos países han promulgado normas relativas a la declaración de su presencia en el etiquetado de los alimentos. Para cumplir con los requerimientos legales y proteger la salud de las personas alérgicas, las industrias alimentarias y las agencias reguladoras deben disponer de técnicas sensibles y precisas que permitan determinar la presencia declarada u oculta de estos frutos de cáscara en los alimentos.

Con esta finalidad, en esta tesis doctoral se han planteado dos metodologías diferentes: por una parte, se ha propuesto el desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real que permitan la detección específica de nuez de Brasil y almendra, tratando de mejorar los niveles de sensibilidad de los métodos disponibles, y además se ha propuesto una estrategia novedosa para el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), que emplea fago-anticuerpos recombinantes seleccionados por afinidad a partir de genotecas comerciales sintéticas. Esta estrategia, alternativa al empleo de anticuerpos producidos en animales, cumple con las directrices establecidas en la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos y, además, facilita la manipulación de la secuencia nucleotídica codificante de los anticuerpos, lo que permite producir anticuerpos con modificaciones funcionales predeterminadas para su utilización en distintas aplicaciones analíticas.

En este contexto, a lo largo de este trabajo, se han utilizado diversas técnicas microbiológicas, genéticas, cromatográficas y espectrométricas para la consecución de los objetivos que a continuación se detallan:

1. Detección de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*) y almendra (*Prunus dulcis*) en alimentos mediante PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis.
2. Selección de anticuerpos recombinantes (scFv) mediante la tecnología de *phage display* para la detección de nuez de Brasil y de almendra en alimentos.
3. Identificación y caracterización de las dianas moleculares reconocidas por los fago-anticuerpos recombinantes aislados frente a extractos de nuez de Brasil y de almendra.
4. Producción, en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, de scFv biotinilados *in vivo* específicos frente a las proteínas de almendra.

A continuación se resumen y valoran los principales resultados obtenidos en la consecución de los objetivos planteados¹.

9.1. DETECCIÓN DE NUEZ DE BRASIL (*Bertholletia excelsa*) Y ALMENDRA (*Prunus dulcis*) EN ALIMENTOS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL CON SONDAS DE HIDRÓLISIS

El primer objetivo de este trabajo consistió en el desarrollo de dos sistemas de PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis para la detección de la presencia de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*) y almendra (*Prunus dulcis*) en alimentos.

La técnica de PCR en tiempo real supone una alternativa a la técnica de PCR convencional. En ella se emplean equipos con detección espectrofluorimétrica que permiten realizar un seguimiento en tiempo real del proceso de amplificación del ADN. El sistema de PCR en tiempo real va registrando en cada ciclo de amplificación el incremento en la señal de fluorescencia, que es proporcional al aumento del número de copias de ADN. Esta información se refleja de manera gráfica en rectas de cinética de la reacción. Una de las principales ventajas de la técnica de PCR en tiempo real es que proporciona un resultado numérico en tiempo real que permite la cuantificación de la especie de interés y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (Bustin *et al.*, 2005; Wilhelm y Pingoud, 2003). Dado que el instrumento empleado en este trabajo para la realización de los análisis de PCR en tiempo real ha sido la plataforma LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), los valores obtenidos se han expresado en C_p , que es la nomenclatura propuesta por la compañía Roche.

Para la consecución de este primer objetivo se diseñaron parejas de cebadores específicos que permitieron la detección inequívoca de las especies objeto de estudio, seleccionando para ello marcadores genéticos que presentaran un grado de variabilidad interespecífica adecuado (D'Andrea *et al.*, 2011). Hasta el momento, los estudios encaminados a la detección de nuez de Brasil y de almendra en alimentos han empleado como marcadores genes nucleares de una sola copia, como los que codifican la albúmina 2S y la globulina 11S en el caso de la nuez de Brasil (Brezná *et al.*, 2010; Röder *et al.*, 2010), o los genes que codifican la proteína transportadora de lípidos no específica, la profilina, o la globulina 11S, en el caso de la almendra (Costa *et al.*, 2013b; Pafundo *et al.*, 2009; Prieto *et al.*, 2014; Röder *et al.*, 2011).

Las albúminas 2S conforman un grupo discreto dentro de las llamadas proteínas de almacenamiento de la semilla, que se encuentran ampliamente distribuidas tanto en plantas

¹ **Nota aclaratoria:** a lo largo de este capítulo se muestran los resultados descritos en los capítulos 3, 4, 5, 6, 7 y 8, y las conclusiones derivadas de estos. Para ello, se hará referencia a Figuras y Tablas de los capítulos citados, las cuales se reseñarán con el número del capítulo del que proceden y su número de identificación en el capítulo correspondiente.

monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Su papel es servir de reserva de nitrógeno, carbono y azufre durante la germinación y el crecimiento del plantón. En función de la especie de la que se trate, el contenido en albúmina 2S oscila entre el 20 y el 60 % del total de proteína de la semilla, siendo una particularidad reseñable en este grupo de proteínas su contenido excepcional en cisteína (Mills *et al.*, 2003; Shewry *et al.*, 2003). La fracción correspondiente a la albúmina 2S es una mezcla polimórfica de proteínas estructuralmente relacionadas que están codificadas por pequeñas familias de genes (en el caso de la nuez de Brasil se han encontrado al menos 6 isoformas de albúmina 2S). La proteína heterodimérica madura comprende subunidades de peso molecular en torno a 3000 y 9000 Da unidas mediante cuatro puentes disulfuro, las cuales se liberan a partir de una proteína precursora de 18 000 Da (Alcocer *et al.*, 2012; Breiteneder y Radauer, 2004; Monsalve *et al.*, 2003; Moreno y Clemente, 2008). La Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (WHO/IUIS, *World Health Organization/ International Union of Immunological Societies*) reconocen como alérgenos las albúminas 2S de algunas especies que aparecen en el Anexo II del Reglamento 1169/2011 (Tabla 9.1).

Tabla 9.1. Listado de especies recogidas en el Anexo II del Reglamento 1169/2011 que poseen una albúmina 2S reconocida como alérgeno por la WHO/IUIS.

| Especie | Nombre del alérgeno |
|--|---------------------------|
| Nuez de Brasil (<i>Bertolletia excelsa</i>) | Ber e 1 |
| Avellana (<i>Corylus avellana</i>) | Cor a 14 |
| Nuez (<i>Juglans regia</i> ; <i>J. nigra</i>) | Jug n 1; Jug r 1 |
| Anacardo (<i>Anacardium occidentale</i>) | Ana o 3 |
| Pacana (<i>Carya illinoensis</i>) | Car i 1 |
| Pistacho (<i>Pistacia vera</i>) | Pis v 1 |
| Mostaza (<i>Sinapis alba</i> ; <i>Brassica juncea</i>) | Sin a 1; Bra j 1 |
| Cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>) | Ara h 2; Ara h 6; Ara h 7 |
| Soja (<i>Glycine max</i>) | Gly m 8 |
| Sésamo (<i>Sesamum indicum</i>) | Ses i 1; Ses i 2 |

Para la detección de nuez de Brasil se estimó conveniente diseñar la pareja de cebadores en la región que codifica el gen de la albúmina 2S (*Ber e 1*). Esta decisión se tomó teniendo en cuenta la disponibilidad de diferentes entradas para el gen *Ber e 1* en la base de datos *Genbank/EMBL*. Como se señaló anteriormente, debido a la naturaleza multigénica de las proteínas vegetales, se debe evitar seleccionar regiones nucleotídicas específicas de una determinada isoforma a la hora de diseñar los cebadores, ya que esto podría dar lugar a la ausencia de amplificación del ADN en el caso de que la variedad analizada no presentara dicha isoforma.

Tomando en consideración los antecedentes expuestos, los cebadores para la detección específica de nuez de Brasil se diseñaron tras un minucioso estudio del alineamiento de diversas entradas existentes en la base de datos *GenBank/EMBL* para el gen *Ber e 1*, con el fin de seleccionar regiones nucleotídicas conservadas entre diferentes isoformas. Posteriormente, las regiones seleccionadas se alinearon y compararon con las secuencias nucleotídicas de los genes de la albúmina 2S de diferentes especies de frutos de cáscara y cacahuete, verificando así la idoneidad de los marcadores seleccionados. Los cebadores específicos diseñados para la nuez de Brasil (NBrazil-Fw2 y NBrazil-Rev2) acotan un fragmento de 131 pb del gen *Ber e 1*, que presenta un tamaño lo suficientemente pequeño para evitar la falta de amplificación del ADN en caso de que existiera degradación de la molécula debido, por ejemplo, a tratamientos térmicos como el tostado o la fritura.

En el caso de la almendra, el marcador genético empleado para diseñar los cebadores especie-específicos fue el espaciador interno de la transcripción 1, ITS1 (*Internal Transcribed Spacer 1*), que es parte integrante del cistrón nuclear del ARNr en los eucariotas. El cistrón nuclear de ARNr en los eucariotas está constituido por los genes ribosómicos 18S, 5.8S y 26S, dos espaciadores internos (ITS1 e ITS2) y el espaciador intergénico (IGS) (**Figura 9.1**). La unidad transcrita por la ARN polimerasa I contiene las regiones codificantes y espaciadoras, y parte del IGS. Posteriormente, el transcrito se procesa para dar lugar al ARN maduro, eliminándose los dos espaciadores internos de la transcripción. Cada uno de los locus de este cistrón está formado por cientos o miles de copias en tándem de la unidad transcripcional. Además, estas repeticiones en tándem aparecen en diferentes loci cromosómicos. Dado que en el ADNr nuclear del genoma de las plantas existen de cientos a miles de estas repeticiones, estas regiones se aíslan con mayor facilidad que la mayoría de los loci de bajo número de copias (Alvarez y Wendel, 2003; Corredor *et al.*, 2004).

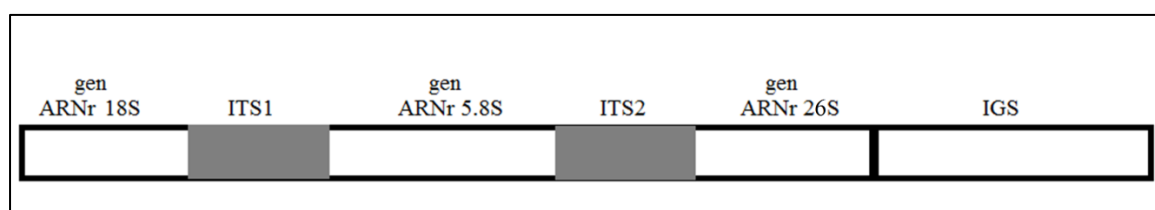


Figura 9.1. Estructura del ADN ribosómico. Se muestran las regiones codificadoras (18S, 5.8S y 26S), los espaciadores internos de la transcripción (ITS1 e ITS2) y el espaciador intergénico (IGS).

Los espaciadores internos de la transcripción son una de las regiones del genoma nuclear más utilizadas para realizar estudios evolutivos en diversos grupos de plantas. Debido a sus niveles de variación, la región ITS (constituida por el ITS1, el gen 5.8S y el ITS2) frecuentemente proporciona suficientes marcadores moleculares para el estudio evolutivo a nivel de especie. A lo expuesto anteriormente hay que sumar la disponibilidad de parejas de cebadores universales que funcionan en multitud de grupos taxonómicos, la presencia de estructuras multicopia que facilitan

la amplificación por PCR, y el tamaño moderado de la región ITS (650-900 pb), que permite la amplificación y secuenciación sin necesidad de emplear cebadores internos (Nieto Feliner y Rosselló, 2007; Schoch *et al.*, 2012).

El Consorcio del Código de Barras de la Vida (CBOL, *Consortium for the Barcode of Life*), si bien recomienda la combinación de dos loci (*rbcl* + *matK*) como códigos de barras para plantas terrestres, aconseja emplear las regiones ITS como un código de barras suplementario (CBOL Plant Working Group, 2009; Pang *et al.*, 2011). De hecho, el CBOL ha propuesto la región ITS como el código de barras universal para el reino *Fungi*.

Puesto que al comienzo del estudio no existían en la base de datos secuencias suficientes de la región ITS de la almendra, el primer paso fue obtener dichas secuencias. Para ello se empleó la pareja de oligonucleótidos ITS-1 e ITS-2, diseñados por Heath *et al.* (1995) a partir de las secuencias del ADNr de especies de mejillón (*Mytilus* spp.), pero modificando ligeramente el cebador ITS-2 para permitir la amplificación de la región ITS de especies de frutos de cáscara. Los cebadores ITS-1 e ITS-2 hibridan en regiones conservadas de los genes 18S y 26S respectivamente, por lo que el amplicón, de unos 650 pb, incluye las dos regiones espaciadoras internas de la transcripción, y la región conservada del gen ARNr 5.8S. De esta manera, se obtuvieron las secuencias nucleotídicas para tres variedades diferentes de almendra (Lauranne, Marcona y Nonpareil), que se incluyeron en la base de datos del *GenBank/EMBL* con los números de acceso [HF969277](#), [HF969276](#) y [HF969274](#), respectivamente. Cabe señalar que las tres secuencias mostraron un 100 % de homología. La pareja de cebadores, que acota un fragmento de 76 pb, se diseñó tras la comparación y el análisis informático del alineamiento de las secuencias de la región ITS de diversos frutos de cáscara, cacahuete, así como diferentes especies del género *Prunus*.

Un aspecto importante a tener en cuenta al realizar ensayos de PCR en tiempo real es verificar la ausencia de sustancias inhibitoras de la reacción de PCR. Los inhibidores de la reacción son un grupo heterogéneo de sustancias con diferentes propiedades y mecanismos de acción que pueden ocasionar la obtención de resultados inexactos e incluso, en el peor de los casos, pueden dar lugar a la aparición de falsos negativos (Nolan *et al.*, 2006; Schrader *et al.*, 2012). Por ello, además de los cebadores específicos de nuez de Brasil y de almendra, como control positivo de amplificación se empleó una pareja de cebadores universales de eucariotas (18SDir y 18SInv) diseñados en un trabajo previo (Pegels *et al.*, 2011b). Estos cebadores amplifican una región de 77 pb en el gen 18S ARNr de todas las especies eucariotas.

La detección de los productos amplificados mediante PCR en tiempo real se realizó mediante el empleo de sondas de hidrólisis (TaqMan®). Las sondas de hidrólisis son oligonucleótidos marcados con fluorocromos capaces de hibridar en regiones internas y específicas de la secuencia de ADN diana, evitando falsos positivos si se generan productos de

PCR inespecíficos o dímeros de cebadores. Con una temperatura de fusión 8-10 °C por encima de la de los cebadores, la sonda se alinea con la secuencia diana antes de que lo hagan los cebadores, para de ese modo asegurar la detección de la señal al producirse la extensión de la molécula de ADN a partir del cebador. De hecho, la temperatura de fusión de la sonda es un parámetro crítico: dado que la amplificación del ADN se inicia tan pronto como los cebadores se unen a la secuencia diana, la secuencia de hibridación de la sonda se enmascararía rápidamente con el ADN sintetizado *de novo* si la temperatura de fusión de la sonda fuese inferior a la de los cebadores. Por la actividad nucleasa 5' de la enzima Taq polimerasa, la sonda se hidroliza (de ahí el nombre de sonda de hidrólisis) cuando la enzima se encuentra con la sonda durante la extensión de los cebadores, liberando el fluorocromo FAM (denominado donador o *reporter*) del agente bloqueador (*quencher*). Cuando la sonda está íntegra, la proximidad de ambos fluorocromos provoca un mecanismo de transferencia de energía conocido como transferencia de energía de resonancia de Förster (*Förster resonance energy transfer*, FRET), que se traduce en el solapamiento de la excitación de un fluorocromo por el espectro de emisión del otro, bloqueándose la señal del fluorocromo donador. En el transcurso de la amplificación específica de la secuencia diana, cuando se hidroliza el extremo 5' de la sonda unida a la secuencia interna del amplicón, el donador se separa del agente bloqueador, con el consiguiente incremento en la señal fluorescente (Mackay y Landt, 2007). Tras la hidrólisis de la sonda, la polimerasa continúa con la síntesis del amplicón de ADN. En este trabajo se han empleado sondas de hibridación que sustituyen el agente bloqueador TAMRA por un bloqueador no fluorescente tipo BlackBerry® (BBQ), que está especialmente diseñado para no generar interferencias en aplicaciones de PCR múltiple.

El diseño de las sondas de hidrólisis empleadas en este trabajo se llevó a cabo mediante el análisis y comparación de las secuencias del gen *Ber e 1* en la nuez de Brasil, y de las secuencias de la región ITS1 de la almendra. El examen de los alineamientos permitió seleccionar zonas internas a las secuencias de ADN acotadas por los cebadores específicos anteriormente descritos.

El análisis estadístico de los datos obtenidos con los sistemas de PCR específicos de nuez de Brasil y almendra se realizó siguiendo la metodología propuesta por Camacho *et al.* (1993) y el procedimiento descrito por *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005). El tratamiento estadístico de los datos normalizados de las correspondientes mezclas binarias crudas y tratadas térmicamente permitió la validación del método para la detección de nuez de Brasil y de almendra en alimentos mediante el análisis de parámetros como la linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el *software* Statgraphic Centurion 15.2.14 (XV).

La especificidad de una técnica es su capacidad para medir un determinado analito en una muestra, sin que esta medida se vea afectada por la presencia de otros componentes o por el ruido de fondo (Bustin *et al.*, 2009). El estudio de los alineamientos de las diferentes secuencias nucleotídicas halladas en la base de datos permitió comprobar *in silico* que las regiones acotadas por los cebadores diseñados para este trabajo eran específicos de las especies objeto de estudio. Posteriormente, se evaluó la especificidad de los sistemas de PCR en tiempo real diseñados mediante el análisis de ADN obtenido a partir de diferentes especies vegetales y animales. En ambas situaciones, los sistemas de cebadores y sondas diseñados permitieron la amplificación del fragmento específico exclusivamente, no obteniéndose señal tras 50 ciclos de amplificación en el ADN extraído del resto de especies analizadas. En lo que respecta al control positivo de amplificación, se obtuvo señal de amplificación en todas las especies analizadas, por lo tanto indicando la ausencia de inhibidores de la reacción.

En este punto hay que señalar que debido al elevado número de cultivares de almendra existentes, la especificidad del sistema de PCR en tiempo real de almendra se comprobó analizando ADN procedente de los cultivares de almendra que se encuentran con mayor frecuencia en las tiendas de alimentación (Comuna, Marcona, California, Largueta). Además, la especificidad de la técnica desarrollada se corroboró mediante el análisis de 13 variedades de almendra proporcionadas por el IRTA (*Institut de Recerca I Tecnologia Agroalimentaries*, Tarragona) y el CEBAS-CSIC (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Murcia) (**Tabla 4.1**). La procedencia de los diferentes cultivares se detalla en la **Tabla 9.2**.

Los valores de C_p obtenidos al analizar el ADN extraído de los citados cultivares fueron similares a los obtenidos al analizar los de Comuna, Marcona, Largueta y California, con lo que podemos concluir no solo que diferentes cultivares de almendra poseen una secuencia similar de la región ITS, sino que también el número de copias de esta región es semejante entre distintos cultivares.

En el caso de la nuez de Brasil, estas son recogidas por trabajadores locales directamente del medio en regiones de Sudamérica, por lo que no se han desarrollado diferentes cultivares de esta especie.

En los ensayos de especificidad también se incluyeron muestras de ADN de especies representativas del género *Prunus* (al que pertenece la almendra), como el albaricoque (*Prunus armeniaca*), la cereza (*Prunus avium*), la guinda (*Prunus cerasus*), el melocotón (*Prunus persica*) y la ciruela (*Prunus domestica*). En ningún caso se amplificó el ADN de estas especies vegetales con el sistema específico de almendra, probándose por lo tanto la especificidad de la técnica desarrollada.

Tabla 9.2. Listado de cultivares de almendra analizados en este trabajo.

| Cultivar | Procedencia |
|------------|--|
| Vairo | |
| Marinada | |
| Constanti | |
| Tarraco | <i>Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Tarragona</i> |
| Masbovera | |
| Glorieta | |
| Francoli | |
| Guara | |
| Soleta | Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Zaragoza |
| Belona | |
| Antonietta | Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-Centro Superior de Investigaciones Científicas (CBAS-CSIC), Murcia |
| Marta | |
| Ferragnes | <i>Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Avignon, Francia</i> |
| Bitter | Desconocida |

Para evaluar la correlación entre los valores de C_p obtenidos en los ensayos de PCR en tiempo real y la concentración de la especie diana existente en la muestra, se construyeron rectas estándar a partir de diluciones de ADN de nuez de Brasil y de almendra, tanto cruda como tratada térmicamente (160 °C durante 13 min). Asimismo, se elaboraron rectas estándar a partir de mezclas binarias experimentales que contenían distintos porcentajes de la especie diana (nuez de Brasil o almendra) en una matriz de harina de trigo. Las mezclas binarias se analizaron crudas y tras someterse a un tratamiento térmico en el horno a 160 °C durante 13 min. Las **Figuras 3.3** y **3.4** muestran las rectas estándar obtenidas tras analizar las diluciones de ADN y mezclas binarias crudas y tostadas de nuez de Brasil. De forma similar, la **Figura 4.2** muestra la recta estándar obtenida en el análisis de las mezclas binarias de almendra.

La linealidad del método puede definirse como la habilidad de este para ofrecer resultados proporcionales a la cantidad de material de referencia presente en la muestra cuando se emplea una matriz determinada. Es decir, para un intervalo determinado de concentraciones, un incremento en la concentración del analito se debe corresponder con un incremento proporcional en el resultado (Camacho *et al.*, 1993).

La linealidad de la técnica se analizó a través de los siguientes parámetros:

- i. Test de Cochran, que determina si las varianzas de las respuestas obtenidas para cada concentración de ADN en las muestras presentan homocedasticidad. Es decir, si las varianzas son homogéneas, con un nivel de significancia de 0.05.
- ii. Cálculo de los parámetros de la recta de regresión: la pendiente "b" y la ordenada en el origen "a".

- iii. Interpretación estadística de la regresión mediante el coeficiente de correlación "r", que expresa estadísticamente la correlación entre los resultados obtenidos y la concentración del analito en las muestras, y el coeficiente de determinación "r²", que expresa cuantitativamente la correlación anterior.
- iv. La bondad del ajuste lineal, mediante el análisis de varianza (ANOVA) con carencia de ajuste, que determina si el modelo elegido es el adecuado para describir los datos observados con un nivel de confianza del 95 %.
- v. La sensibilidad de calibrado, que se corresponde con la pendiente de la recta "b", puesto que es un modelo lineal.
- vi. La sensibilidad analítica, que es la relación existente entre la probabilidad de obtener un resultado de forma aleatoria y las modificaciones debidas a las diferencias en la concentración del analito en cada mezcla. Este parámetro se calculó como el cociente entre la sensibilidad de calibrado y la media de las varianzas para todas las concentraciones.
- vii. La capacidad de discriminación, que es la menor diferencia en concentración de un analito que puede cuantificarse por el método de modo significativo. Se calculó como la inversa de la sensibilidad analítica multiplicada por un el valor *t* de Student adecuado.

La eficiencia de la técnica de PCR en tiempo real indica la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN en cada ciclo. Esta se calculó a partir de la pendiente de las rectas estándar de acuerdo con la siguiente fórmula (Bustin *et al.*, 2009):

$$E = [10^{(-1/b)} - 1] \cdot 100$$

Siendo "b" la pendiente de la recta. Para el sistema de detección de nuez de Brasil, la eficiencia de la amplificación fue del 97.2 % para las mezclas crudas y de 92.3 % para las mezclas tratadas térmicamente. En el caso del sistema de detección de almendra, la eficiencia de la amplificación fue del 92 % en las mezclas crudas y también en las tratadas térmicamente. La eficiencia de la técnica de PCR depende en gran medida de los cebadores empleados y de la existencia de estructuras secundarias en la secuencia nucleotídica diana. Un 100 % de eficiencia indicaría que la cantidad de producto de PCR se duplica en cada ciclo.

La sensibilidad de la técnica hace referencia al límite de detección (*limit of detection*, LOD) del ensayo, es decir, a la concentración mínima de la especie diana que el ensayo es capaz de detectar con confianza (UNE-EN 15842:2010). El LOD de ambas técnicas se calculó a partir de la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la recta, empleando para ello la ecuación

$$LOD = \frac{3.3 \sigma}{b}$$

donde "σ" es la desviación estándar de la respuesta, y "b" es la pendiente de la recta de calibración.

Los resultados de linealidad y sensibilidad correspondientes al análisis de las mezclas binarias crudas y tostadas de las especies diana empleando sondas de hidrólisis como sistema de detección se muestran en las **Figuras 3.3 y 3.4**, para la nuez de Brasil; **Figura 4.2**, para la almendra. Para el sistema específico de PCR en tiempo real de nuez de Brasil, la respuesta generada resultó ser lineal en el intervalo de concentraciones de 100 a 100 000 mg kg⁻¹. En el caso del sistema específico para la almendra, la respuesta fue lineal en todo el intervalo de concentraciones analizadas (de 0.1 a 100 000 mg kg⁻¹).

Los resultados de sensibilidad obtenidos muestran la existencia de diferencias en los LOD de los métodos desarrollados. El límite de detección conseguido con el sistema específico para nuez de Brasil fue 2.5 mg kg⁻¹, tanto en las mezclas crudas como en las tratadas térmicamente, mientras que el alcanzado por el sistema específico de almendra fue de 0.1 mg kg⁻¹ en ambas mezclas binarias. Esta diferencia en la sensibilidad puede atribuirse a la región seleccionada para el diseño de los cebadores y sonda específicos de especie. Para la nuez de Brasil, se seleccionó el marcador genético *Ber e 1*, mientras que para la almendra se seleccionó la región ITS1. Como se ha indicado anteriormente, la región ITS1 es un candidato adecuado para el diseño de cebadores, ya que debido al elevado número de copias de genes de ARNr, es más fácil amplificar incluso pequeñas cantidades de ADN, lo que contribuye a incrementar la sensibilidad del método (Suarez *et al.*, 2005). Además, la presencia de regiones multicopia permite recuperar un mayor número de copias intactas cuando la muestra está sometida a tratamientos térmicos intensos. En otros trabajos del grupo (López-Calleja *et al.*, 2013a), se ha podido observar el mismo fenómeno al comparar el LOD obtenido con una pareja de cebadores y sonda diseñados en el marcador genético *Ara h 2* (gen que codifica la albúmina 2S del cacahuete), que resultó ser de 10 mg kg⁻¹, con el LOD obtenido al diseñar la pareja de cebadores y sonda en la región ITS1 de cacahuete, que alcanzó los 0.1 mg kg⁻¹.

Otro factor que contribuye a la diferencia hallada en la sensibilidad de ambos métodos podría ser el tamaño del amplicón, de 131 pb para el sistema específico de nuez de Brasil, y de 76 pb para el de almendra. Dado que la degradación del ADN debida a los tratamientos térmicos intensos es un punto crítico en la técnica de PCR, la selección de un fragmento pequeño de ADN como diana resulta crucial para evitar la ausencia de amplificación. Cuando se diseña un sistema de PCR en tiempo real, los parámetros más importantes son el tamaño del amplicón y la temperatura de fusión de los cebadores y la sonda. Es deseable que el tamaño del amplicón sea inferior a 150 pb, e incluso se recomienda reducir su tamaño siempre que sea posible por debajo de las 80 pb. Los fragmentos más cortos se amplifican más eficazmente que los más largos, y toleran mejor las condiciones subóptimas de reacción. Esto se debe a que se desnaturalizan con mayor facilidad durante el paso a 92-95 °C, permitiendo a los cebadores y a la sonda competir más eficazmente con sus secuencias complementarias (Rodríguez-Lázaro, 2013).

La exactitud del modelo determina cuánto se acerca el valor analítico obtenido a la verdadera concentración de la especie diana existente en la muestra (Trapman *et al.*, 2009). Para medir la exactitud de la técnica se realizaron estudios de recuperación añadiendo una concentración conocida de la especie diana a una matriz de harina de trigo. De esta manera, se prepararon mezclas binarias de nuez de Brasil en harina (2.5, 5, 10, 100, 1000, 5000, 10 000 y 100 000 mg kg⁻¹) y de almendra en harina (0.1, 1, 10, 100, 1000, 10 000 y 100 000 mg kg⁻¹), se extrajo el ADN siguiendo el protocolo habitual de extracción, y se determinó la cantidad de analito detectada con el ensayo. A través de la *t* de *Student* se comprobó que el método era exacto, puesto que no existieron diferencias significativas entre el 100 % y los valores medios de recuperación, con un nivel de confianza del 95 %.

La precisión es un indicador de la reproducibilidad del ensayo. Mide el error o la variabilidad observada durante el análisis de una misma muestra. La repetibilidad proporciona información de la variabilidad que resulta de múltiples medidas de la misma muestra analizadas en el mismo ensayo en el mismo día (variación intraensayo). La reproducibilidad hace referencia a la variabilidad asociada al análisis de una misma muestra en diferentes días (variación interensayo) (Camacho *et al.*, 1993). De esta manera, la precisión del ensayo se evaluó comparando los coeficientes de variación (CV) de los valores obtenidos para una misma concentración analizada en tres experimentos de PCR en tiempo real realizados bien en el mismo día y en tres días diferentes. Con el estudio de la precisión se evalúa la influencia de sucesos aleatorios tales como el día del análisis, el analista, el equipo empleado, los reactivos, etc. Para los dos sistemas desarrollados, el análisis de varianza demostró que el factor "día de análisis" no tenía un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de recuperación, con un 95 % de nivel de confianza.

Una vez demostrada la eficacia de los sistemas de PCR en tiempo real para el análisis de las mezclas experimentales preparadas, se comprobó su idoneidad para la detección de nuez de Brasil o de almendra en productos comerciales de diversa naturaleza (chocolate, cereales, galletas, helados, etc.). En la mayoría de las ocasiones, la técnica de PCR en tiempo real permitió la detección de la especie diana declarada en el etiquetado de los productos comerciales (**Tabla 3.3; Tabla 4.5**). En el caso de los productos que declaraban contener nuez de Brasil, ya fuera como ingrediente o en cantidades traza, llaman la atención tres muestras de bombones de chocolate (de la misma marca comercial), en las que no se detectó la presencia de nuez de Brasil. No obstante, estas muestras sí se amplificaron correctamente con el sistema empleado como control positivo, con lo que se descartaría la presencia de inhibidores de PCR. Este resultado podría indicar un posible fraude derivado de la sustitución fraudulenta de la nuez de Brasil por otros frutos secos más económicos. Por otra parte, tampoco se detectó la presencia de nuez de Brasil en varios productos que declaraban contener trazas de este fruto seco, y solamente se detectó ADN de esta especie en 3 de los productos analizados que declaraban contener trazas de

frutos de cáscara. Estos resultados pueden deberse a que el contenido en nuez de Brasil de estos productos sea inferior al LOD de la técnica (2.5 mg kg^{-1}). También podría atribuirse a que en la misma fábrica se procesen otros productos que contengan nuez de Brasil como ingrediente, y los fabricantes prefieran alertar sobre la posible presencia de este fruto seco ante una hipotética contaminación cruzada para salvaguardar la salud de los consumidores alérgicos.

En el caso de la almendra, esta especie se detectó en los 28 productos comerciales que la declaraban como ingrediente. Es importante destacar que se reveló su presencia en un 40 % de los 123 productos analizados que no la declaraban en el etiquetado. En este grupo de productos se trató de estimar el contenido en almendra. Para ello se interpolaron los valores de los Cp obtenidos empleando la ecuación de regresión de la recta de referencia. También se estimó el contenido de almendra en las 6 muestras de productos comerciales en las que el etiquetado indicaba el porcentaje de este ingrediente. De la interpolación de los diferentes Cp obtenidos de los productos que no indicaban la presencia de almendra, se estimó que 40 de ellos contenían menos de 10 mg kg^{-1} , 7 productos tendrían entre 10 y 50 mg kg^{-1} , y 3 productos superarían los 50 mg kg^{-1} de almendra. Por otra parte, el contenido en almendra estimado con la técnica de PCR en tiempo real era inferior al indicado en el etiquetado del producto en las muestras comerciales que proporcionaban esta información. La cantidad de alérgeno puede subestimarse por varios motivos, dado que existen un gran número de factores que afectan al rendimiento de la extracción del ADN, como la degradación debida a tratamientos térmicos o la presencia de diferentes matrices alimentarias que podrían interferir con la reacción de PCR. En este sentido, la cuantificación de la especie diana en un producto requiere la preparación de diferentes rectas de calibrado en función de la naturaleza de la matriz de la muestra así como de su tratamiento térmico. Por lo tanto, para garantizar una cuantificación exacta de la concentración de la especie diana presente en los productos comerciales, sería necesario preparar rectas de calibrado a partir de mezclas de composición y tratamiento térmico idénticos al producto analizado. Sin embargo, teniendo en cuenta la miríada de ingredientes que se emplean en la preparación de los productos comerciales, así como la diversidad de tratamientos aplicados, la preparación de diferentes rectas de calibrado para cada tipo de producto no es factible desde el punto de vista práctico. Por esta razón, el empleo de los sistemas de PCR en tiempo real para el análisis de productos comerciales queda limitado a una detección cualitativa de la especie diana, no siendo posible realizar una cuantificación exacta de su contenido. A ello habría que sumar la complicación que supone determinar la cantidad exacta de alérgeno necesaria para desencadenar la reacción alérgica, ya que no existen estudios suficientes para determinarla, y además depende de la sensibilidad individual (Allen *et al.*, 2014; Crevel *et al.*, 2008). Por lo tanto, lo verdaderamente importante es desarrollar una técnica que permita la detección fiable de la especie diana en cuestión.

En los últimos años, las técnicas genéticas para rastrear la presencia de pequeñas cantidades de alérgenos ocultos en cualquier fase de la cadena de procesado han adquirido gran

popularidad. La técnica de PCR en tiempo real se ha convertido en una potente herramienta para la detección rápida, sensible y específica del ADN diana. Si las comparamos con las técnicas inmunoenzimáticas, las técnicas basadas en la detección de ADN presentan la ventaja de que el ADN se extrae de manera eficiente aún en condiciones desnaturalizantes severas.

El etiquetado incorrecto de los alimentos supone un peligro para aquellos consumidores sensibles a los alérgenos no declarados, así como un fraude comercial en el caso de sustituir total o parcialmente especies de alto valor comercial por otras especies de menor valor (Mafra *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que las técnicas de PCR en tiempo real propuestas, que emplean cebadores y sonda especie específicos para la detección de nuez de Brasil y de almendra, constituyen unas herramientas rápidas, sensibles, fiables, y con un gran interés en la industria alimentaria para comprobar la veracidad del etiquetado de los productos comerciales. Además, los sistemas desarrollados emplean un control positivo de amplificación basado en el gen 18S ARNr, que confirma la ausencia de falsos negativos. Las técnicas, que se han evaluado en una amplia gama de productos comerciales, pueden ser fácilmente implementadas en cualquier laboratorio analítico que disponga de equipos de PCR en tiempo real. Su utilización puede contribuir a garantizar el cumplimiento de las normas de etiquetado para proteger a los consumidores alérgicos, además de evitar prácticas fraudulentas por sustitución de estos productos en la elaboración de alimentos. Asimismo, pueden emplearse en programas de inspección para reforzar el etiquetado correcto de los productos comerciales, protegiendo tanto a los fabricantes como a los consumidores contra alérgenos ocultos.

En la bibliografía se dispone de muy pocas referencias de métodos analíticos para la detección de ADN de nuez de Brasil en alimentos. En este sentido, Röder *et al.* (2010), desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real y la compararon con un dispositivo de inmunocromatografía para la detección de proteína de nuez de Brasil (*ImmunoFast® Brazil nut*, ifp, Berlin). La secuencia diana seleccionada fue el gen que codifica la albúmina 2S de la nuez de Brasil (Números de acceso de *GenBank*: [M17146](#), [M80400](#), [X57027](#), [X57028](#), [X54490](#) y [AB044391](#)). Para los análisis de especificidad, analizaron 58 especies vegetales, no declarando reactividad cruzada en ninguna de ellas. Para evaluar la sensibilidad de la técnica, prepararon muestras de chocolate, masa y galletas cocinadas a las que añadieron cantidades conocidas de nuez de Brasil, detectando concentraciones de la especie diana de hasta 5 mg kg⁻¹. Además, reforzaron el estudio mediante el análisis de 15 muestras comerciales, cuyos resultados se confirmaron mediante inmunocromatografía. Por otra parte, Brežná *et al.* (2010) publicaron una técnica de PCR en tiempo real para la detección de nuez de Brasil desarrollando un sistema específico de cebadores y sonda, dirigidos a una región del gen que codifica la globulina 11S de la nuez de Brasil (número de acceso al *GenBank*: [AY221641](#)). Para comprobar la especificidad del método, analizaron el ADN procedente de 36 especies vegetales y animales, que no se amplificó

tras ser sometido al análisis. El LOD declarado era de 1000 mg kg^{-1} (0.1 % p/p). También analizaron 9 productos comerciales (solo 3 de ellos declaraban contener nuez de Brasil), obteniendo en todos los casos resultados en consonancia con la información declarada en el etiquetado. Finalmente, Hubalkova y Rencova (2011) desarrollaron una técnica de PCR convencional que permitió la detección simultánea de nuez de Brasil y pacana (*Carya illinoensis*). En el caso de la nuez de Brasil, la pareja de cebadores amplifica parcialmente la secuencia del gen *Ber e 1* (número de acceso al GenBank: [AB044391](#)). Los autores declararon un LOD de 1000 mg kg^{-1} (0.1 % p/p) cuando se analizaba una matriz compuesta por diferentes ingredientes (harina de trigo, de cebada, avena y chocolate) a la que se le habían añadido distintas concentraciones de nuez de Brasil. Hay que señalar que en la actualidad no hay kits comerciales disponibles para la detección de ADN de nuez de Brasil en alimentos.

El sistema de PCR en tiempo real con cebadores y sonda específicos para la detección de nuez de Brasil desarrollado en este trabajo posee un límite de detección de 2.5 mg kg^{-1} , siendo comparable al descrito por Röder *et al.* (2010) y al menos dos órdenes de magnitud más sensible que los demás estudios publicados sobre esta especie. Röder *et al.* (2010) declaraban detectar nuez de Brasil en 3 de las 8 réplicas correspondientes a la concentración de 2 mg kg^{-1} , mientras que en nuestro trabajo se ha detectado nuez de Brasil en 2 de las 6 réplicas de la mezcla correspondiente a 1 mg kg^{-1} , y en todas las réplicas correspondientes a la concentración de 2.5 mg kg^{-1} . Por otra parte, la técnica descrita por nuestro grupo de investigación presenta la ventaja de emplear un control positivo de amplificación (CPA), con lo que no es necesario confirmar los resultados obtenidos realizando una técnica inmunoenzimática en paralelo. La utilización del CPA evita falsos negativos debidos a la falta de ADN amplificable en la muestra o a la presencia de inhibidores de la polimerasa, puesto que en estos dos supuestos, la falta de amplificación de ADN también afectaría al CPA. Además, la especificidad del método desarrollado en este trabajo se ha comprobado frente a un mayor número de especies animales y vegetales, y su aplicabilidad se ha demostrado mediante el análisis de un mayor número de productos comerciales, si lo comparamos con los estudios anteriormente descritos.

Con relación a la detección de almendra, diversos grupos de investigación han desarrollado métodos basados en la técnica de PCR encaminados a la detección de este fruto seco en alimentos. En este sentido, cabe citar los estudios de Costa y colaboradores (2012b), que propusieron un método para la detección de almendra en alimentos procesados basado en un análisis de PCR en tiempo real que empleaba como secuencia nucleotídica diana el gen *AL60SRP* que codifica el alérgeno Pru du 5 (número de acceso en la base de datos de *Genbank*: [DQ836316](#)). Para desarrollar su trabajo no emplearon sonda de hidrólisis, sino el fluorocromo intercalador EvaGreen® (Biotium), combinado con el análisis de alta resolución de punto de fusión (HRM, *High Resolution Melting*), alcanzando una sensibilidad de 50 mg kg^{-1} (0.005 % p/p) cuando analizaban mezclas de almendra en una matriz de nuez. La especificidad del ensayo se

evaluó mediante el análisis de diferentes cultivares de almendra, así como de distintos frutos de cáscara y especies vegetales, entre las que se encontraban frutas de la familia *Rosaceae*. También analizaron 30 productos procesados que declaraban contener almendra u otros frutos secos. En un análisis previo mediante PCR convencional, consiguieron amplificar el ADN de los 12 cultivares de almendra analizados. Sin embargo también obtuvieron amplificación a partir de otros frutos secos (nuez, avellana y nuez de macadamia), si bien estas especies mostraron amplicones de longitudes distintas a las 90 pb esperadas para el fragmento correspondiente a la almendra. Los ADNs de cacahuete, soja y haba también mostraron bandas de amplificación inespecíficas. Es importante señalar que varias muestras de albaricoque (*P. persica*) y melocotón (*P. armeniaca*) analizadas mostraron un amplicón de 90 pb, debido posiblemente a la homología entre la almendra y otras especies del género *Prunus* en la secuencia nucleotídica del gen seleccionado para el diseño de cebadores. Tras someter las mismas muestras de ADN al análisis por PCR en tiempo real, consiguieron resultados similares a los de PCR convencional. A pesar de obtener fragmentos de un tamaño y temperatura de fusión similar, los autores defienden que mediante el análisis HRM fue posible discriminar la almendra de otras especies del género *Prunus*. En otro trabajo (Costa *et al.*, 2013b) los mismos autores proponen una técnica de PCR en tiempo real anidada, empleando como diana el gen *276NPL*, que codifica el alérgeno Pru du 6 (número de acceso en la base de datos de Genbank: [EU919663](#)), amplificado con dos parejas de cebadores con diferentes temperaturas de alineamiento y una sonda de hidrólisis. Con este sistema los investigadores obtuvieron un límite de detección de 50 mg kg⁻¹ en mezclas binarias de almendra y nuez. Los 12 cultivares de almendra analizados resultaron positivos en el sistema diseñado. No obstante, al igual que ocurría con el método anterior, con la técnica de PCR en tiempo real anidada, los autores encontraron reacciones cruzadas entre la almendra y el melocotón, el albaricoque y la nectarina (*P. persica* var. *nucipersica*).

Köppel *et al.* (2010) desarrollaron un sistema de PCR en tiempo real para la detección simultánea de almendra, huevo, leche y sésamo, declarando una sensibilidad de 50 mg kg⁻¹ cuando analizaban galletas de arroz a las que habían añadido diferentes concentraciones de almendra, pero encontrando un 21 % de falsos negativos en los resultados obtenidos. En este caso, la diana para la detección de almendra fue el gen *Pru A 1* (número de acceso en la base de datos de *Genbank*: [BQ641046](#)). Tal y como sucedió en el sistema desarrollado por Costa *et al.* (2013b), los investigadores encontraron problemas de reactividad cruzada cuando analizaron melocotón y albaricoque. Para validar la aplicabilidad del método, se analizaron un total de 50 muestras comerciales, encontrando almendra en todas aquellas que la declaraban en el etiquetado. Posteriormente, este mismo equipo (Köppel *et al.*, 2012) publicó un sistema de PCR en tiempo real para la detección simultánea de seis alérgenos, entre los que se incluyeron almendra, leche, huevo, sésamo, pistacho y nuez, llegando a detectar hasta 32 mg kg⁻¹ de almendra en salchichas cocidas y 5 mg kg⁻¹ de almendra en unas muestras de galleta adulteradas

con este fruto seco. En este sistema también aparecieron reacciones cruzadas con melocotón y albaricoque.

Röder y colaboradores (2011) desarrollaron un sistema de PCR en tiempo real con cebadores y sonda específicos frente al alérgeno Pru du 3 (número de acceso del GeneBank: EU424239), obteniendo un LOD de 5 mg kg⁻¹ en diferentes matrices (chocolate y galletas) a las que se les había añadido cantidades conocidas de almendra. Para lograr cebadores específicos frente a la almendra, introdujeron una discordancia en el cebador inverso, lo que daba lugar a 3 discordancias con los genes de otras especies del género *Prunus*, en comparación con una única discordancia para la almendra. A pesar de ello, tras analizar el ADN extraído del hueso de albaricoque, melocotón, nectarina y ciruela, se observó una ligera reactividad cruzada. Finalmente evaluaron la aplicabilidad de la técnica mediante el análisis de 24 muestras comerciales en las que detectaron trazas de almendra en 5 productos que no declaraban contener trazas de este fruto de cáscara (tres de ellas sí declaraban poder contener trazas de frutos secos). Los resultados obtenidos se confirmaron mediante dos ELISAS comerciales (r-biopharm y Neogen). Por su parte, Pafundo *et al.* (2009) diseñaron una pareja de cebadores específicos en el gen *Pru du 1*, empleando una técnica de PCR en tiempo real con SYBR Green, pero no proporcionaban la secuencia de acceso al GenBank, ni tampoco la secuencia de los cebadores empleados, alegando estar pendientes de patente. Posteriormente, estos investigadores (Pafundo *et al.*, 2010) emplearon el sistema anteriormente descrito en un ensayo múltiple de PCR en tiempo real para la detección de almendra, cacahuete, anacardo, nuez, sésamo y avellana, declarando un LOD para la almendra de 100 mg kg⁻¹.

Además de los trabajos publicados en la bibliografía científica, actualmente existen en el mercado kits comerciales que permiten la detección de ADN de almendra. *SureFood® Allergen Almond* (r-biopharm) permite la detección mediante PCR en tiempo real de hasta 4 mg kg⁻¹ (en función de la matriz analizada) de almendra, mientras que *AlmondKit Real-Time PCR (4LabDiagnostics)* permite la detección de hasta 100 mg kg⁻¹ (0.01 % p/p) de almendra en alimentos procesados.

Teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que el sistema específico de cebadores y sonda desarrollado en esta tesis doctoral para la detección de trazas de almendra en alimentos presenta una serie de ventajas con respecto a otros estudios publicados. En relación al LOD alcanzado, el valor obtenido es de 0.1 mg kg⁻¹, lo que convierte este método en el más sensible de los publicados hasta el momento. Además, no se encontraron amplificaciones inespecíficas a partir del ADN de ninguna de las especies analizadas, haciendo hincapié en las especies del género *Prunus*, al contrario de lo que ocurre en otros métodos. Por lo tanto, podemos afirmar que el sistema descrito en este trabajo puede aplicarse en las industrias alimentarias para corroborar la ausencia de trazas de almendra. Se lograría de ese modo reducir

la presencia no declarada de este fruto seco en alimentos, lo que evitaría reacciones alérgicas en individuos sensibles.

9.2. SELECCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES (scFv) MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE *PHAGE DISPLAY* PARA LA DETECCIÓN DE NUEZ DE BRASIL Y DE ALMENDRA EN ALIMENTOS

La tecnología del *phage display* consiste en la expresión de péptidos o fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de un bacteriófago (fago) en el que se ha insertado la secuencia de ADN que codifica la proteína expresada. Las proteínas exógenas expresadas en la superficie de fagos se pueden seleccionar por su afinidad o capacidad de reconocimiento de determinadas dianas moleculares. Los fagos empleados con mayor frecuencia son los filamentosos, tales como el M13, el Fd o el F1, en los que el péptido exógeno se expresa como fusión a una de sus proteínas de superficie, de las que existen cinco tipos diferentes: pVIII, pIII, pIV, pVII y pIX (Pande *et al.*, 2010; Sergeeva *et al.*, 2006). La proteína de superficie más empleada para el *phage display* es la pIII, ya que tolera inserciones de mayor tamaño. Esta proteína está implicada en la interacción fago-hospedador que tiene lugar durante la infección, mediando la entrada del virus en la célula (Hoogenboom, 2002; Scott *et al.*, 2008). La proteína pIII posee una secuencia señal localizada en el extremo N-terminal que la dirige a la membrana interna bacteriana antes del ensamblaje de los fagos, por lo que la secuencia nucleotídica de la proteína exógena debe insertarse entre el péptido señal y el extremo N-terminal de la proteína pIII manteniendo el marco de lectura.

Actualmente existen en el mercado diversos tipos de genotecas de fagos o agrupaciones de fagos recombinantes. Este abanico abarca desde genotecas que expresan una secuencia aleatoria de oligopéptidos hasta genotecas que expresan fragmentos de anticuerpos de diferente naturaleza. En este último grupo se encuentran los fragmentos Fab (*fragment antigen-binding*), que incluyen las regiones variables y la primera región constante de las inmunoglobulinas, solo los fragmentos variables de las cadenas ligera y pesada unidos por un péptido conector (scFv, *single-chain variable fragment*), o solo regiones variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos (dAb, *single-domain antibody*). Cuando se desea expresar un polipéptido de tamaño grande, como ocurre en el caso de los fragmentos de anticuerpos, es habitual el uso de fagémidos, que son vectores de clonación que contienen el origen de replicación y la señal de empaquetamiento del fago. En el caso de emplear fagémidos, las proteínas de superficie de tipo natural (*wild type*) y otros genes necesarios para el empaquetamiento del fago son proporcionadas por un fago ayudante (*helper phage*), que posee una señal de empaquetamiento defectiva. La coinfección de la bacteria hospedadora con el fagémido y el fago ayudante da lugar a viriones híbridos que exhiben pocas copias de la proteína de fusión y que contienen el genoma del fagémido.

El segundo objetivo de este trabajo consistió en el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) mediante una estrategia novedosa, que emplea fago-anticuerpos recombinantes seleccionados por afinidad a partir de genotecas comerciales sintéticas, para la detección de nuez de Brasil y de almendra. Para ello se emplearon las genotecas comerciales de fagos recombinantes Tomlinson I + J, construidas en el fagémido pIT2, que expresan fragmentos de anticuerpos de tipo scFv.

La selección de los clones de fagos con afinidad frente a nuez de Brasil y a almendra se realizó mediante un proceso de selección por afinidad conocido como *biopanning* (Parmley y Smith, 1988). Se trata de un método basado en el enriquecimiento secuencial de la genoteca de fagos con aquellos clones que presenten afinidad por el antígeno diana. Esto se consigue a través de una serie de etapas que comienzan con la inmovilización del ligando de interés en un soporte sólido. Se continúa con la exposición de la genoteca de fagos en solución, en forma de viriones purificados, para permitir que se produzca la unión al antígeno de los clones específicos, en el caso de que estos existan. Con el fin de favorecer la presencia de clones que reconozcan a la proteína de interés, y por lo tanto asegurar el éxito del proceso selectivo, es de vital importancia comenzar la primera ronda de selección con la mayor diversidad de clones posible. Así, para que en una genoteca de $1.5 \cdot 10^8$ variantes —como es el caso de las genotecas de fagos Tomlinson I + J— exista un clon de cada variante, se requiere la amplificación de la genoteca hasta títulos en torno a los 10^{12} - 10^{13} viriones por mililitro. Después de la exposición al antígeno, los fagos que no se hayan unido al mismo se retiran mediante un procedimiento de lavado. Para concluir, las variantes de fagos que permanecen unidas al ligando son eluidas por medio de un descenso brusco de pH o efectuando una digestión con tripsina. Los fagos eluidos se amplifican para obtener nuevos viriones que se emplearán en la siguiente ronda de *biopanning*. No obstante, debido a la existencia de uniones inespecíficas que limitan el enriquecimiento que puede lograrse por ronda de selección, en la mayoría de las ocasiones hay que realizar varias rondas de selección y amplificación para escoger aquellos clones de la genoteca que verdaderamente presenten afinidad específica por el antígeno (Bradbury *et al.*, 2011; Geyer *et al.*, 2012; Hammers y Stanley, 2014; Hoogenboom, 2005; Hudson y Souriau, 2003; Pande *et al.*, 2010; Rakonjac *et al.*, 2011; Tohidkia *et al.*, 2012).

Para seleccionar variantes de fagos que presentaran afinidad por las proteínas de la nuez de Brasil se plantearon dos estrategias de selección: la primera consistió en emplear como molécula diana la albúmina 2S de nuez de Brasil purificada mediante HPLC (la albúmina 2S de nuez de Brasil es el alérgeno principal de esta especie, y se conoce como Ber e 1), mientras que la segunda consistió en utilizar un extracto proteico total de nuez de Brasil. La albúmina 2S purificada, así como el extracto proteico total, se emplearon en experimentos independientes para tapizar las superficies de soporte. Sin embargo, para aislar variantes de fagos con afinidad

frente a las proteínas de la almendra, las superficies de soporte utilizadas se tapizaron exclusivamente con un extracto proteico total de esta especie.

Con objeto de minimizar la selección de variantes de fagos inespecíficas, se incluyó una etapa preliminar en cada ronda de selección por afinidad, que denominamos hibridación sustractiva o *panning negativo*, consistente en una incubación previa de la genoteca de fagos con un extracto proteico total de cacahuete (*Arachis hypogaea*) inmovilizado en la superficie de soporte. Además, se alternó la naturaleza de la superficie de soporte, empleando en la primera ronda de selección paletas de poliestireno, mientras que en la segunda ronda se emplearon esferas magnéticas que poseen grupos *p*-toluenosulfonilo. Estas últimas permiten la unión covalente de los grupos amino primarios o sulfidrilo de las proteínas mediante una reacción de sustitución nucleófila.

Tras finalizar las rondas de selección por afinidad, se comparó el número de fagos recuperados con el obtenido en la etapa anterior de *biopanning*. De ese modo, cuando se empleó como molécula diana el extracto proteico de nuez de Brasil, el número de fagos de la genoteca Tomlinson I eluidos durante la segunda ronda de selección experimentó un incremento de $2 \cdot 10^5$ veces con relación a los eluidos después de la primera ronda. En cuanto a la genoteca Tomlinson J, el número de fagos recuperados después de la segunda ronda fue unas 650 veces mayor que tras la primera. El incremento observado en el caso de la almendra fue algo menor, de $2 \cdot 10^3$ veces. En este caso cabe señalar que no se realizó *biopanning* con la genoteca Tomlinson J.

El aumento en el número de fagos eluidos conforme se suceden las rondas de selección está en consonancia con el enriquecimiento de la genoteca en variantes de fagos con afinidad por la molécula diana, por lo que puede considerarse como indicio de que el proceso selectivo está transcurriendo de manera satisfactoria. De todos modos, para comprobar que la genoteca verdaderamente se enriquecía con variantes de fagos afines a la nuez de Brasil o a la almendra, se realizó un ELISA indirecto en el que se evaluó la capacidad de los conjuntos de fagos eluidos tras cada ronda de *biopanning* para reconocer su molécula diana. Los resultados obtenidos en ELISA indirecto cuando se empleó la genoteca Tomlinson I y cuando se emplearon extractos totales de proteínas, pusieron de manifiesto que el incremento en el número de fagos recuperados tras la segunda ronda de selección efectivamente se debía al enriquecimiento de la genoteca en variantes de fagos afines por la molécula diana (**Figura 5.2** y **Figura 6.1**). Este resultado no se observó en el caso de la genoteca Tomlinson J. Por otra parte, cuando se empleó como diana la albúmina 2S de nuez de Brasil purificada no se produjo un aumento en la afinidad de los fagos con el avance del proceso iterativo, a pesar de incrementar el número de rondas de selección hasta cuatro, no lográndose el enriquecimiento de ninguna de las genotecas empleadas en variantes de fagos con afinidad por la albúmina 2S de nuez de Brasil. Por este motivo se descartó continuar con la estrategia de obtener clones de fagos afines mediante el empleo de proteína purificada como molécula diana.

Los conjuntos de fagos de la genoteca Tomlinson I que se aislaron tras el segundo ciclo de selección por afinidad frente a los extractos proteicos totales de nuez de Brasil y de almendra se emplearon como punto de partida para el aislamiento y estudio de 95 y 150 clones individuales, respectivamente. Con la intención de seleccionar fagos que mostraran afinidad exclusiva por la especie diana, se realizó un primer cribado enfrentando cada uno de los clones de fagos a un extracto proteico de nuez de Brasil o almendra, y a un extracto proteico de cacahuete. Del total de clones analizados frente a nuez de Brasil mediante ELISA, un 90 % reconocieron a la especie diana y no al extracto proteico de cacahuete, mientras que un 21 % del total de clones aislados frente a almendra mostraron afinidad por el extracto proteico de almendra, y no por el extracto proteico de cacahuete.

A la vista de los resultados obtenidos se seleccionaron 10 clones de fagos positivos frente a nuez de Brasil y 32 clones positivos frente a almendra, que se estudiaron en profundidad mediante PCR con cebadores específicos para comprobar la integridad del fragmento de anticuerpo codificado en el fagémido. En el caso de los clones aislados frente al extracto proteico de nuez de Brasil, todos mostraron un fragmento con un tamaño en torno a 620 pb. Un estudio exhaustivo con cebadores específicos para las cadenas ligera y pesada del scFv puso en evidencia que todos los clones aislados tenían el mismo tamaño y carecían de cadena pesada. De los 32 clones aislados frente al extracto proteico de almendra, el análisis por PCR puso de manifiesto que 9 de ellos tenían secuencias completas de ambas cadenas, ligera y pesada. Estos 9 clones se seleccionaron para su posterior estudio. Tras la secuenciación del ADN de los fagémidos seleccionados, se demostró que las secuencias nucleotídicas de todos los clones aislados para la nuez de Brasil eran idénticas. Sin embargo, de los 9 clones de almendra se obtuvieron 6 secuencias nucleotídicas diferentes, siendo una de ellas común en 4 clones. Tras realizar los ensayos de especificidad con los 6 clones positivos para almendra, se seleccionaron únicamente 2 clones que no manifestaron reacciones cruzadas con ninguno de los extractos proteicos de las diferentes especies vegetales y animales analizadas. Por lo tanto, la siguiente etapa del estudio se llevó a cabo con un único clon frente a la nuez de Brasil, que se denominó BE95, y con dos clones frente a la almendra, que se denominaron PD1F6 y PD2C9. Las secuencias aminoacídicas de los scFv expresados por los respectivos clones de fagos aislados en este trabajo se muestran en la **Figura 9.2**.

Una vez obtenidos y caracterizados los fagémidos que codifican scFv frente a nuez de Brasil y almendra, era necesario comprobar su capacidad para detectar la presencia de dichos frutos de cáscara en alimentos mediante técnicas de ELISA. Los scFv pueden emplearse en dos formatos: como scFv fusionado a la proteína pIII del fago (fago-anticuerpos), o como fragmentos scFv solubles. Para la producción de fragmentos solubles es necesario transformar con los fagémidos a una cepa diferente de *E. coli*, puesto que *E. coli* TG1 es una cepa supresora del codón ámbar (es decir, no es capaz de reconocer el codón TAG como codón de terminación,

traduciéndolo en su lugar como glutamina (Q)), por lo que el scFv se expresa como fusión a la proteína pIII del fago, dando lugar a un menor rendimiento en la producción de fragmentos solubles. La cepa de *E. coli* empleada para la producción de fragmentos solubles fue la HB2151 (K12 ara Δ (*lac-pro*) *thi/F' proA⁺B⁺ lac^f lacZ Δ M15*). Dado que esta cepa de *E. coli* no es supresora del codón TAG, es importante corroborar la ausencia de dicho codón en la secuencia nucleotídica codificante de los scFv seleccionados, puesto que en caso de que existiese un codón

| | | |
|-------|--|----------------|
| | H-CDR1 | H-CDR2 |
| PD2C9 | QPGGSLRLSCAAS GF TFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVST INNAGSSTC FADSVKGRFTISR | |
| PD1F6 | QPGGSLRLSCAAS GF TFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSA ITSYGS DTTYADSVKGRFTISR | |
| BE95 | ----- | ----- |
| | H-CDR3 | Linker |
| PD2C9 | DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KDATT FDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGST | |
| PD1F6 | DNSKNTLYLQMNSLRAEDTGVYYCA KSA YDFDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGST | |
| BE95 | -----MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAEVFDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGST | |
| | L-CDR1 | L-CDR2 |
| PD2C9 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQ SISSYLNWYQQKPKGKAPKLLI YAASSLQ SGVPS | |
| PD1F6 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQ SISSYLNWYQQKPKGKAPKLLI YSASALQ SGVPS | |
| BE95 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQ SISSYLNWYQQKPKGKAPKLLI YSASNLQ SGVPS | |
| | L-CDR3 | His-Tag |
| PD2C9 | RFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYY CQQA TNNPSTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHHGAA | |
| PD1F6 | RFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYY CQQGASD PTTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHHGPQ | |
| BE95 | RFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYY CQQTGY YPATFGQGTKVEIKRAAAHHHHHHGAA | |
| PD2C9 | EQKLISEEDLNGAA- | |
| PD1F6 | EQKLISEEDLNGAA- | |
| BE95 | EQKLISEEDLNGAA- | |

Figura 9.2. Secuencias aminoacídicas deducidas en el servidor web ExPASy de las secuencias nucleotídicas de los scFv específicos de nuez de Brasil (BE95) y de almendra (PD1F6 y PD2C9). Se indica la localización de las regiones determinantes de la complementariedad de los dominios variables de las cadenas pesada (H-CDR 1-3) y ligera (L-CDR 1-3).

de terminación TAG, se impedirá la producción de fragmentos solubles. Para la producción de fragmentos solubles de los tres scFv seleccionados en este trabajo se siguió el protocolo detallado en Rouet *et al.* (2012), con el que se consigue la producción de fragmentos solubles que se acumulan en la fracción periplásmica de la célula bacteriana gracias a la presencia de la secuencia líder *peB* fusionada al extremo N-terminal de los scFv (Frenzel *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2005). Posteriormente los fragmentos solubles se purificaron mediante cromatografía de afinidad con la ayuda de una columna Hi-Trap de proteína L (GE Healthcare Life Sciences, Múnich, Alemania), ya que la proteína L se une a las cadenas ligeras de los anticuerpos (Malpiedi *et al.*, 2013). Los fragmentos scFv solubles producidos frente a nuez de Brasil (clon BE95) y almendra (clones PD1F6 y PD2C) mostraron la capacidad de detectar a las proteínas de sus especies diana mediante la técnica de *dot blot*, pero estos scFv en el formato de fragmento soluble resultaron ser inapropiados para su utilización en la técnica de ELISA indirecto. Por este motivo, para la siguiente fase del estudio solo se emplearon scFv en el formato de fago-

anticuerpos, y no en el de fragmentos solubles, cuyo uso se postergó hasta optimizar su producción mediante el empleo de vectores de expresión adecuados.

Previamente a la realización de los ensayos de ELISA indirecto empleando los fago-anticuerpos, se titularon los fagos precipitados de los diferentes clones con el fin de optimizar el número de viriones por pocillo. Finalmente, se emplearon aproximadamente $2.5 \cdot 10^9$ viriones por pocillo del clon BE95, y alrededor de $3 \cdot 10^8$ viriones por pocillo de los clones PD1F6 y PD2C9.

La especificidad de los clones de scFv seleccionados se comprobó mediante el análisis de los extractos proteicos procedentes de distintas especies vegetales y animales (**Tabla 5.1** y **Tabla 6.2**). En los ensayos de especificidad, ninguno de los pocillos tapizados con los extractos proteicos de las especies que se muestran en las tablas desarrolló un valor de absorbancia superior a la absorbancia del blanco más 3 veces el valor de su desviación estándar.

La linealidad, sensibilidad e influencia del procesado en la capacidad de los fago-anticuerpos para detectar las proteínas diana se evaluó a partir de diversas mezclas experimentales. La **Figura 5.4** muestra las curvas estándar obtenidas tras analizar las diluciones de los extractos proteicos de nuez de Brasil cruda y tostada y tras analizar las mezclas binarias de harina de trigo y nuez de Brasil. Asimismo, las **Figuras 6.3** y **6.4** muestran las curvas estándar obtenidas tras analizar diluciones de los extractos proteicos de almendra cruda, tostada y esterilizada en autoclave, así como las mezclas binarias de harina de trigo y almendra. El LOD para ambas técnicas de ELISA se calculó siguiendo las directrices de la IUPAC (Thompson *et al.*, 2002), como la mínima concentración de proteína diana que mostrara un valor de absorbancia mayor que el valor medio de absorbancia del blanco más tres veces su desviación estándar, con los datos obtenidos tras la realización de 20 experimentos. Finalmente, para determinar la concentración de proteína correspondiente al LOD se interpoló el valor de absorbancia obtenido en las respectivas curvas estándar. Los límites de detección de la técnica de ELISA indirecto empleando los fago-anticuerpos BE95, PD1F6 y PD2C9, en las diferentes condiciones ensayadas, se muestran en la **Tabla 9.3**.

Los fago-anticuerpos recombinantes pueden reconocer a una secuencia continuada de la cadena aminoacídica (en el caso de tratarse de epítomos lineales), o bien una región determinada de la estructura tridimensional de la proteína (en el caso de ser epítomos conformacionales) (Mills *et al.*, 2003; van Hengel, 2007). Por otra parte, aunque los alimentos pueden consumirse crudos, con frecuencia son sometidos a diferentes técnicas de procesado (hervido, tostado, fritura, fermentación, etc.). Estas condiciones pueden romper o modificar la conformación de la proteína diana, destruyendo su estructura tridimensional, o exponiendo nuevos epítomos que no eran accesibles anteriormente, afectando a la capacidad de los anticuerpos de reconocer su molécula diana (Paschke, 2009; Sathe *et al.*, 2005). Además de destruir, exponer u ocultar epítomos reconocidos por los anticuerpos, el procesado de los alimentos también influye en la solubilidad

de las proteínas, reduciendo la cantidad total de proteína extraída en relación con los extractos crudos, lo cual puede llevar a subestimar el contenido real del alérgeno (Sathe *et al.*, 2002). Una solución a este problema sería, siempre que fuese posible, seleccionar la proteína diana en función de su estabilidad térmica (Arif *et al.*, 2007; Fuller *et al.*, 2006).

Tabla 9.3. Comparación de los LOD obtenidos con los distintos fago-anticuerpos en las técnicas de ELISA indirecto desarrolladas para detectar nuez de Brasil y almendra.

| Identidad del clon | Muestra analizada | LOD |
|--------------------|---|--------------------------|
| BE95 | Nuez de Brasil cruda en tampón fosfato (PBS) | 900 ng mL ⁻¹ |
| | Nuez de Brasil tostada (160 °C durante 13 minutos) en PBS | 400 ng mL ⁻¹ |
| | Nuez de Brasil cruda en una matriz de harina de trigo | 5000 mg kg ⁻¹ |
| PD1F6 | Almendra cruda en PBS | 40 ng mL ⁻¹ |
| | Almendra esterilizada en autoclave (121 °C durante 15 minutos) en PBS | 70 ng mL ⁻¹ |
| | Almendra tostada (160 °C durante 13 minutos) en PBS | 100 ng mL ⁻¹ |
| | Almendra cruda en una matriz de harina de trigo | 110 mg kg ⁻¹ |
| PD2C9 | Almendra cruda sin matriz alimentaria | 90 ng mL ⁻¹ |
| | Almendra esterilizada en autoclave (121 °C durante 15 minutos) en PBS | 50 ng mL ⁻¹ |
| | Almendra tostada (160 °C durante 13 minutos) en PBS | 250 ng mL ⁻¹ |
| | Almendra cruda en una matriz de harina de trigo | 120 mg kg ⁻¹ |

Una característica importante que deben reunir los métodos analíticos para la detección de alérgenos en alimentos, además de ser altamente específicos y sensibles, es que no deben verse afectados por la presencia de otros componentes de la matriz alimentaria. Puesto que la técnica de ELISA no conlleva una separación física de las proteínas, los anticuerpos utilizados podrían exhibir reacciones cruzadas con distintos componentes del alimento, dando lugar a la aparición de falsos resultados positivos (van Hengel, 2007). Por otra parte, se ha demostrado que ciertos componentes presentes en la matriz alimentaria pueden inhibir la extracción de proteínas o interferir en la detección de los analitos, por lo que se recomienda el uso de aditivos de extracción, como la gelatina de pescado, la leche desnatada o la albúmina sérica bovina para facilitar la extracción de las proteínas diana (Lee y Taylor, 2011). En este trabajo, la influencia de la matriz alimentaria sobre la fiabilidad de los ensayos realizados, se ha evaluado mediante el análisis de mezclas binarias de la especie diana (nuez de Brasil o almendra) en harina de trigo, en un intervalo de concentraciones de 10⁵-10 mg kg⁻¹.

Las gráficas de concentración-respuesta obtenidas se ajustaron a una curva sigmoidea de cuatro parámetros con ayuda del programa informático Origin 8.0 (OriginLab Corp.). Los datos se analizaron para evaluar su significatividad estadística mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, y la prueba de diferencia significativa mínima de Fisher (Fisher's LSD, *Fisher's Least significant difference*).

Aunque la dosis mínima de proteína alergénica necesaria para desencadenar una reacción alérgica en individuos sensibles no se conoce con precisión y depende de la sensibilidad individual, existe un consenso científico para establecer los límites de sustancias capaces de desencadenar reacciones alérgicas en torno a 1-100 mg kg⁻¹, en función del alimento (Taylor *et al.*, 2002; Wensing *et al.*, 2002). Por lo tanto, la sensibilidad de la técnica de ELISA debería ser suficiente para detectar alérgenos en ese intervalo de concentraciones. Analizando en conjunto los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que la técnica de ELISA desarrollada para detectar nuez de Brasil en alimentos es específica, pero no lo suficientemente sensible (5000 mg kg⁻¹) para satisfacer los requisitos que deben poseer las técnicas de detección de alérgenos para proteger a las personas sensibles. En lo que respecta a la almendra, la técnica de ELISA desarrollada, además de ser específica, tiene una sensibilidad suficiente (110-120 mg kg⁻¹) para satisfacer el criterio de seguridad anteriormente citado.

Una vez demostrada la eficacia de las técnicas de ELISA indirecto empleando fago-anticuerpos para el análisis de las mezclas experimentales de nuez de Brasil y de almendra en harina de trigo, se validó su aplicabilidad para el análisis de productos comerciales reales.

En la mayor parte de las muestras comerciales estudiadas, la técnica de ELISA indirecto permitió la detección de la especie diana declarada en el etiquetado (**Tabla 5.3; Tabla 6.3**). Con el fin de corroborar el resultado obtenido mediante la técnica de ELISA, las muestras de alimentos comerciales se analizaron paralelamente mediante PCR en tiempo real con los sistemas de cebadores y sonda especie-específicos desarrollados anteriormente. En el caso de los productos que declaraban en su etiquetado contener nuez de Brasil, ya fuera como ingrediente o como trazas, los resultados obtenidos mediante las dos técnicas coinciden. Únicamente, en el caso de una barrita de cereales que declaraba contener nuez de Brasil como ingrediente, se amplificó ADN de nuez de Brasil mediante PCR en tiempo real, pero no fue posible detectar proteínas de esta especie con los fago-anticuerpos del clon BE95. La ausencia de resultado positivo en dicha muestra posiblemente sea debida a que la concentración de nuez de Brasil es inferior al LOD alcanzado con el fago-anticuerpo BE95. En lo que respecta a las 15 muestras de chocolate que declaraban contener trazas de nuez de Brasil, la ausencia de detección tanto de proteína como de ADN puede deberse a que el contenido en nuez de Brasil en los productos comerciales sea inferior al LOD alcanzado por ambas técnicas, o a que se trate de un etiquetado preventivo.

Utilizando la técnica de ELISA para la detección de almendra, se obtuvieron resultados coincidentes entre las técnicas de PCR y ELISA para todos los productos comerciales que declaraban almendra como ingrediente, salvo en el caso de las muestras de bebida de almendra. La hipótesis planteada para explicar esta discrepancia fue la posible destrucción del epítipo reconocido por el fago-anticuerpo durante el procesado de la bebida. Dado que ciertas proteínas incrementan su termoestabilidad cuando se encuentran en sistemas de baja actividad de agua

(Mills *et al.*, 2003), podría suceder que las proteínas en solución acuosa fuesen más termosensibles que cuando se encuentran englobadas en una matriz alimentaria. Para confirmar esta hipótesis, los extractos de proteína de almendra se calentaron a 100 °C durante diferentes intervalos de tiempo (1, 5 y 10 minutos). Estos extractos se emplearon junto al extracto sin tratar para tapizar los pocillos de las placas de ELISA. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que los dos fago-anticuerpos (PD1F6 y PD2C9) perdían la capacidad de reconocer el extracto de almendra cuando éste se calentaba durante 5 y 10 minutos. Sin embargo, la capacidad de detección de la técnica no se vio afectada cuando la almendra molida se trató térmicamente mediante calor seco (tostado a 160 °C durante 13 minutos) o húmedo (en autoclave a 121 °C durante 15 minutos), sin encontrarse disuelta en una fase acuosa. Por lo tanto, los resultados obtenidos permiten concluir que el calentamiento de los extractos proteicos a 100 °C durante más de un minuto en presencia de un elevado contenido acuoso provoca la desnaturalización irreversible de los epítomos de almendra reconocidos por los fago-anticuerpos empleados en la técnica de ELISA. Esta observación es compatible con la ausencia de respuesta de los fago-anticuerpos frente a las muestras de bebida de almendra, puesto que este producto sufre un tratamiento de ultrapasterización durante su procesado. En este sentido, los resultados obtenidos están en consonancia con los descritos por Dhakal *et al.* (2014), quienes observaron una disminución de la inmunorreactividad de las proteínas de almendras tras someter la bebida de almendra a un tratamiento térmico superior a 85 °C durante más de 300 s.

El análisis de algunos productos que declaraban contener trazas de almendra o de frutos secos produjo resultados negativos en la técnica de ELISA y positivos en la de PCR en tiempo real. En estos casos se interpoló el valor de C_p obtenido tras analizar los productos por PCR en tiempo real en la recta patrón que se muestra en la **Figura 4.2**, con el propósito de obtener un valor aproximado de la concentración de almendra existente en los productos comerciales señalados. Los resultados de PCR en tiempo real de los productos que mostraban discrepancias entre ambas técnicas produjeron valores de C_p superiores a 35, lo que equivaldría a una concentración de almendra en torno a 30 mg kg⁻¹ si se interpolaran los valores de C_p en la recta patrón. Esta concentración se encuentra por debajo del LOD conseguido por el ELISA indirecto empleando fago-anticuerpos, por lo que las discrepancias observadas en los resultados se explicarían por este motivo. En todo caso, hay que señalar que la técnica de PCR en tiempo real no pretende dar un valor exacto de concentración de almendra, puesto que, como se expuso con anterioridad, la eficiencia en la extracción de ADN puede verse afectada por el procesado al que se somete al producto alimentario, así como por los diferentes componentes de la matriz alimentaria. Por esta razón, para que los valores de la recta patrón fuesen verdaderamente representativos, los análisis deberían de realizarse en matrices alimentarias semejantes a la del producto que se desea analizar. No obstante, desde un punto de vista práctico, esta aproximación no es factible. Otra alternativa, que tampoco está disponible en la actualidad, implicaría el uso de estándares de referencia comunes (Lutter *et al.*, 2011; Paschke, 2009; Sathe

et al., 2005; Thompson *et al.*, 2002). Finalmente, se analizaron 15 productos que no declaraban contener frutos secos, observándose en tres de ellos la presencia de ADN, pero no de proteína de almendra, lo cual se puede atribuir a la menor sensibilidad de la técnica de ELISA con el fago-anticuerpo PD1F6, comparada con la técnica de PCR en tiempo real.

Varios investigadores han desarrollado técnicas inmunoenzimáticas para la detección de nuez de Brasil en alimentos. En este sentido, podemos señalar el trabajo de Blais *et al.* (2002), quienes desarrollaron un enzimoimmunoanálisis en el que empleaban anticuerpos IgY obtenidos de yema de huevo frente a la albúmina 2S de la nuez de Brasil. Con la técnica desarrollada alcanzaron un LOD inferior a 1 mg kg^{-1} de nuez de Brasil en diferentes matrices (chocolate con leche, cereales de desayuno, muesli, granola, entre otros) a las que habían añadido cantidades conocidas de este fruto seco. Tras analizar 5 ingredientes que contenían albúmina 2S, entre los que se incluían dos frutos secos (avellana y cacahuete), no observaron reacciones cruzadas. Por su parte, Clemente *et al.* (2004) publicaron un ELISA competitivo indirecto para la detección de nuez de Brasil en el que empleaban anticuerpos policlonales de conejo frente a la albúmina 2S de esta especie, con el que alcanzaron un LOD de 1 mg kg^{-1} . Tras analizar otros frutos secos (pacana, nuez, anacardo, avellana y almendra) y legumbres (garbanzo, cacahuete y guisante), no observaron reacciones cruzadas. También analizaron 11 productos comerciales de los que 3 declaraban contener nuez de Brasil. En esos 3 productos, el método descrito fue capaz de detectar la presencia de ese fruto seco. Sharma *et al.* (2009), desarrollaron un ELISA competitivo en el que empleaban anticuerpos policlonales de conejo para la detección de la globulina 11S de nuez de Brasil, con un intervalo de detección de 10 a 90 ng mL^{-1} . Sin embargo, en el estudio de especificidad, los autores declararon la aparición de reacciones cruzadas con la canela (*Cinnamomum verum*). Finalmente, Ben Rejeb *et al.* (2005) publicaron un ELISA competitivo indirecto en el que emplearon anticuerpos policlonales de conejo para detectar simultáneamente la presencia de cacahuete, avellana, almendra, anacardo y nuez de Brasil, empleando una matriz de chocolate para realizar las curvas estándar. En estas condiciones, el LOD que declaraban fue inferior a 1 mg kg^{-1} para cada una de las proteínas diana. Sin embargo, los autores manifestaron que todos los anticuerpos empleados, salvo el de nuez de Brasil, exhibían un efecto matriz con el chocolate, por lo que necesitaban incluir un extracto de chocolate como referencia en todos los experimentos. Además, en el caso particular de la almendra, los anticuerpos mostraron reacciones cruzadas con la proteína de anacardo, y en menor medida con el trigo, el arruruz (*Maranta arundinacea*), el pollo, el cerdo y el cordero. En la bibliografía consultada aparecen otros métodos inmunoenzimáticos para la detección de proteína de almendra en alimentos, como el publicado por Acosta *et al.* (1999), que empleó anticuerpos policlonales de conejo frente a la globulina 11S de almendra. Aplicando la técnica de ELISA indirecto, consiguieron detectar hasta $1\text{-}10 \text{ ng mL}^{-1}$ de proteína de almendra, mientras que con un ELISA competitivo obtuvieron un LOD de 300 ng mL^{-1} . La especificidad de la técnica se estudió analizando diversos cultivares de almendra (Mission, Neplus, Peerless, Carmel y Nonpareil), consiguiendo detectar a la proteína

diana en todos ellos. No obstante, estos investigadores declararon la existencia de reacciones cruzadas con la globulina 13S de anacardo, y las faseolinas (globulina 7S) de frijol (*Phaseolus acutifolius*) y judía (*Phaseolus vulgaris*). Asimismo, hallaron una reducción en la inmunorreactividad de los extractos proteicos tras someterlos a diferentes tratamientos térmicos. Por otra parte, Hlywka *et al.* (2000) desarrollaron un ELISA tipo sándwich en el que empleaban anticuerpos policlonales de oveja (anticuerpo de captura) y conejo (anticuerpo de detección), capaz de detectar concentraciones inferiores a 1 mg kg⁻¹ de almendra. Sin embargo, observaron que los anticuerpos de oveja reconocían también las nueces de nogal negro (*Juglans nigra*), la nuez de Brasil, los anacardos, las avellanas, la nuez de macadamia, el pistacho y el sésamo. Por último, el equipo de investigación de Su *et al.* (2013), propuso un ELISA en el que se empleaban anticuerpos policlonales de conejo como anticuerpo de captura, y anticuerpos monoclonales de ratón para la detección de almendra en alimentos (en concreto, la proteína diana era la globulina 11S de almendra). La sensibilidad declarada fue de 3 a 200 ng mL⁻¹. Tras analizar diversos extractos proteicos de especies animales y vegetales, no observaron reactividad cruzada.

Al igual que sucede con las técnicas genéticas, en la actualidad existen kits de ELISA comerciales para la detección de nuez de Brasil y de almendra en alimentos (**Tabla 2.1**). El límite de detección declarado en todos ellos es inferior a 2 mg kg⁻¹. El formato de ELISA más popular en estos kits es el tipo sándwich, en el que un anticuerpo de captura destinado a retener los antígenos de la muestra está tapizando la superficie del pocillo. Posteriormente, los posibles antígenos capturados se detectan con un anticuerpo secundario, que a su vez está conjugado con una enzima que convierte el sustrato en un producto fácilmente detectable. Entre los métodos inmunológicos que se comercializan en forma de kits, tienen también interés los dispositivos de flujo lateral (**Tabla 2.2**), que presentan como ventajas frente a los de ELISA su rapidez y facilidad de uso. Aun así, a diferencia del ELISA, los dispositivos de flujo lateral solo determinan la presencia o la ausencia de la proteína diana, no pudiendo ser empleados en la cuantificación del analito presente en la muestra.

Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los antecedentes bibliográficos expuestos, podemos concluir que a diferencia de algunos de los trabajos citados anteriormente, los scFv aislados a partir de la genoteca Tomlinson I para la detección de nuez de Brasil (BE95) y de almendra (PD1F6 y PD2C9) han demostrado poseer la especificidad necesaria para permitir la identificación inequívoca de la especie diana objeto de estudio, no observándose problemas de reactividad cruzada con ninguna de las numerosas especies vegetales y animales analizadas. No obstante, el LOD del clon BE95 (de 5000 mg kg⁻¹), y en menor medida el de los clones PD1F6 y PD2C9 (de 110-120 mg kg⁻¹), distan mucho de los alcanzados por otros trabajos publicados o kits comerciales (que llegan a LOD inferiores a 1 mg kg⁻¹). Sin embargo, las técnicas de ELISA desarrolladas por otros investigadores para la detección de nuez de Brasil y de almendra se basan en la utilización de anticuerpos producidos en animales (Acosta *et al.*, 1999; Ben Rejeb *et al.*,

2005; Blais *et al.*, 2002; Clemente *et al.*, 2004; Hlywka *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2013), al igual que los kits disponibles en el mercado para la detección de estos frutos secos (*Biocheck, BioFront, ELISA Systems, Neogen, R-biopharm, Romer Labs, Elution technologies*). No obstante, el empleo de animales vivos presenta una serie de inconvenientes que hace imprescindible la búsqueda de métodos alternativos para la producción de anticuerpos.

La Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, que ha sido transpuesta a la legislación española mediante el Real Decreto 53/2013, supone un importante avance en materia de bienestar animal, puesto que establece como principio general la promoción e implementación del “principio de las tres erres”, es decir el reemplazo, la reducción y el refinamiento de los procedimientos experimentales llevados a cabo en animales, fomentando, siempre que sea posible, métodos o estrategias de ensayo científicamente satisfactorios que no conlleven la utilización de animales vivos. Es en el cumplimiento de esta Directiva donde la producción de anticuerpos recombinantes –y en este caso en concreto, la tecnología de *phage display*– desempeña un papel determinante. En contraposición con los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridomas, los anticuerpos recombinantes exhiben una serie de ventajas, como son su pureza (no presentan restos de componentes serológicos, tales como la albúmina bovina y las IgG) y que su secuencia nucleotídica y proteica son conocidas (lo que garantiza la identidad del anticuerpo en los diferentes lotes producidos). A diferencia de la inmunización en animales, donde el control sobre la naturaleza de los anticuerpos producidos es escaso, las técnicas *in vitro* permiten la manipulación de las condiciones de selección que facilitan, por ejemplo, incluir moléculas competidoras para dirigir la selección hacia los epítopos de interés. Puesto que la producción de anticuerpos se realiza en condiciones químicamente definidas, la variabilidad entre distintos lotes es despreciable. También es posible obtener grandes cantidades de anticuerpo en cortos periodos de tiempo, que pueden manipularse genéticamente. Esta tecnología evita muchas de las limitaciones de la metodología de los hibridomas, entre las que cabe citar su laboriosidad y su elevado coste, la necesidad de contar con autorización la autoridad competente para proyectos de experimentación animal, y con instalaciones y personal capacitado para el manejo de animales de experimentación. Además, dado que los anticuerpos se generan en animales, es difícil producirlos frente a antígenos tóxicos y altamente conservados, así como frente a antígenos inestables en animales.

Con este trabajo se ha conseguido demostrar que es factible emplear con éxito genotecas sintéticas de anticuerpos recombinantes para obtener anticuerpos específicos que puedan ser empleados en técnicas inmunoenzimáticas para la detección de frutos secos alergénicos, evitando así el uso de animales de experimentación. Una vez comprobada la idoneidad de los fago-anticuerpos para su uso en la detección de frutos secos alergénicos en alimentos, es necesario mejorar sus atributos mediante la maduración artificial de su afinidad, y emplear técnicas de

ingeniería genética para modificar la funcionalidad de las scFv seleccionadas con diferentes enzimas y sondas fluorescentes, lo que permitiría su empleo en diferentes formatos de ensayo.

9.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS DIANAS MOLECULARES RECONOCIDAS POR LOS FAGO-ANTICUERPOS RECOMBINANTES AISLADOS FRENTE A EXTRACTOS DE NUEZ DE BRASIL Y DE ALMENDRA.

El proceso de selección de los fragmentos de anticuerpo específicos frente a nuez de Brasil y almendra llevado a cabo en este trabajo se realizó empleando un extracto proteico total. El uso de un extracto proteico total supone un ahorro de recursos si se compara con el uso de proteínas purificadas, puesto que no es necesario adquirir ni purificar la proteína. Además, ciertas proteínas recombinantes pueden alterar los resultados obtenidos, debido a que su plegamiento puede variar con respecto al de la proteína nativa. No obstante, realizar el proceso de selección de fragmentos de anticuerpo empleando un extracto total de proteína no permite conocer las dianas moleculares reconocidas por los anticuerpos seleccionados. Por lo tanto, el siguiente objetivo de la Tesis Doctoral consistió en la identificación y caracterización de las dianas moleculares reconocidas por los scFv aislados frente a nuez de Brasil y almendra, lo que permitirá profundizar en su caracterización.

Una primera estrategia para identificar las proteínas diana de los fago-anticuerpos consistió en realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*) con SDS. El SDS es un detergente aniónico capaz de formar complejos tanto con cadenas laterales apolares como con grupos de residuos aminoácidos con carga, sin llegar a romper el enlace peptídico. Esto resulta en el enmascaramiento efectivo de la carga intrínseca de la proteína, de manera que la cantidad neta de carga por unidad de masa permanece aproximadamente constante. La migración electroforética se produce entonces en función de la masa molecular de la cadena polipeptídica. Puesto que las estructuras secundaria y terciaria desaparecen por la ruptura de los puentes de hidrógeno y el desdoble de la molécula, la morfología de la proteína no lleva a ejercer ninguna influencia durante el proceso.

Tras la realización de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana activada de polifluoruro de vinilideno (PVDF, *polyvinylidene fluoride*) con ayuda de un campo eléctrico. Tras incubar las membranas con el fago-anticuerpo BE95 (nuez de Brasil) o con los fagos-anticuerpos PD1F6 y PD2C9 (almendra) y la adición del sustrato quimioluminiscente, no se obtuvo ninguna señal que indicara reconocimiento de la molécula diana por parte de los fago-anticuerpos. La ausencia de detección de la proteína diana puede deberse a dos motivos: a que el fago-anticuerpo esté reconociendo a un epítipo que se desnaturaliza durante la electroforesis SDS-PAGE, o a que el fago-anticuerpo verdaderamente no esté reconociendo a una proteína, si no a algún otro componente presente en el extracto, como lípidos, azúcares, u otras sustancias minoritarias existentes en los extractos de frutos secos, como pueden ser polifenoles, taninos,

etc. (Alcoer *et al.*, 2000; Venkatachalam y Sathe, 2006; Xu *et al.*, 2012). Una alternativa que pretende evitar la desnaturalización de los epítomos es la electroforesis PAGE nativa, que a diferencia de la electroforesis SDS-PAGE no modifica la morfología de las proteínas, separándose estas en función de su tamaño y de su carga. Por lo tanto, una segunda estrategia para identificar a las proteínas diana de los fago-anticuerpos consistió en realizar una electroforesis por el procedimiento descrito por Ornstein (1964), en el que se emplea un sistema discontinuo de tampones (*i.e.* los tampones empleados en el gel y en la cubeta de electroforesis presentan diferente composición). Este tipo de electroforesis presenta la peculiaridad de poseer una mayor resolución que los sistemas continuos de electroforesis nativa. Con esta variante de electroforesis no desnaturalizante y posterior *western blot*, fue posible detectar un rastro de quimioluminiscencia en forma difusa en el *western blot* de la proteína de almendra (**Figura 1, Apéndice A**), pero no en el de la proteína de nuez de Brasil.

El problema planteado ante la ausencia de respuesta positiva del clon BE95 se abordó realizando una electroforesis nativa en un sistema continuo de tampones, seleccionando un pH cercano a la neutralidad (7.4), siguiendo el procedimiento descrito por McLellan (1982). En esta ocasión, sí se pudo observar una mancha luminiscente similar a la obtenida para los clones de fagos frente a la almendra (**Figura 7.1B**). De esta manera, se determinó que la totalidad de los clones aislados reconocían un epítomo conformacional que estaba siendo desnaturalizado en la electroforesis SDS-PAGE. No obstante, para confirmar dicha hipótesis, se analizaron mediante ELISA los extractos proteicos de almendra y de nuez de Brasil, sometidos a tratamientos de digestión con proteasas (tripsina y proteinasa K) o a un tratamiento térmico intenso (95 °C durante 10 min). Se comprobó mediante ELISA que los clones de fago-anticuerpos eran incapaces de detectar los extractos tratados por calor o con proteasas, lo que sugiere que la diana reconocida por los scFv es efectivamente de naturaleza proteica. Dado que la electroforesis SDS-PAGE incluye una etapa de calentamiento de la muestra en presencia del tampón de electroforesis, era posible que la ausencia de señal positiva tras la realización del *western blot* pudiera modificarse sometiendo dicha muestra a condiciones menos severas (es decir, mezclando la muestra del extracto proteico con el tampón de electroforesis, pero omitiendo el paso de calentamiento de este a 95 °C durante 10 min). En estas condiciones, y solo en el caso del extracto de almendra, se consiguió que los clones de fagos PD1F6 y PD2C9 fueran capaces de reconocer una nueva banda, de tamaño superior a 150 kDa (**Figura 7.5**). Esta banda se escindió del gel y se identificó mediante espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*) como la globulina 11S de la almendra, también conocida como amandina (**Tabla 7.1**).

Un espectrómetro de masas es un instrumento constituido por tres partes diferenciadas: una fuente de iones, un analizador de masas y un detector. Como fuente de iones, en nuestro trabajo se utilizó el MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*), para el analizador de masas, el tiempo de vuelo (TOF, *time-of-flight*), resultando en el sistema híbrido MALDI-TOF.

Para llevar a cabo el análisis de proteínas se requiere la digestión previa de estas para generar los péptidos que se van a introducir en el sistema de MS. Tras obtener el espectro MS de los péptidos digeridos, este es analizado empleando herramientas bioinformáticas y bases de datos de proteínas. En el presente trabajo, la base de datos empleada fue MASCOT. Los péptidos se identifican en función a su relación masa/carga, y la proteína se identifica comparando las secuencias de los aminoácidos derivada con proteínas conocidas. Las secuencias peptídicas que son específicas para una proteína determinada se conocen como "péptidos firma".

En el caso del extracto proteico de la nuez de Brasil, la resolución obtenida en el *western blot* realizado en condiciones no desnaturizantes no fue suficiente para permitir la identificación de la proteína diana, por lo que fue necesario abordar el problema desde otra perspectiva.

La técnica de cromatografía de exclusión molecular (*SEC, size exclusion chromatography*) permite la separación de moléculas en función de su tamaño conforme estas atraviesan una columna empaquetada con una matriz porosa de partículas esféricas inertes. El cromatograma resultante muestra la variación en concentración (en términos de absorbancia a 280 nm) de los diferentes componentes de la muestra. Las moléculas que no entran en la matriz debido a su gran tamaño se eluyen directamente en el volumen de vacío, atravesando la columna a la misma velocidad que el tampón. Las moléculas que sí tienen acceso a los poros de la matriz se eluyen de la columna en orden decreciente de tamaño.

La separación del extracto proteico total de nuez de Brasil dio lugar a un cromatograma de 7 picos (**Figura 7.3**), que se analizaron mediante ELISA para comprobar qué fracción era reconocida por el clon BE95. La técnica de ELISA reveló que los fago-anticuerpos reconocían una proteína de gran tamaño (ya que se eluía en las primeras fracciones). Para incrementar la resolución de la separación, se inyectó de nuevo en la columna una alícuota de 1 mL de la fracción B. En esta ocasión, en el cromatograma resultante se pudieron diferenciar dos picos (**Figura 7.3A**, inserto), que se analizaron nuevamente mediante ELISA. Como se observa en la **Figura 7.3B**, en la que se muestran los resultados de este ELISA, el clon BE95 detectaba una proteína que se eluía en el primer pico de este segundo cromatograma. Dado que no fue posible observar las proteínas integrantes de esta fracción mediante SDS-PAGE, una alícuota perteneciente a la fracción 5 de la segunda cromatografía, así como las bandas en las que se resolvió la fracción B tras realizar una electroforesis SDS-PAGE, se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, identificándose todas las muestras analizadas como globulina 11S de nuez de Brasil, conocida también como Ber e 2 (**Tabla 7.2**). No obstante, cabe aclarar que para realizar la digestión *in silico* se empleó la única entrada para la globulina 11S de la nuez de Brasil existente en la base de datos ([GI|30313867](#)).

En el caso de la almendra, para confirmar que los clones PD1F6 y PD2C9 reconocían a la amandina, se procedió a la purificación de esta proteína mediante cromatografía de intercambio aniónico.

La cromatografía de intercambio iónico permite la separación de moléculas en función de sus propiedades netas de carga en superficie. Las columnas de intercambio aniónico contienen partículas esféricas con grupos cargados positivamente. En este tipo de cromatografía, el pH y la fuerza iónica del tampón de equilibrado se seleccionan para asegurar que, cuando se inyecte la muestra, la proteína de interés se una a la matriz, evitando que lo hagan las impurezas. Tras lavar la columna para retirar las proteínas que no se hayan unido, la proteína de interés se eluye modificando la fuerza iónica del tampón (*i.e.* la concentración de sales).

El cromatograma resultante de la purificación de amandina mostró un único pico (**Figura 7.4**), del que se extrajeron diferentes fracciones que se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Como puede observarse en la imagen del gel insertada en la **Figura 7.4**, cuando la mezcla de proteína y tampón de electroforesis no se calentaba, aparecía una banda con un peso molecular superior a los 150 kDa, así como dos bandas de aproximadamente 35 kDa. Estas bandas desaparecían cuando la mezcla de proteína y tampón de electroforesis se calentaba durante 10 min a 95 °C, apareciendo bandas de unos 20 kDa y de 10-12 kDa, que también estaban presentes con menor intensidad en las muestras sin calentar.

Para llevar a cabo la identificación de las bandas proteicas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, se escindieron las bandas señaladas del gel que se muestra en la **Figura 7.7A**, y se digirieron con tripsina. Como puede observarse en la **Tabla 7.2**, todas las bandas se identificaron como amandina.

La amandina es una proteína hidrosoluble conformada por dos proteínas de almacenamiento de 61 kDa (Prunina 1) y 56 kDa (Prunina 2). Ambas proteínas están constituidas por dos cadenas polipeptídicas unidas mediante un puente disulfuro: una cadena α ácida de 40-42 kDa y una cadena β básica de 20 kDa. Dos trímeros de amandina se agrupan para forman un homohexámero (similar al hexámero de la glicinina de soja), con un peso molecular de 427 ± 47.6 kDa (Jin *et al.*, 2009; Sathe *et al.*, 2002; Willison *et al.*, 2013; Albillos *et al.*, 2008). Por otra parte, los resultados observados en la electroforesis SDS-PAGE concuerdan con los descritos por otros autores, que declaran la presencia de bandas dobles de 35-43 kDa prominentes, y otras bandas de 20-22 kDa (Sathe *et al.*, 2002), con la salvedad de que la amandina purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico parece perder un fragmento peptídico en el péptido α ácido (**Figura 7.7**), puesto que al comparar la fracción correspondiente a la amandina en el extracto total de almendra con la amandina purificada, se observa que la banda correspondiente a la cadena β básica de 20 kDa permanece en ambos

carriles, pero que la correspondiente a 40-45 kDa desaparece, encontrándose en su lugar dos bandas de menor tamaño (en torno a 35-40 kDa).

La globulina 11S de la nuez de Brasil (conocida como Ber e 2) también es un oligómero. En su estado nativo, es un hexámero, con monómeros constituidos por una subunidad ácida de 32 kDa y básica de 24 kDa, unidas mediante un puente disulfuro (Sun *et al.*, 1987). El perfil electroforético obtenido en este trabajo, en el que se observan múltiples bandas, siendo las más prominentes las de 35, 20 y 18 kDa, coincide con el descrito por otros autores (Sharma *et al.*, 2010).

Para finalizar la caracterización de las dianas moleculares reconocidas por los fago-anticuerpos, se sometió a la amandina purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico y a la Ber e 2 purificada mediante cromatografía de exclusión molecular a estudios de ultracentrifugación y de dicroísmo circular. Como se ha indicado anteriormente, los scFv aislados frente a almendra y nuez de Brasil fueron incapaces de detectar a su proteína diana tras someter el extracto proteico a un tratamiento térmico severo (95 °C durante más de 1 min).

Para analizar la estabilidad térmica de las proteínas se empleó la técnica de dicroísmo circular (DC). El DC es una técnica espectroscópica fundamentada en la absorción diferencial de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda (L) y hacia la derecha (R) por parte de las sustancias ópticamente activas (quirales). Las proteínas poseen un número de cromóforos que pueden dar lugar a señales de DC. Si se analiza el espectro de DC en la región del UV lejano (240-180 nm), se puede obtener información sobre la estructura secundaria de las proteínas (estructura en hélice α o lámina plegada β). Por el contrario, la región del UV cercano (320-260 nm) refleja el ambiente de las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos, proporcionando información de la estructura terciaria de la proteína (Johnson Jr., 1990; Kelly *et al.*, 2005; Kelly y Price, 2000). De este modo, se monitoreó la desnaturalización de la amandina registrando el espectro conforme la temperatura aumentaba de 20 a 97 °C, y de la Ber e 2 conforme la temperatura incrementaba de 25 a 85 °C. El espectro de DC de la amandina en la región del ultravioleta lejano permaneció prácticamente inalterado hasta alcanzar los 80 °C, con un perfil similar al descrito por otros autores (Albillos *et al.*, 2009). No obstante, la aparición de cambios inducidos por la temperatura fueron moderados por encima de los 209 nm, lo que dificulta monitorizar correctamente la desnaturalización de la amandina (**Figura 7.8A**). En lo que se refiere a los cambios del espectro en la región del ultravioleta cercano, se observa un máximo a 284 nm, que desaparece entre los 75 y 97 °C (**Figura 7.8B**). El espectro de DC de la Ber e 2 en la región del ultravioleta lejano mostró dos mínimos en torno a 208 y 216 nm (**Figura 7.8D**), en consonancia con los resultados publicados por otros autores (Sharma *et al.*, 2010). Asimismo no se observaron cambios en la estructura secundaria de la proteína entre 25 y 85 °C, siendo a partir de 85 °C cuando se comenzó a observar un ligero cambio en el espectro. Sin embargo, disponibilidad limitada de proteína purificada impidió realizar más estudios de estabilidad térmica.

Finalmente, para llevar a cabo estudios sobre la estructura cuaternaria de las proteínas purificadas en este trabajo, se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación. Como se observa en la **Figura 7.6A**, la amandina muestra un coeficiente de sedimentación de 13.3S, intermedio entre los descritos por otros autores, que previamente describieron la amandina como un hexámero (Albillos *et al.*, 2008; Wolf y Sathe, 1998). En lo que respecta a la Ber e 2, esta mostró un pico simétrico que comprendía alrededor del 85 % del total de proteína a 11.95S (**Figura 7.6B**), lo que está en consonancia con los resultados publicados por otros autores (Kamiya *et al.*, 1983; Svedberg y Sjögren, 1930), así como dos picos de menor tamaño a 7.30S (11.5 %) y 4.88S (3.4 %), pudiendo corresponder el primero a una forma trimérica de la Ber e 2, o bien a la fracción menor de la vicilina 7S, que muestra un coeficiente de sedimentación de 7.1S según Sharma *et al.*, 2010. No obstante, debido a que no se encontró señal de la presencia de la vicilina 7S en los estudios de espectrometría de masas de la Ber e 2, la primera hipótesis resultaría la opción más plausible.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que el clon BE95 detecta un epítipo estructural de la proteína de almacenamiento de la semilla globulina 11S de la nuez de Brasil, también denominada Ber e 2 por la WHO/IUIS, mientras que los clones PD1F6 y PD2C9 reconocen un epítipo estructural de la amandina, la globulina 11S de la almendra, también denominada Pru du 6 por la WHO/IUIS. La incapacidad de los clones de fagos aislados a lo largo de este trabajo para detectar su proteína diana tras someter el extracto proteico a un tratamiento térmico severo se explicaría por la pérdida de la estructura del epítipo, puesto que como se observa en los geles de electroforesis y en los resultados de DC, la estructura de la proteína se ve afectada tras someterse a tratamientos térmicos superiores a 95 °C durante más de 1 min o equivalentes.

Las técnicas de cromatografía de intercambio iónico y de espectrometría de masas, y los análisis de *western blot* sirvieron para confirmar que los clones de fago-anticuerpos PD1F6 y PD2C9, que se aislaron realizando el procedimiento de selección por afinidad frente a un extracto completo de proteínas de almendra, reconocen a un epítipo conformacional de la globulina 11S de almendra, también conocida como amandina, y que corresponde al alérgeno Pru du 6. Por otra parte, la separación por cromatografía de exclusión molecular y el análisis posterior de la fracción correspondiente mediante espectrometría de masas, revelaron que el clon de fago-anticuerpo BE95, aislado frente a un extracto proteico total de nuez de Brasil, reconocía a un epítipo conformacional de la globulina 11S de la nuez de Brasil, que corresponde al alérgeno Ber e 2. La ausencia de reconocimiento de las proteínas dianas que se observa tras el tratamiento térmico intenso está en consonancia con los resultados obtenidos mediante la técnica de DC.

9.4. PRODUCCIÓN, EN LA LEVADURA METILOTRÓFICA *Pichia pastoris*, DE scFv BIOTINILADOS *in vivo* ESPECÍFICOS FRENTE A LAS PROTEÍNAS DE ALMENDRA

El empleo de sistemas procariotas como factorías de producción de fragmentos de anticuerpos tiene gran aceptación entre la comunidad científica. Estos sistemas cuentan con una serie de ventajas, tales como su simplicidad de manejo, la facilidad de su manipulación genética, la posibilidad de producir proteínas recombinantes a gran escala, el escaso coste por fermentación, el corto espacio de tiempo transcurrido entre la transformación y la purificación de la proteína, etc. No obstante, uno de los mayores inconvenientes que presentan estos organismos es la imposibilidad de llevar a cabo el plegamiento correcto de los fragmentos de anticuerpo, debido a las condiciones reductoras existentes en el citoplasma bacteriano, que pueden provocar que la proteína recombinante acabe depositándose como cuerpos de inclusión. Una solución a este problema se consigue expresando los fragmentos de anticuerpo como proteínas de fusión a un péptido líder (como puede ser el péptido PelB) en su extremo N-terminal. Este péptido dirige la proteína al espacio periplásmico, que presenta un ambiente más oxidativo que el citoplasma, lo que permite el plegamiento de la proteína recombinante, facilitado por la presencia de proteínas chaperonas. La purificación de los fragmentos de anticuerpos contenidos en el espacio periplásmico se realiza mediante eliminación de la membrana externa bacteriana por choque osmótico y posterior purificación de los anticuerpos mediante cromatografía de afinidad. No obstante, debe tenerse en cuenta que la maquinaria existente en *E. coli* para el plegamiento de las proteínas y su exportación al periplasma tiene capacidad limitada, y una elevada expresión de proteínas recombinantes normalmente desemboca en la acumulación de productos insolubles en el periplasma (Arbabi-Ghahroudi *et al.*, 2005; Kingston y Brent, 2001; Lowe *et al.*, 2011; Rouet *et al.*, 2012).

El empleo de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* se presenta como una alternativa a los sistemas bacterianos para la producción de proteínas recombinantes. *P. pastoris* ha demostrado ser un organismo idóneo para la expresión de proteínas heterólogas, puesto que como microorganismo unicelular es fácil de manipular y cultivar, mientras que como eucariota es capaz de realizar modificaciones post-traduccionales, siendo un sistema más rápido, económico y sencillo que otros sistemas de expresión eucariotas superiores, como los cultivos de células de insecto o de mamífero. Muchas de las proteínas que acababan convertidas en cuerpos de inclusión inactivos cuando se producían en sistemas procariotas, conservan su actividad cuando se expresan en *P. pastoris* (Cregg *et al.*, 2000).

La producción de proteínas recombinantes se sustenta en que, como levadura metilotrófica, *P. pastoris* puede emplear el metanol como única fuente de carbono. El primer paso en el metabolismo del metanol es la oxidación del metanol a formaldehído por la acción de la enzima alcohol oxidasa (AOX), que está codificada por los genes *AOX1* y *AOX2*. La AOX presenta poca afinidad por el oxígeno, por lo que la levadura compensa esta deficiencia sintetizando grandes cantidades de la enzima. La expresión del gen *AOX1* está fuertemente regulada, y se

induce por metanol, por lo que el promotor del gen *AOX1* se puede emplear para dirigir la expresión de los genes de interés. Las proteínas heterólogas producidas en *P. pastoris* pueden expresarse intracelularmente o bien secretarse al medio de cultivo. La secreción sirve como una primera etapa para la purificación, ya que evita la necesidad de separar *a posteriori* la proteína heteróloga del conjunto de proteínas celulares. Para que se produzca la secreción de proteínas es necesario emplear una secuencia señal que la dirija hacia la ruta secretora. Una de las secuencias señal que ha sido empleada con mayor frecuencia es el péptido señal del factor alfa de *S. cerevisiae* (Cereghino y Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente expuestas, el último objetivo de la tesis doctoral consistió en la utilización de la levadura metilotrófica *P. pastoris* como sistema de expresión para la producción de los fragmentos solubles del clon PD1F6, con el fin de comprobar si los scFv expresados por la levadura pueden emplearse en técnicas de ELISA para la detección de almendra en alimentos. Además, con el propósito de mejorar la sensibilidad de la técnica desarrollada e incrementar la afinidad por el antígeno con respecto a los scFv monovalentes, se planteó la obtención de scFv polimerizados.

El abordaje de este último objetivo se realizó tomando como punto de partida la secuencia nucleotídica codificante del scFv PD1F6 (incluida en la base de datos de GenBank con el número de acceso [LN889750](#)) contenida en el fagémido pIT2, aislado de la genoteca Tomlinson I como se detalló en el **Capítulo 6**. Para la producción de fragmentos solubles se seleccionó el vector comercial pPICZα B (**Figura III, Apéndice B**), diseñado para expresar y secretar proteínas recombinantes en *P. pastoris* mediante inducción con metanol. El vector contiene: (1) el promotor *AOX1*, para regular la expresión del gen de interés, (2) el péptido señal del factor alfa, para dirigir la secreción de las proteínas al exterior de la célula, (3) un gen de resistencia a la zeocina, y (4) el epítipo c-myc y una cola de polihistidina en el extremo C-terminal. El fragmento nucleotídico correspondiente al scFv se insertó adecuadamente en el vector de expresión, y el nuevo plásmido, denominado pMJA179, se propagó en la cepa de *E. coli* XL1-Blue.

En el sistema inmune, la afinidad de los anticuerpos sufre un proceso de maduración gradual mediante la incorporación de mutaciones y posterior selección de variantes bajo presión selectiva creciente. En el caso de los anticuerpos obtenidos a partir de genotecas sintéticas, mejorar la afinidad también es posible mediante distintas estrategias *in vitro*. Una de las alternativas existentes con este fin es la modificación de las CDRs de los anticuerpos mediante PCR, introduciendo mutaciones aleatorias. Una vez modificados, los anticuerpos resultantes deben someterse a varias rondas de *biopanning* (Hoogenboom, 2005; Pande *et al.*, 2010; Smith y Petrenko, 1997). Otra alternativa viable para que los fragmentos de anticuerpo incrementen su afinidad por la molécula diana es oligomerizarlos de manera que imiten a la molécula de IgG (Thie *et al.*, 2009). En este trabajo de investigación, la metodología propuesta consistió en fusionar un dominio aceptor de biotina (*Biotin acceptor domain*, BAD) al scFv, para añadir una

molécula de biotina en un proceso de biotilación *in vivo* y posteriormente formar multímeros empleando un núcleo de avidina conjugada con peroxidasa. Aunque existen técnicas que permiten la biotilación aleatoria de la proteína, estas presentan el inconveniente de que la biotina se puede colocar en un lugar donde inactive residuos aminoácidos críticos para el reconocimiento del epítipo (Kumada, 2014). Para evitar este inconveniente, una alternativa consiste en añadir la molécula de biotina en un aminoácido específico, para lo cual se precisa de un BAD, que es una versión reducida de la proteína transportadora de biotina y carboxilo (BCCP, *biotin carboxyl carrier protein*). Con objeto de permitir la biotilación de los fragmentos scFv solubles, se insertó la secuencia del BAD en el extremo C-terminal del plásmido pMJA179, entre la secuencia nucleotídica correspondiente al scFv y la secuencia del epítipo c-myc, originando el plásmido de expresión pMJA181 (**Figura I, Apéndice B**), que se propagó en la cepa de *E. coli* XL1-Blue. Tras comprobar la correcta orientación del inserto y el mantenimiento del marco de lectura, el plásmido se linearizó y se insertó en el genoma de la cepa de *P. pastoris* X-33, para proceder a la expresión de los fragmentos solubles.

Con la finalidad de seleccionar entre los clones de *P. pastoris* transformados el mejor productor de scFv, la inducción de los clones se realizó a pequeña escala (en un volumen de 1 mL). Tras la inducción con metanol de los clones de levadura transformados con el plásmido pMJA181, los sobrenadantes obtenidos se analizaron mediante *dot blot* para comprobar la correcta expresión de los fragmentos solubles. Puesto que el plásmido de expresión añade al scFv expresado por *P. pastoris* un epítipo c-myc, la determinación de la producción de fragmentos solubles se realizó incubando la membrana con un anticuerpo anti-c-myc. Por lo tanto, los clones que muestren mayor intensidad de color tras añadir el sustrato cromogénico serán aquellos que produzcan mayor cantidad de fragmentos de anticuerpo. Los resultados del *dot blot* se muestran en la **Figura IV, Apéndice B**, en la que se observa que un 55 % de los clones fue capaz de sintetizar niveles adecuados de scFv.

La expresión de proteínas heterólogas por *P. pastoris* está enormemente condicionada por su estabilidad. En este sentido, en *P. pastoris* se ha descrito que cuando los scFv no son estables, no se expresan adecuadamente, sino que se acumulan en el interior de la célula. Paralelamente a este fenómeno se observa un incremento en los niveles de transcripción de los genes responsables de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, *unfolded protein response*), que se asocian al incremento en la capacidad de plegamiento del retículo endoplásmico que tiene lugar en condiciones de estrés, pero también a la degradación de proteínas cuyo plegamiento es incompleto o defectuoso (Whyteside *et al.*, 2011). Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante *dot blot* permiten afirmar que el scFv es suficientemente estable para ser expresado por *P. pastoris*, por lo que se seleccionó el clon pMJA181-D8 para continuar con el estudio.

Con el fin de biotilar *in vivo* los fragmentos solubles de anticuerpo, se construyó un segundo plásmido que contenía la secuencia nucleotídica codificante de la enzima ligasa de

biotina (BirA). Esta enzima cataliza la unión covalente de una molécula de biotina al aminoácido lisina (K) del BAD, en una reacción de dos etapas (**Figura VI, Apéndice B**).

Para expresar la enzima BirA en *P. pastoris* se seleccionó el vector comercial pPIC6a A (**Figura III, Apéndice B**), similar al pPICZa B empleado en la producción de fragmentos solubles, pero con un gen de resistencia a la blasticidina como marcador. El plásmido resultante se denominó pMJA180 (**Figura II, Apéndice B**). Tras comprobar la correcta orientación del inserto y el mantenimiento del marco de lectura, el plásmido se linearizó y se co-transformó en el clon de *P. pastoris* pMJA181-D8, que contiene el plásmido pMJA181. El clon pMJA181-D8 mostraba resistencia a la blasticidina *per se*, por lo que para seleccionar los clones transformados con los dos vectores fue necesario incrementar la concentración de blasticidina hasta 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En este sentido, se ha descrito que en *P. pastoris* se pueden producir de manera espontánea inserciones múltiples en un único locus (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta este fenómeno, es posible enriquecer la población de transformantes con aquellos clones que tengan múltiples copias de un vector de expresión seleccionando frente a hiper-resistencia al antibiótico correspondiente, puesto que incrementar el número de copias de un gen generalmente tiene el efecto de incrementar la proteína expresada (Arbulu *et al.*, 2015; Nordén *et al.*, 2011). No se ha encontrado en bibliografía consultada ningún caso en que la resistencia a zeocina confiera resistencia frente otros antibióticos, por lo que desconocemos hasta el momento el mecanismo responsable de este fenómeno.

Para la siguiente etapa del estudio se seleccionó un clon que mostraba resistencia a ambos antibióticos (zeocina y blasticidina), que se denominó PdBSF (acrónimo de *Prunus dulcis* Biotinylated Soluble Fragment). La presencia de ambos vectores se confirmó mediante un análisis de PCR convencional con las parejas de cebadores MJA254/MJA259, que amplifican el fragmento correspondiente al scFv ligado al BAD, y MJA255/MJA256, que amplifican el fragmento correspondiente a la BirA (para ver un listado de los cebadores empleados en este trabajo, consultar la **Tabla I, Apéndice B**). Con este análisis se pudo comprobar la presencia de la secuencia codificante de la enzima BirA en el clon PdBSF y su ausencia en el clon pMJA181-D8 (**Figura V, Apéndice B**).

Además, para confirmar la producción de scFv biotinilados *in vivo*, se realizó un *dot blot* con sobrenadantes de los clones pMJA181-D8 y PdBSF tras su inducción con metanol. El revelado de la membrana con un anticuerpo anti-c-myc (**Figura 8.3, dcha.**) puso de manifiesto la capacidad de ambos clones de expresar el scFv. No obstante, como se observa en la **Figura 8.3, izda.**, solo el clon PdBSF fue capaz de producir el fragmento de anticuerpo biotinilado. Estos resultados confirmaron por lo tanto la co-expresión y el funcionamiento de la enzima BirA, así como la producción de anticuerpos biotinilados *in vivo* por un único clon de *P. pastoris*.

Posteriormente, el clon PdBSF se utilizó para producir fragmentos solubles a mayor escala (600 mL de medio de cultivo), siguiendo el procedimiento descrito en el protocolo proporcionado por Invitrogen™ (Cat. no. K1740-01). El sobrenadante obtenido tras la inducción del clon con

metanol se aplicó en una columna de proteína L. La molécula de proteína L presenta afinidad por la región variable de la cadena ligera de las inmunoglobulinas, por lo que permite purificar los fragmentos de anticuerpo mediante cromatografía de afinidad. Los 600 mL de sobrenadante obtenidos proporcionaron un total de 18 mg de proteína, lo que supuso un rendimiento de 30 mg L⁻¹. Por norma general, *P. pastoris* es capaz de producir grandes cantidades de proteína recombinante por litro de medio de cultivo, habiéndose descrito casos en los que la producción ha llegado al orden de gramos. No obstante, la cantidad de proteína que *P. pastoris* puede producir no es constante, sino que varía enormemente en función de las características estructurales de esta (Ahmad *et al.*, 2014), así como de las condiciones de cultivo (Shi *et al.*, 2003; Trentmann *et al.*, 2004).

Con el propósito de conferir mayor versatilidad al scFv, se procedió a la formación de multímeros mediante la adición de un núcleo de avidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) siguiendo el procedimiento descrito en las pautas del NIH Tetramer Core Facility. El empleo de avidina/estreptavidina marcada con diferentes moléculas (enzimas, fluoróforos, etc.), permite acortar el tiempo de los ensayos (al estar conjugadas con una enzima, no es necesario emplear anticuerpo secundario), e incluso permitiría emplear los scFv biotinilados en diversas técnicas inmunoquímicas para la detección del ingrediente alergénico en alimentos. Así, por ejemplo, la molécula de avidina/estreptavidina marcada con un fluoróforo podría emplearse para la realización de *arrays*, en los que la detección de la reacción antígeno-anticuerpo-avidina fluorescente se realiza mediante un *scanner*. Además, en el mercado existe una gran variedad de dispositivos marcados con estreptavidina (placas de ELISA, esferas magnéticas...) que permitirían desarrollar nuevas alternativas en el uso de este tipo de anticuerpos para la detección de frutos secos alergénicos.

Para confirmar la multimerización de los scFv, se realizó una electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras (**Figura 8.4**), en la que apareció una banda tenue de aproximadamente 220 kDa en el carril correspondiente al scFv multimerizado. Esta banda se recortó y se analizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Los resultados obtenidos (**Tabla 8.1**), en los que se observó una mezcla de peroxidasa de rábano y de inmunoglobulina humana, son compatibles con la presencia del scFv multimerizado. Además, al comparar los resultados del MS con los de la secuencia aminoacídica del scFv, se demostró que los péptidos obtenidos cubrían un 35 % de la secuencia.

Para determinar el grado de polimerización alcanzado, se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación (**Figura 8.6**). En ellos se observó que cuando la avidina-HRP reaccionaba con el scFv biotinilado aparecía una nueva especie con un tamaño que podía corresponder a la adición de al menos dos moléculas de scFv a un núcleo de avidina-HRP. No obstante, para confirmar tal aseveración se necesitaría realizar un mayor número de experimentos.

Finalmente, para comprobar si el fragmento de anticuerpo expresado por *P. pastoris* continuaba reconociendo a la proteína de almendra, y si el multímero de scFv mejoraba la sensibilidad de la técnica de ELISA con respecto a los fago anticuerpos, los scFv multimerizados se emplearon como sondas de afinidad en ELISA para la detección de almendra en mezclas binarias de almendra en harina de trigo. La concentración final de anticuerpo multimerizado empleada en los ensayos fue de $2 \mu\text{L mL}^{-1}$. La **Figura 8.7** muestra la curva estándar obtenida tras analizar las mezclas binarias de almendra en harina de trigo mediante ELISA empleando los scFv multimerizados con una molécula de avidina conjugada a la peroxidasa de rábano. El LOD alcanzado se calculó siguiendo las directrices de la IUPAC (Thompson *et al.*, 2002), como la mínima concentración de proteína diana que mostrara un valor de absorbancia mayor que el valor medio de absorbancia del blanco más tres veces su desviación estándar, con los datos obtenidos tras la realización de 20 experimentos. Finalmente, para determinar la concentración de proteína correspondiente al LOD, se interpoló el valor de absorbancia obtenido en la curva estándar. De esta manera, el LOD alcanzado por el ELISA indirecto usando los scFv multimerizados procedentes del clon PdBSF fue de 470 mg kg^{-1} . En este sentido, si lo comparamos con el alcanzado por el mismo clon en formato de fago-anticuerpo (110 mg kg^{-1}), podemos observar una pequeña pérdida de sensibilidad (4.3 veces inferior). Esta pérdida de sensibilidad podría deberse a un cambio en la estructura tridimensional de las CDR de los fragmentos solubles con respecto al fago-anticuerpo, o bien a alguna interacción estérica debido a las moléculas adicionales de biotina, avidina y HRP.

Para comprobar que los multímeros del clon PdBSF conservaban su capacidad de reconocer la proteína de almendra en muestras comerciales, se seleccionó una muestra representativa de 10 de los 92 productos comerciales ensayados anteriormente (**Capítulo 6**). Los resultados obtenidos mediante ambas técnicas se muestran en la **Tabla 8.2**. En el caso de los scFv multimerizados, los resultados muestran concordancia con los obtenidos empleando fago-anticuerpos. A pesar de no alcanzar los niveles de sensibilidad obtenidos con los fago anticuerpos, el ELISA indirecto empleando los scFv multimerizados presenta la ventaja de acortar los tiempos de análisis y de requerir menor manipulación, por lo que sería más apropiado a la hora de analizar un mayor número de muestras. Además, como se ha explicado anteriormente, la molécula de biotina permite su adaptación a diferentes tipos de ensayos. En una etapa posterior sería conveniente comprobar si es posible mejorar la sensibilidad de la técnica empleando los anticuerpos marcados con avidina fluorescente. Cabe destacar que los scFv individualizados (esto es, sin formar multímeros), a diferencia de los fago-anticuerpos y los scFv multimerizados, no consiguieron detectar la presencia de almendra mediante ELISA, lo que concuerda con los resultados obtenidos cuando se trató de producir fragmentos solubles a partir de la cepa de *E. coli* HB2151.

Existen antecedentes de la utilización de la levadura metilotrófica *P. pastoris* para la producción de fragmentos de anticuerpo (Cai *et al.*, 2014; Maeng *et al.*, 2012; Sommaruga *et al.*,

2011), pero en ninguno de los trabajos publicados se emplea una estrategia de biotilación *in vivo* de anticuerpos. Por su parte, Cloutier *et al.* (2000) utilizaron *E. coli* como sistema para producir y biotilar los scFv, con las desventajas inherentes a los sistemas de expresión procariota. Predonzani *et al.* (2008) describieron un sistema de expresión y biotilación *in vivo* de scFv empleando un plásmido bigénico en células de mamífero, de mayor complejidad que el sistema descrito en este trabajo.

Por tanto, la aportación original y novedosa de este objetivo de la tesis doctoral ha consistido en la producción de fragmentos de anticuerpo biotilados funcionales empleando un único clon de *P. pastoris* co-transformado con dos plásmidos, que pueden emplearse para la detección de la presencia de almendra en alimentos mediante técnicas de ELISA.

CAPÍTULO 10

CONCLUSIONES

CHAPTER 10

CONCLUSIONS

Primera. Los sistemas de PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis, diseñados en el gen de la albúmina 2S de la nuez de Brasil y en la región ITS1 de la almendra, han permitido la detección específica e inequívoca de ADN de estos frutos de cáscara en alimentos. Los límites de detección alcanzados fueron de 2.5 mg kg^{-1} para la nuez de Brasil y de 0.1 mg kg^{-1} para la almendra, lo que las convierte en las técnicas de PCR más sensibles publicadas hasta el momento con este fin.

Segunda. El análisis de productos comerciales con los sistemas de PCR en tiempo real desarrollados demostró la existencia de fraudes de sustitución en productos que declaraban nuez de Brasil en el etiquetado, pero no la contenían. Asimismo, se demostró la presencia de almendra en productos que no declaraban este ingrediente. Estos resultados evidencian la necesidad de disponer de metodologías como las desarrolladas en este trabajo, capaces de asegurar el cumplimiento del Reglamento (UE) 1169/2011, tanto para proteger la salud de los consumidores alérgicos, como para detectar posibles fraudes por sustitución.

Tercera. Se ha demostrado por primera vez que es posible utilizar fragmentos de anticuerpos scFv, aislados a partir de genotecas de fagos recombinantes, como alternativa a los anticuerpos producidos en animales para la detección de frutos de cáscara alérgicos. Los fago-anticuerpos BE95 frente a nuez de Brasil y PD1F6 y PD2C9 frente a almendra, se han empleado con éxito para la detección específica de estos ingredientes alérgicos en alimentos mediante técnicas de ELISA. Los LOD alcanzados fueron de 5 mg g^{-1} para la nuez de Brasil, y de 0.1 mg g^{-1} para la almendra.

Cuarta. Mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas, espectroscópicas y de ultracentrifugación, se ha determinado que los fago-anticuerpos aislados frente a nuez de Brasil (BE95) y frente a almendra (PD1F6 y PD2C9), reconocen epítomos conformacionales en dos alérgenos principales de estos frutos secos pertenecientes a la familia de las globulinas 11S: Ber e 2 y Pru du 6.

Quinta. Este es el primer estudio que describe la producción de scFv biotinilados *in vivo* mediante un único clon de *P. pastoris* co-transformado con dos vectores de expresión. El sistema desarrollado con el scFv PD1F6 ha permitido la producción de grandes cantidades de anticuerpo biotinilado y su multimerización sobre un núcleo de avidina-peroxidasa. Los multímeros conservan la capacidad de reconocer la proteína de almendra con un LOD estimado de 470 mg kg^{-1} cuando se emplean en técnicas de ELISA. Estos resultados abren la posibilidad de utilizar avidina marcada con diferentes moléculas para producir multímeros que puedan emplearse como sondas en diferentes plataformas analíticas para la detección de ingredientes alérgicos en alimentos.

First. The real-time PCR systems using hydrolysis probes designed upon the albumin 2S gene for Brazil nut and the ITS1 region for almond, allowed specific and unequivocal detection of DNA from these tree nut species in foodstuffs. The detection limits achieved were 2.5 mg kg⁻¹ for Brazil nut and 0.1 mg kg⁻¹ for almond, being the most sensitive PCR techniques published up to date for detection of Brazil nut and almond in foodstuffs.

Second. Real-time PCR analysis of a wide variety of commercial food products revealed fraudulent substitution of ingredients in some products that declared to contain Brazil nut, but rendered negative amplification results for this target. Moreover, almond DNA was detected in products that did not declare almond in the label. These results prove the need for methodologies such as those developed in this work to ensure compliance with Regulation (EU) 1169/2011, both to protect allergic consumers, and to detect food frauds.

Third. For the first time, it has been demonstrated that allergenic tree nuts can be detected using scFv antibody fragments isolated from recombinant phage libraries as an alternative to antibodies raised in animals. The phage-antibodies BE95, targeting Brazil nut, and PD1F6 and PD2C9 targeting almond, were successfully used in ELISA techniques to specifically detect these allergenic ingredients in foods. The LOD achieved were 5 mg g⁻¹ for Brazil nut, and 0.1 mg g⁻¹ for almond.

Fourth. Electrophoretic, chromatographic, spectroscopic and ultracentrifugation techniques revealed that the phage-antibodies isolated against Brazil nut (BE95) and almond (PD1F6 and PD2C9) target conformational epitopes on two major allergens of these tree nuts, belonging to the 11S globulin family: Ber e 2 and Pru du 6.

Fifth. This is the first study describing the production of *in vivo* biotinylated scFv by a single *P. pastoris* clone co-transformed with two expression plasmids. The method, developed with PD1F6 scFv, allowed production of large quantities of biotinylated antibodies and their multimerization via an avidin-peroxidase core. ScFv multimers retain the ability to recognize almond protein in ELISA techniques with an estimated LOD of 470 mg kg⁻¹. These results open the possibility of using different avidin labelled molecules to synthesize scFv multimeric probes that could be used in different analytical platforms for detection of allergenic ingredients in foods.

CAPÍTULO 11

TRABAJO FUTURO

La tecnología de *phage display* ha posibilitado la obtención de fragmentos de anticuerpos recombinantes que permiten la detección de proteínas de almendra y de nuez de Brasil en alimentos sin la necesidad de inmunizar animales. La posterior modificación funcional del scFv PD1F6 con el dominio aceptor de biotina y la estrategia desarrollada para su biotilación *in vivo* por la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, han permitido multimerizar los scFv con un núcleo de avidina-peroxidasa y mejorar de esta forma la técnica de ELISA para la detección de almendra en alimentos. Modificando la molécula marcadora del núcleo de avidina (con fluorocromos, nanopartículas, indicadores redox, etc.) se obtendrían tetrámeros de anticuerpos recombinantes que podrían emplearse en diferentes plataformas analíticas como los dispositivos de flujo lateral, *arrays* o biosensores.

Como continuación del trabajo realizado en esta tesis doctoral, se propone ampliar el número de alérgenos detectados y mejorar la sensibilidad y facilidad de uso de las técnicas desarrolladas para su empleo en matrices complejas. Ello implicará la obtención y caracterización de fragmentos de anticuerpos recombinantes, a partir de las genotecas comerciales de fagos recombinantes (Tomlinson I + J, dAb u otras), frente a otros frutos secos alergénicos recogidos en el Anexo II del Reglamento (UE) 1169/2011, como la avellana (*Corylus avellana*), el pistacho (*Pistacia vera*) y la nuez (*Juglans regia*), siguiendo el procedimiento descrito en los Capítulos 5 y 6 de la presente tesis doctoral. La elección de estas especies se ha realizado teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los trabajos de PCR en tiempo real desarrollados previamente (López-Calleja *et al.*, 2015, 2014, 2013), en los que se puso en evidencia su presencia no declarada en un gran número de productos comerciales (de los 214 productos analizados, el 19.5 %, 39 % y 45 % de productos que no declaraban la presencia de pistacho, nuez y avellana, respectivamente, contenían trazas de estos alérgenos).

Una de las limitaciones de las genotecas Tomlinson I + J es que la diversidad de fragmentos disponibles ($1.4 \cdot 10^8$), puede resultar insuficiente para encontrar sondas específicas de interés. Además, en las secuencias codificantes pueden encontrarse codones de terminación o glicosilaciones que no se producen en la naturaleza, y que pueden limitar la producción en forma de inmunoglobulinas y su empleo en inmunoensayos (Chan *et al.*, 2011). Por ello, se propone también recurrir a genotecas con un mayor grado de diversidad de fragmentos de anticuerpos, como la genoteca de *Domain antibodies* (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Reino Unido), con $3 \cdot 10^9$ variantes de dAb, o HuCAL (*Human Combinatorial Antibody Library*, AbD Serotec), que abarca un repertorio más amplio de Fabs de anticuerpos (hasta $4.5 \cdot 10^{10}$ combinaciones posibles).

Además de la obtención de anticuerpos recombinantes frente a avellana, pistacho y nuez, se propone la identificación de las dianas moleculares reconocidas por los anticuerpos recombinantes seleccionados, así como la caracterización de la interacción molecular entre dichos epítomos y los correspondientes anticuerpos. De esta forma, se busca comprender mejor las

características específicas de cada alérgeno que permiten su reconocimiento, así como contribuir a mejorar el diagnóstico de las alergias alimentarias y el conocimiento de los factores que hacen que un determinado alimento sea alergénico. Para la identificación de los epítomos reconocidos por los anticuerpos recombinantes que se obtengan frente a avellana, pistacho y nuez se propone utilizar técnicas de fraccionamiento cromatográfico, ELISA y MALDI-TOF/TOF. La caracterización de la estabilidad del epítomo se evaluará mediante ELISA de los extractos proteicos sometidos a distintos tratamientos (calor, reducción de puentes disulfuro, digestión enzimática) y mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes, así como *Western blot* de los extractos proteicos y de las fracciones obtenidas mediante cromatografía líquida. Finalmente, mediante la técnica de resonancia de plasmones superficiales (SRP), empleando el instrumento Biacore 3000, se buscará conocer las características de la interacción entre los alérgenos de almendra, nuez de Brasil, avellana, pistacho y nuez y los anticuerpos recombinantes obtenidos.

Para el desarrollo de técnicas inmunoquímicas (ELISA e inmunocromatografía) de detección de avellana, pistacho y nuez en alimentos, se propone la introducción de modificaciones funcionales en los anticuerpos (conjugación con biotina, peroxidasa, fluorocromos o marcaje con oro coloidal) con el fin de optimizar la visualización y sensibilidad de la detección, tratando de alcanzar niveles de detección cercanos a 1 mg kg^{-1} en alimentos. Los fago-anticuerpos específicos frente a avellana, pistacho y nuez, así como los fragmentos scFv o Fab purificados, con y sin modificación funcional, se emplearán en el desarrollo de técnicas de ELISA indirecto y competitivo indirecto para su detección en alimentos. También se emplearán para desarrollar técnicas inmunocromatográficas rápidas y sencillas para la detección de uno o varios alérgenos simultáneamente, que se puedan utilizar con fines cualitativos en el análisis de materias primas y productos comerciales sin necesidad de un entorno laboratorial complejo. Para el desarrollo de dispositivos de flujo lateral de detección de múltiples alérgenos (**Figura 11.1**) se propone emplear inicialmente el procedimiento descrito por Yang *et al.*, 2015. El dispositivo emplea un formato sándwich y consta de una membrana g3RAD (RapidAssays, Dinamarca), que

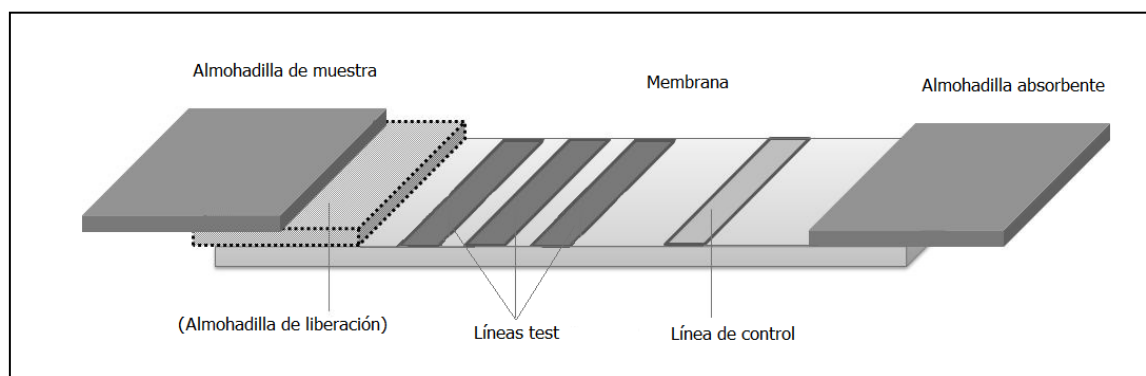


Figura 11.1. Figura esquemática de un dispositivo de flujo lateral de detección múltiple. (Adaptado de Anfossi *et al.*, 2013).

contiene tres líneas test (con anti-rodamina, anti-fluoresceína y una proteína de unión a biotina, respectivamente), además de la línea control, capaz de atrapar anticuerpos de ratón, conejo y cabra. Los distintos anticuerpos de captura se conjugarán con FITC (isotiocianato de fluoresceína), RITC (isotiocianato de rodamina) y biotina, respectivamente, y el anticuerpo de detección con oro coloidal. Como sondas específicas de cada alérgeno se pueden utilizar scFv, los cuales se detectan con un anticuerpo anti-c-myc, o anti-His-tag producido en las especies animales anteriormente citadas. Otra alternativa es emplear fago-anticuerpos como sondas específicas, para cuya detección se emplearía un anticuerpo anti-M13.

Por otra parte, la conjugación de los fragmentos de anticuerpo con nanopartículas de oro coloidal permitirá, además de su aplicación en técnicas de inmunocromatografía, su aplicación en biosensores para la detección de biomoléculas en muestras líquidas o extractos solubles (Cao *et al.*, 2011b). La puesta a punto de esta metodología precisa de anticuerpos recombinantes con una estabilidad y afinidad adecuadas a temperatura ambiente, así como conocer las condiciones óptimas de pH y de concentración de anticuerpos para su marcaje con oro coloidal (Pham *et al.*, 2012). No obstante, en el caso de disponer de lectores de fluorescencia o sensores magnetosensitivos, sería posible conjugar los anticuerpos con nanopartículas luminiscentes (como puntos cuánticos, partículas basadas en la tecnología UCP (*up-converting phosphor*) o partículas dopadas con colorante), o partículas magnéticas, lo que además permitiría incrementar la sensibilidad de la técnica (Hua *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2012a).

En lo que respecta a la conjugación con biotina, se propone la expresión de los fragmentos de anticuerpos que se aíslan frente a avellana, pistacho y nuez en plásmidos de expresión derivados del vector pMJA181. En este sentido, cabe recordar la necesidad de llevar a cabo la modificación funcional de los clones del fragmento de anticuerpo BE95, empleado en la detección de nuez de Brasil. El fragmento de anticuerpo BE95 presenta la peculiaridad de no tratarse de un scFv completo, puesto que carece de cadena pesada. Para llevar a cabo su modificación funcional es necesario diseñar cebadores que permitan la incorporación de lugares de restricción para la inclusión de la secuencia codificadora del fragmento de anticuerpo en el plásmido de expresión pMJA181, que incluye el BAD, una vez eliminada la secuencia nucleotídica correspondiente al clon PD1F6. A este respecto, existen tres posibles estrategias a desarrollar:

(1) La primera consistiría en la inserción de la secuencia nucleotídica completa del fragmento de anticuerpo BE95 (**Figura 11.2**). Para ello, se empleará el cebador MJA260 (**Tabla 11.1**), que incluye un sitio de restricción *Pst*I. Tras realizar la reacción de PCR con los cebadores MJA260 y MJA253, el amplicón resultante se digerirá con las enzimas de restricción *Pst*I y *Not*I, para su inserción en el plásmido de expresión pMJA181, previamente digerido con las mismas enzimas, y tras eliminar el fragmento nucleotídico correspondiente al clon PD1F6. El clon resultante tendría la estructura que se muestra en la **Figura 11.3A**.

(2) La segunda estrategia consistiría en la expresión únicamente de la cadena ligera del clon BE95 (lo que conlleva la eliminación de la secuencia correspondiente al péptido conector) (**Figura 11.2**). Para ello, se empleará el cebador MJA261 (**Tabla 11.1**), que incluye un sitio de restricción *Pst*I. Tras la amplificación mediante PCR con los cebadores MJA261 y MJA253, se seguirá el mismo procedimiento descrito en el punto anterior. El clon resultante tendría la estructura que se muestra en la **Figura 11.3B**.

(3) Finalmente, se propone la modificación de la secuencia nucleotídica del anticuerpo BE95 para añadir una cadena pesada. Una primera aproximación consistirá en sustituir la cadena ligera del scFv del plásmido pMJA181 (o de cualquier fragmento de anticuerpo completo que se haya aislado hasta el momento) por la cadena ligera del clon BE95, para observar cómo se modifica el comportamiento del fragmento de anticuerpo resultante en cuanto a su afinidad y especificidad para reconocer a la nuez de Brasil.

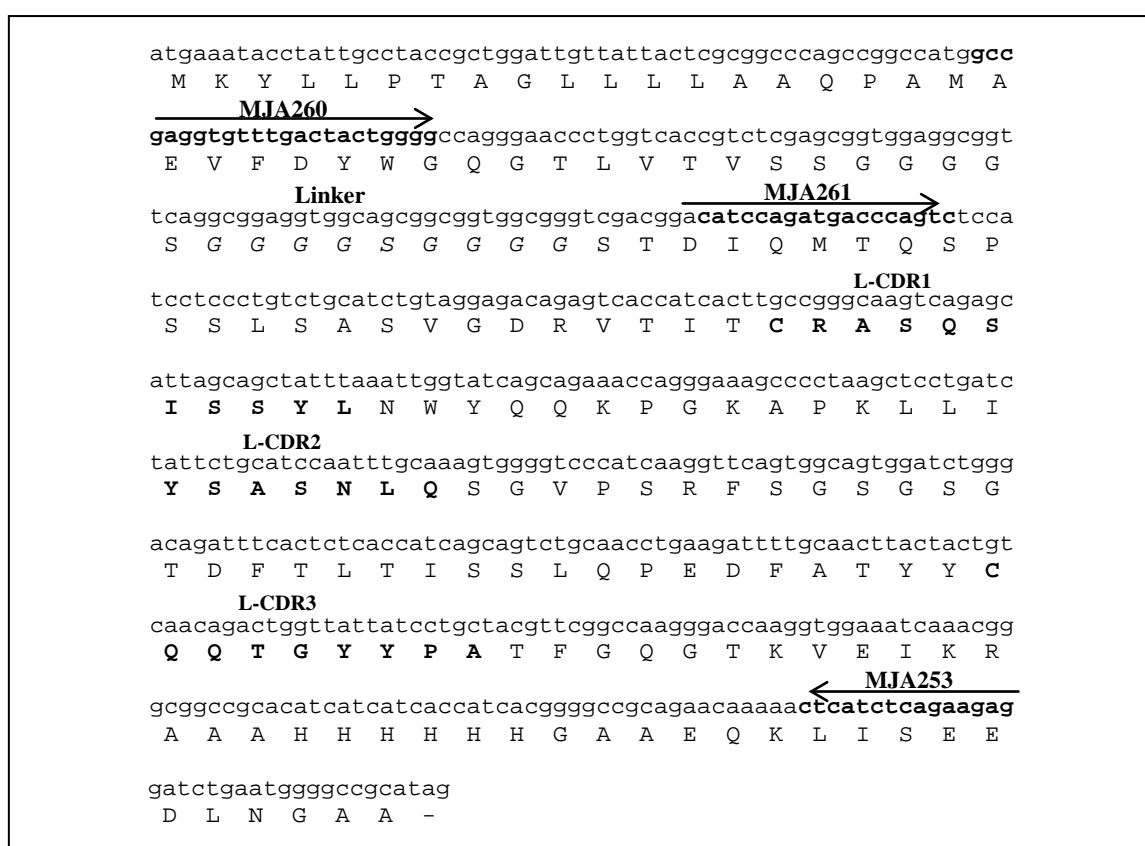


Figura 11.2. Secuencia nucleotídica del clon BE95, incluyendo la secuencia aminoacídica correspondiente, en la que se destacan las regiones que hibridan con los cebadores diseñados para este trabajo. Se indican también las posiciones de las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera.

Los resultados que se esperan obtener tras la consecución de estos objetivos implican beneficios para los consumidores, las autoridades sanitarias, los laboratorios de análisis de alimentos y las industrias alimentarias, ya que proporcionan una serie de técnicas analíticas que

permiten detectar e identificar ingredientes alergénicos en los alimentos, con el fin de garantizar la veracidad del etiquetado, comprobar la ausencia de contaminaciones cruzadas, y determinar la eficacia de los métodos de limpieza aplicados.

Tabla 11.1. Listado de cebadores empleados, en los que se destaca el sitio de restricción *Pst*I.

| Cebador | Secuencia |
|---------|--|
| MJA253 | CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTGTTC |
| MJA260 | TATATT <u>CTGCAG</u> CCGAGGTGTTTGACTACTGGGG |
| MJA261 | TATTA <u>CTGCAG</u> ACGGACATCCAGATGACCCAGTCT |

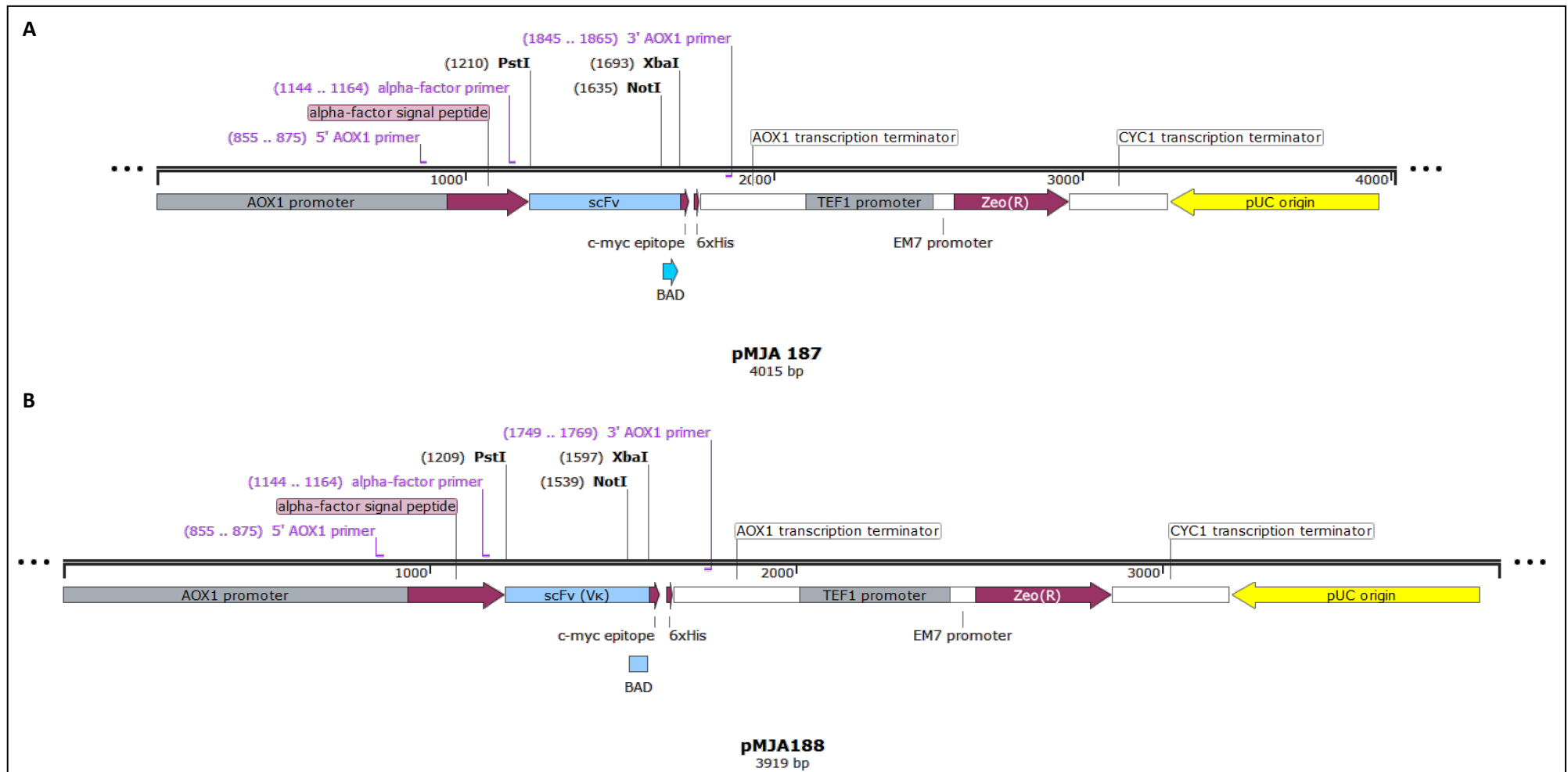


Figura 11.3. Detalle del mapa de los vectores, que incluyen la secuencia nucleotídica del clon BE95 correspondiente y el BAD, construidos en el plásmido pPICZαB (Zeo^r; plásmido integrativo portador de la secuencia del péptido señal del precursor del factor α y sitios funcionales para la integración en el locus 5'AOX1 de *P. pastoris* X-33).

CAPÍTULO 12

BIBLIOGRAFÍA

- Abolhassani, M., Roux, K.H., 2009. cDNA cloning, expression and characterization of an allergenic 60s ribosomal protein of almond (*Prunus dulcis*). *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* 8, 77-84.
- Acosta, M.R., Roux, K.H., Teuber, S.S., Sathe, S.K., 1999. Production and characterization of rabbit polyclonal antibodies to almond (*Prunus dulcis* L.) major storage protein. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4053-4059.
- Adda, C. G., Anders, R. F., Tilley, L., Foley, M., 2002. Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 5, 1-14.
- AECOSAN, 2015. Guía de aplicación de las exigencias de información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador y de los envasados por los titulares del comercio al por menor. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/noticias/2015/guia_aplicacion_informacion.pdf (consultado en septiembre 2016).
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H., 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5301-5317.
- Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hu, X., Kumar, A., Akram, N.A., Al-Qurainy, F., 2012a. Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnol. Adv.* 30, 524-540.
- Ahmad, Z.A., Yeap, S.K., Ali, A.M., Ho, W.Y., Alitheen, N.B.M., Hamid, M., 2012b. ScFv antibody: principles and clinical application. *J. Immunol. Res.* Article ID 980250, 15 pages.
- Alasalvar, C., Shahidi, F., 2008. Tree nuts: composition, phytochemicals, and health effects: an overview, en Alasalvar, C., Shahidi, F. (Eds.), *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects*. CRC Press, Boca Raton, FL, Estados Unidos, pp. 1-6.
- Albillos, S.M., Jin, T., Howard, A., Zhang, Y., Kothary, M.H., Fu, T.J., 2008. Purification, crystallization and preliminary X-ray characterization of prunin-1, a major component of the almond (*Prunus dulcis*) allergen amandin. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5352-5358.
- Albillos, S.M., Menhart, N., Fu, T.J., 2009. Structural stability of amandin, a major allergen from almond (*Prunus dulcis*), and its acidic and basic polypeptides. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4698-4705.
- Alcocer, M., Doyen, C., Lee, H.A., Morgan, M.R.A., 2000. Properties of polyclonal, monoclonal, and recombinant antibodies recognizing the organophosphorus pesticide chlorpyrifos-ethyl. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4053-4059.
- Alcocer, M., Rundqvist, L., Larsson, G., 2012. Ber e 1 protein: the versatile major allergen from Brazil nut seeds. *Biotechnol. Lett.* 34, 597-610.
- Allen, K.J., Hill, D.J., Heine, R.G., 2006. Food allergy in childhood. *Med. J. Aust.* 185, 394-400.
- Allen, K.J., Koplin, J.J., 2012. The epidemiology of IgE-mediated food allergy and anaphylaxis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 32, 35-50.
- Allen, K.J., Turner, P.J., Pawankar, R., Taylor, S., Sicherer, S., Lack, G., Rosario, N., Ebisawa, M., Wong, G., Mills, E.N.C., Beyer, K., Fiocchi, A., Sampson, H.A., 2014. Precautionary labelling of foods for allergen content: are we ready for a global framework? *World Allergy Organ. J.* 7, 10.
- Almquist, K.C., McLean, M.D., Niu, Y., Byrne, G., Olea-Popelka, F.C., Murrant, C., Barclay, J., Hall, J.C., 2006. Expression of an anti-botulinum toxin A neutralizing single-chain Fv recombinant antibody in transgenic tobacco. *Vaccine* 24, 2079-2086.
- Alvarez, I., Wendel, J.F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 417-434.
- Alvarez, P.A., Boye, J.I., 2012. Food production and processing considerations of allergenic food ingredients: a review. *J. Allergy*, 2012, Article ID 746125, 14 pages.
- Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., Giraudi, G., 2013. Lateral flow immunoassays for aflatoxins B and G and for aflatoxin M1, en Razzaghi-Abyaneh, M. (Ed.), *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. InTech, pp. 315- 339. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-recent-advances-and-future-prospects/lateral-flow-immunoassays-for-aflatoxins-b-and-g-and-for-aflatoxin-m1> (consultado en julio 2016).
- Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., MacKenzie, R., 2005. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev.* 24, 501-519.
- Arbulu, S., Jiménez, J.J., Gútiérrez, L., Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E., 2015. Cloning and expression of synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by recombinant *Pichia pastoris*. *BioMed Res. Int.* 2015, Article ID 767183, 11 pages.
- Arif, S.H., Jabeen, M., Hasnain, A.U., 2007. Biochemical characterization and thermostable capacity of parvalbumins: the major fish-food allergens. *J. Food Biochem.* 31, 121-137.
- Arlorio, M., Cereti, E., Coisson, J.D., Travaglia, F., Martelli, A., 2007. Detection of hazelnut (*Corylus* spp.) in processed foods using real-time PCR. *Food Control* 18, 140-148.
- Ascione, A., Flego, M., Zamboni, S., de Cinti, E., Dupuis, M.L., Cianfriglia, M., 2005. Application of a synthetic phage antibody library (ETH-2) for the isolation of single chain fragment variable (scFv) human antibodies to the pathogenic isoform of the hamster prion protein (HaPrPsc). *Hybridoma* 24, 127-132.
- Bandaranayake, A.D., Almo, S.C., 2014. Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett.* 588, 253-260.
- Barbieri, G., Frigeri, G., 2006. Identification of hidden allergens: Detection of pistachio traces in mortadella. *Food Addit. Contam.* 23, 1260-1264.
- Baumgartner, S., Krška, R., Welzig, E., 2007. Detecting allergens in foods, en Mills, C., Wichers, H., Hoffmann-Sommergruber, K. (Eds.), *Managing Allergens in Food*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido, pp. 228-250.
- Beckett, D., Kovaleva, E., Schatz, P.J., 1999. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 8, 921-929.
- Ben Rejeb, S., Abbott, M., Davies, D., Cléroux, C., Delahaut, P., 2005. Multi-allergen screening immunoassay for the detection of protein markers of peanut and four tree nuts in chocolate. *Food Addit. Contam.* 22, 709-715.
- Bergerová, E., Brežná, B., Kuchta, T., 2011. A novel method with improved sensitivity for the detection of peanuts based upon single-tube nested real-time polymerase chain reaction. *Eur. Food Res. Technol.* 232, 1087-1091.
- Berti, F., Laschi, S., Palchetti, I., Rossier, J.S., Reymond, F., Mascini, M., Marrazza, G., 2009. Microfluidic-based electrochemical genosensor coupled to magnetic beads for hybridization detection. *Talanta* 77, 971-978.
- Beyer, K., Bardina, L., Grishina, G., Ashraf, A., Teuber, S., Niggemann, B., Sampson, H.A., 2008. Identification of a new Brazil nut allergen - Ber e 2. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, S247.

- Billakanti, J.M., Fee, C.J., Lane, F.R., Kash, A.S., Fredericks, R., 2010. Simultaneous, quantitative detection of five whey proteins in multiple samples by surface plasmon resonance. *Int. Dairy J.* 20, 96-105.
- Bindslev-Jensen, C., Briggs, D., Osterballe, M., 2002. Can we determine a threshold level for allergenic foods by statistical analysis of published data in the literature? *Allergy* 57, 741-746.
- Birch, J.R., Racher, A.J., 2006. Antibody production. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 671-685.
- Bischoff, S.C., Sellge, G., 2013. The immunological basis of IgE-mediated reactions, en Metcalfe, D. D., Sampson, H. A., Simon, R. A., Lack, G. (Eds.), *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, Reino Unido, pp. 16-30.
- Blais, B.W., Gaudreault, M., Phillippe, L.M., 2003. Multiplex enzyme immunoassay system for the simultaneous detection of multiple allergens in foods. *Food Control* 14, 43-47.
- Blais, B.W., Omar, M., Phillippe, L., 2002. Detection of Brazil nut proteins in foods by enzyme immunoassay. *Food Agric. Immunol.* 14, 163-168.
- Bloch, K.D., Grossmann, B., 1995. Restriction endonucleases, en Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, Estados Unidos, pp. 3.1.1-3.1.21.
- Bolling, B.W., Chen, C.Y.O., McKay, D.L., Blumberg, J.B., 2011. Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutr. Res. Rev.* 24, 244-275.
- Boulter-Bitzer, J.I., Lee, H., Trevors, J.T., 2009. Single chain variable fragment antibodies selected by phage display against the sporozoite surface antigen S16 of *Cryptosporidium parvum*. *Exp. Parasitol.* 125, 124-129.
- Boyce, J.A., Assa'ad, A., Burks, A.W., Jones, S.M., Sampson, H.A., Wood, R.A., Plaut, M., Cooper, S.F., Fenton, M.J., Arshad, S.H., et al., 2011. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *Nutr. Res.* 31, 61-75.
- Bradbury, A.R.M., Marks, J.D., 2004. Antibodies from phage antibody libraries. *J. Immunol. Methods* 290, 29-49.
- Bradbury, A.R.M., Sidhu, S., Dübel, S., McCafferty, J., 2011. Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies. *Nat. Biotechnol.* 29, 245-254.
- Brar, H.K., Bhattacharyya, M.K., 2012. Expression of a single-chain variable-fragment antibody against a fusarium virguliforme toxin peptide enhances tolerance to sudden death syndrome in transgenic soybean plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 817-824.
- Bratkovic, T., 2010. Progress in phage display: evolution of the technique and its application. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 749-767.
- Breiteneder, H., Mills, E.N., 2008. Food allergens: molecular and immunological characteristics, en Metcalfe, D. D., Sampson, H. A., Simmon, R. A. (Eds.), *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives*. Blackwell Publishing, pp. 43-60.
- Breiteneder, H., Radauer, C., 2004. A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 821-830.
- Bremer, M.G.E.G., Smits, N.G.E., Haasnoot, W., 2009. Biosensor immunoassay for traces of hazelnut protein in olive oil. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 119-126.
- Brereton, H.M., Chamberlain, D., Yang, R., Tea, M., McNeil, S., Coster, D.J., Williams, K.A., 2007. Single chain antibody fragments for ocular use produced at high levels in a commercial wheat variety. *J. Biotechnol.* 129, 539-546.
- Brežná, B., Dudášová, H., Kuchta, T., 2008. A novel real-time polymerase chain reaction method for the qualitative detection of pistachio in food. *Eur. Food Res. Technol.* 228, 197-203.
- Brežná, B., Dudášová, H., Kuchta, T., 2010. A novel real-time polymerase chain reaction method for the detection of Brazil nuts in food. *J. AOAC Int.* 93, 197-201.
- Brežná, B., Hudecová, L., Kuchta, T., 2006. A novel real-time polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of walnuts in food. *Eur. Food Res. Technol.* 223, 373-377.
- Brežná, B., Kuchta, T., 2008. A novel real-time polymerase chain reaction method for the detection of pecan nuts in food. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 1113-1118.
- Brežná, B., Píknová, L., Kuchta, T., 2009. A novel real-time polymerase chain reaction method for the detection of macadamia nuts in food. *Eur. Food Res. Technol.* 229, 397-401.
- British Retail Consortium, 2014. BCR guidelines for allergen management in food manufacturing. <http://allergenbureau.net/brc-guidelines-allergen-management-food-manufacturing/>
- Brocks, B., Rode, H.J., Klein, M., Gerlach, E., Dübel, S., Little, M., Pfizenmaier, K., Moosmayer, D., 1997. A TNF receptor antagonistic scFv, which is not secreted in mammalian cells, is expressed as a soluble mono- and bivalent scFv derivative in insect cells. *Immunotechnology* 3, 173-184.
- Brzezinski, J.L., 2006. Detection of cashew nut DNA in spiked baked goods using a real-time polymerase chain reaction method. *J. AOAC Int.* 89, 1035-1038.
- Buchanan, R., Dennis, S., Gendel, S., Acheson, D., Assimon, S.A., Beru, N., Bolger, P., Carlson, D., Carvajal, R., Copp, C., et al., Threshold Working Group, 2008. Approaches to establish thresholds for major food allergens and for gluten in food. *J. Food Prot.* 71, 1043-1088.
- Burks, A.W., Tang, M., Sicherer, S., Muraro, A., Eigenmann, P. A., Motohiro, E., Alessandro, F., Chiang, W., Beyer, K., Wood, R., et al., 2012. ICON: food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 906-920.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W., 2005. Quantitative real-time RT-PCR - A perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 597-601.
- Cai, F., Li, T., Xie, Y., He, X., 2014. Expression of functional single-chain variable domain fragment (scFv) antibody against Metolcarb in *Pichia pastoris*. *Ann. Microbiol.* 64, 589-597.
- Cai, H., Chen, L., Wan, L., Zeng, L., Yang, H., Li, S., Li, Y., Cheng, J., Lu, X., 2009. High-level expression of a functional humanized anti-CTLA4 single-chain variable fragment antibody in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 41-48.
- Camacho, M., Torres, A., Gil-Alegre, M.E., Obregón, M., Ruz, V., 1993. Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pract.* 3, 197-202.
- Cao, Q., Zhao, H., Yang, Y., He, Y., Ding, N., Wang, J., Wu, Z., Xiang, K., Wang, G., 2011a. Electrochemical immunosensor for casein based on gold nanoparticles and poly(L-Arginine)/multi-walled carbon nanotubes composite film functionalized interface. *Biosens. Bioelectron.* 26, 3469-3474.

- Cao, X., Ye, Y., Liu, S., 2011b. Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing. *Anal. Biochem.* 417, 1-16.
- Cao, X., Yu, H., Chen, C., Wei, J., Wang, P., 2015. Expression and characterization of recombinant humanized anti-HER2 single-chain antibody in *Pichia pastoris* for targeted cancer therapy. *Biotechnol. Lett.* 37, 1347-1354.
- Carter, P. J., 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 343-357.
- Casali, N., 2003. *Escherichia coli* host strains, en Casali, N., Preston, A. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, Estados Unidos, 235, pp 27-48.
- Catherman, A.D., Skinner, O.S., Kelleher, N.L., 2014. Top down proteomics: facts and perspectives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445, 683-693.
- CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 12794-12797.
- Çelik, E., Çalik, P., 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol. Adv.* 30, 1108-1118.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 45-66.
- Chan, C.E.Z., Chan, A.H.Y., Lim, A.P.C., Hanson, B.J., 2011. Comparison of the efficiency of antibody selection from semi-synthetic scFv and non-immune Fab phage display libraries against protein targets for rapid development of diagnostic immunoassays. *J. Immunol. Methods* 373, 79-88.
- Chancey, C.J., Khanna, K.V., Seegers, J.F.M.L., Zhang, G.W., Hildreth, J., Langan, A., Markham, R.B., 2006. Lactobacilli-expressed single-chain variable fragment (scFv) specific for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) blocks cell-associated HIV-1 transmission across a cervical epithelial monolayer. *J. Immunol.* 176, 5627-5636.
- Chang, H.J., Choi, S.W., Chun, H.S., 2008. Expression of functional single-chain variable domain fragment antibody (scFv) against mycotoxin zearalenone in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 30, 1801-1806.
- Chapman, J.A., Bernstein, I.L., Lee, R.E., Oppenheimer, J., Nicklas, R.A., Portnoy, J.M., Sicherer, S.H., Schuller, D.E., Spector, S.L., Khan, D., et al., 2006. Food allergy: a practice parameter. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 96, S1-S68.
- Chapman-Smith, A, Mulhern, T.D., Whelan, F., Cronan, J.E., Wallace, J.C., 2001. The C-terminal domain of biotin protein ligase from *E. coli* is required for catalytic activity. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 10, 2608-2617.
- Chassaing, H., Nørgaard, J.V., van Hengel, A.J., 2007. Proteomics-based approach to detect and identify major allergens in processed peanuts by capillary LC-Q-TOF (MS/MS). *J. Agric. Food Chem.* 55, 4461-4473.
- Chen, C.Y., Lapsley, K., Blumberg, J., 2006. A nutrition and health perspective on almonds. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2245-2250.
- Chen, Y., Zhu, X., Zhang, X., Liu, B., Huang, L., 2010. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Mol. Ther.* 18, 1650-1656.
- Cheng, F., Wu, J., Zhang, J., Pan, A., Quan, S., Zhang, D., Kim, H., Li, X., Zhou, S., Yang, L., 2016. Development and inter-laboratory transfer of a decaplex polymerase chain reaction assay combined with capillary electrophoresis for the simultaneous detection of ten food allergens. *Food Chem.* 199, 799-808.
- Christ, D., Famm, K., Winter, G., 2007. Repertoires of aggregation-resistant human antibody domains. *Protein Eng. Des. Sel.* 20, 413-416.
- Christofakis, M., Aglaia, X., 2014. LC-MS/MS techniques for food allergen testing, en Siragakis, G., Dimosthenis, K. (Eds.), *Food Allergen Testing: Molecular, Immunochemical and Chromatographic Techniques*. Wiley-Blackwell, Chichester, Reino Unido, pp. 49-65.
- Chu, P.T., Lin, C.S., Chen, W.J., Chen, C.F., Wen, H.W., 2012. Detection of gliadin in foods using a quartz crystal microbalance biosensor that incorporates gold nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6483-6492.
- Chunhieng, T., Pétritis, K., Elfakir, C., Brochier, J., Goli, T., Montet, D., 2004. Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4318-4322.
- Cianferoni, A., Spergel, J.M., 2009. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol. Int.* 58, 457-466.
- Ćirković Veličković, T., Gavrović-Jankulović, M., 2014. Methods for allergen identification and quantification in food matrices, en Ćirković Veličković, T., Gavrović-Jankulović, M. (Eds.), *Food Allergens*. Springer New York, NY, Estados Unidos, pp. 77-93.
- Clemente, A., Chambers, S.J., Lodi, F., Nicoletti, C., Brett, G.M., 2004. Use of the indirect competitive ELISA for the detection of Brazil nut in food products. *Food Control* 15, 65-69.
- Clementi, N., Mancini, N., Solfrosi, L., Castelli, M., Clementi, M., Burioni, R., 2012. Phage display-based strategies for cloning and optimization of monoclonal antibodies directed against human pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8273-8292.
- Cloutier, S.M., Couty, S., Terskikh, A., Marguerat, L., Crivelli, V., Pugnères, M., Mani, J.C., Leisinger, H.J., Mach, J.P., Depertthes, D., 2000. Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of in vivo biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin. *Mol. Immunol.* 37, 1067-1077.
- Cochrane, S.A., Salt, L.J., Wantling, E., Rogers, A., Coutts, J., Ballmer-Weber, B.K., Fritsche, P., Fernández-Rivas, M., Reig, I., Knulst, A., et al., 2012. Development of a standardized low-dose double-blind placebo-controlled challenge vehicle for the EuroPrevall project. *Allergy* 67, 107-113.
- Commission Directive 2007/68/EC of 27 November 2007 amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain food ingredients. *Off. J. Eur. Union L* 310, 11-14.
- Commission Implementing Regulation (EU) 828/2014 of 30 July 2014 on the requirements for the provision of information to consumers on the absence or reduced presence of gluten in food. *Off. J. Eur. Union L* 228, 5-8.
- Corredor, E., Román, M., García, E., Perera, E., Arús, P., Naranjo, T., 2004. Physical mapping of rDNA genes establishes the karyotype of almond. *Ann. Appl. Biol.* 144, 219-222.
- Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I., Oliveira, M.B.P.P., 2012a. Almond allergens: molecular characterization, detection, and clinical relevance. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1337-1349.
- Costa, J., Mafra, I., Oliveira, M.B.P.P., 2012b. High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. *Food Chem.* 133, 1062-1069.
- Costa, J., Mafra, I., Kuchta, T., Oliveira, M.B.P.P., 2012c. Single-tube nested real-time PCR as a new highly sensitive approach to trace hazelnut. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8103-8110.
- Costa, J., Oliveira, M.B.P.P., Mafra, I., 2013a. Effect of thermal processing on the performance of the novel single-tube nested real-time PCR for the detection of walnut allergens in sponge cakes. *Food Res. Int.* 54, 1722-1729.
- Costa, J., Oliveira, M.B.P.P., Mafra, I., 2013b. Novel approach based on single-tube nested real-time PCR to detect almond allergens in foods. *Food Res. Int.* 51, 228-235.

- Cox, A., Sicherer, S.H., 2015. Peanut and tree nut allergy. *Chem. Immunol. Allergy* *101*, 131-144.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* *16*, 23-52.
- Crevel, R.W.R., Ballmer-Weber, B.K., Holzhauser, T., Hourihane, J.O., Knulst, A.C., Mackie, A.R., Timmermans, F., Taylor, S.L., 2008. Thresholds for food allergens and their value to different stakeholders. *Allergy* *63*, 597-609.
- Cronan, J.E., Reed, K.E., 2000. Biotinylation of proteins in vivo: a useful posttranslational modification for protein analysis. *Methods Enzymol.* *326*, 440-458.
- Cull, M. G., Schatz, P.J., 2000. Biotinylation of proteins *in vivo* and *in vitro* using small peptide tags. *Methods Enzymol.* *326*, 430-440.
- Cunsolo, V., Muccilli, V., Saletti, R., Foti, S., 2014. Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial. *J. Mass Spectrom.* *49*, 768-784.
- D'Agata, R., Corradini, R., Ferretti, C., Zanolli, L., Gatti, M., Marchelli, R., Spoto, G., 2010. Ultrasensitive detection of non-amplified genomic DNA by nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging. *Biosens. Bioelectron.* *25*, 2095-2100.
- D'Andrea, M., Coisson, J.D., Locatelli, M., Garino, C., Cereti, E., Arlorio, M., 2011. Validating allergen coding genes (*Cor a 1*, *Cor a 8*, *Cor a 14*) as target sequences for hazelnut detection via real-time PCR. *Food Chem.* *124*, 1164-1171.
- D'Andréa, M., Coisson, J.D., Travaglia, F., Garino, C., Arlorio, M., 2009. Development and validation of a SYBR-Green I real-time PCR protocol to detect hazelnut (*Corylus avellana* L) in foods through calibration via plasmid reference standard. *J. Agric. Food Chem.* *57*, 11201-11208.
- Dalton, A.C., Barton, W.A., 2014. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Sci.* *23*, 517-525.
- Daly, R., Hearn, M.T.W., 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* *18*, 119-138.
- Damasceno, L.M., Anderson, K.A., Ritter, G., Cregg, J.M., Old, L.J., Batt, C.A., 2007. Coexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *74*, 381-389.
- Damasceno, L.M., Huang, C.J., Batt, C.A., 2012. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *93*, 31-39.
- David, F., Westphal, R., Bunk, B., Jahn, D., Franco-Lara, E., 2010. Optimization of antibody fragment production in *Bacillus megaterium*: the role of metal ions on protein secretion. *J. Biotechnol.* *150*, 115-124.
- Davies, J.M., O'Hehir, R.E., Suphioglu, C., 2000. Use of phage display technology to investigate allergen-antibody interactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* *105*, 1085-1092.
- De Genst, E., Chirgadze, D.Y., Klein, F.A.C., Butler, D.C., Matak-Vinković, D., Trottier, Y., Huston, J.S., Messer, A., Dobson, C.M., 2015. Structure of a single-chain Fv bound to the 17 N-terminal residues of huntingtin provides insights into pathogenic amyloid formation and suppression. *J. Mol. Biol.* *427*, 2166-2178.
- De Jaeger, G., Buys, E., Eeckhout, D., De, W., Jacobs, A., Kapila, J., Angenon, G., Van, M., Gerats, T., Depicker, A., 1999. High level accumulation of single-chain variable fragments in the cytosol of transgenic *Petunia hybrida*. *Eur. J. Biochem.* *259*, 426-434.
- de la Cruz, S., Cubillos-Zapata, C., López-Calleja, I.M., Ghosh, S., Alcocer, M., González, I., Martín, R., García, T., 2015. Isolation of recombinant antibody fragments (scFv) by phage display technology for detection of almond allergens in food products. *Food Control* *54*, 322-330.
- de la Cruz, S., López-Calleja, I. M., Alcocer, M., González, I., Martín, R., García, T., 2013a. TaqMan real-time PCR assay for detection of traces of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in food products. *Food Control* *33*, 105-113.
- de la Cruz, S., López-Calleja, I.M., Alcocer, M., González, I., Martín, R., García, T., 2013b. Selection of recombinant antibodies by phage display technology and application for detection of allergenic Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in processed foods. *J. Agric. Food Chem.* *61*, 10310-10319.
- Della Cristina, P., Castagna, M., Lombardi, A., Barison, E., Tagliabue, G., Ceriotti, A., Koutris, I., Di, L., Giansanti, F., Vago, R., et al., 2015. Systematic comparison of single-chain Fv antibody-fusion toxin constructs containing *Pseudomonas* Exotoxin A or saporin produced in different microbial expression systems. *Microb. Cell Factories* *14*, Article ID 19, 17 pages.
- Demain, A.L., Vaishnav, P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* *27*, 297-306.
- Demmel, A., Hupfer, C., Busch, U., Engel, K.H., 2012. Quantification of lupine (*Lupinus angustifolius*) in wheat flour using real-time PCR and an internal standard material. *Eur. Food Res. Technol.* *235*, 61-66.
- Dhakar, S., Liu, C., Zhang, Y., Roux, K.H., Sathe, S.K., Balasubramaniam, V.M., 2014. Effect of high pressure processing on the immunoreactivity of almond milk. *Food Res. Int.* *62*, 215-222.
- Diaz-Amigo, C., 2009. Antibody-based detection methods: from theory to practice, en Popping, B., Diaz-Amigo, C., Hoenicke, K. (Eds.), *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, Estados Unidos, pp. 221-245.
- Diaz-Amigo, C., Popping, B., 2009. Detection of food allergens, en Popping, B., Diaz-Amigo, C., Hoenicke, K (Eds.), *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemist*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, Estados Unidos, pp. 175- 198.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union* *L276*, 33-79.
- Doi, H., Touhata, Y., Shibata, H., Sakai, S., Urishu, A., Akiyama, H., Teshima, R., 2008. Reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of walnut proteins in processed foods. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 7625-7630.
- Domon, B., Aebersold, R., 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* *312*, 212-217.
- Dorak, M.T., 2006. High-throughput primer and probe design, en Dorak, M.T. (Ed.), *Real-time PCR*. BIOS advanced methods series, Taylor & Francis Group, New York, Estados Unidos.
- Dundas, C.M., Demonte, D., Park, S., 2013. Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *97*, 9343-9353.
- Dupont, C., 2011. Food allergy: recent advances in pathophysiology and diagnosis. *Ann. Nutr. Metab.* *59 Suppl 1*, 8-18.
- Dyck, M.K., Lacroix, D., Pothier, F., Sirard, M.A., 2003. Making recombinant proteins in animals - different systems, different applications. *Trends Biotechnol.* *21*, 394-399.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Scientific opinion on the evaluation of allergenic foods and food

- ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal* 12, 1-286.
- Ehlert, A., Demmel, A., Hupfer, C., Busch, U., Engel, K., 2009. Simultaneous detection of DNA from 10 food allergens by ligation-dependent probe amplification. *Food Addit. Contam.* 26, 409-418.
- Ehlert, A., Hupfer, C., Demmel, A., Engel, K.H., Busch, U., 2008. Detection of cashew nut in foods by a specific real-time PCR method. *Food Anal. Methods* 1, 136-143.
- Ehsani, P., Meunier, A., Nato, F., Jafari, A., Nato, A., Lafaye, P., 2003. Expression of anti-human IL-4 and IL-6 scFvs in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 52, 17-29.
- Eissa, S., Tlili, C., L'Hocine, L., Zourob, M., 2012. Electrochemical immunosensor for the milk allergen β -lactoglobulin based on electrografting of organic film on graphene modified screen-printed carbon electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 38, 308-313.
- Eldin, P., Pauza, M.E., Hieda, Y., Lin, G., Murtaugh, M.P., Pentel, P.R., Pennell, C.A., 1997. High-level secretion of two antibody single chain Fv fragments by *Pichia pastoris*. *J. Immunol. Methods* 201, 67-75.
- Emberson, L.M., Trivett, A.J., Blower, P.J., Nicholls, P.J., 2005. Expression of an anti-CD33 single-chain antibody by *Pichia pastoris*. *J. Immunol. Methods* 305, 135-151.
- Everstine, K., Spink, J., Kennedy, S., 2013. Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. *J. Food Prot.* 76, 723-735.
- Evtugyn, G., 2014. Introduction and overview of history, en *Biosensors: Essentials*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Alemania, pp. 1-20.
- Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P.E., García, T., Martín, R., 2009. A LightCycler TaqMan PCR assay for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in experimental meat mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 1997-2004.
- Fan, J., Shen, Z., Wang, G., Yang, H., Liu, Y., 2009. Secretory expression of human ScFv against keratin in *Pichia pastoris* and its effects on cultured keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 301, 367-372.
- Fanali, C., Dugo, L., Dugo, P., Mondello, L., 2013. Capillary-liquid chromatography (CLC) and nano-LC in food analysis. *Trends Anal. Chem.* 52, 226-238.
- FAOSTAT <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (consultado en marzo 2010).
- Fernández, A., García, T., Asensio, L., Rodríguez, M.A., González, I., Hernández, P.E., Martín, R., 2001. PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species. *J. Food Sci.* 66, 657-661.
- Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004 (Public Law 108-282, Title II). 21 USC 301 note, 7 pages.
- Food and Drug Administration (FDA), 2006. Guidance for industry: questions and answers regarding food allergens, including the food allergen labeling and Consumer Protection Act of 2004 (Edition 4); Final Guidance. <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM301394.pdf>
- Food Standards Agency, 2006. Guidance on Allergen Management and Consumer Information. <http://www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/maycontainguide.pdf>
- FoodDrink Europe (FDE), 2013. Guidance on food allergen management for food manufacturers. http://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications_documents/Guidance_on_Food_Allergen_Management.pdf
- Frenzel, A., Hust, M., Schirrmann, T., 2013. Expression of recombinant antibodies. *Front. Immunol.* 4, Article 217, 20 pages.
- Fuller, H.R., Goodwin, P.R., Morris, G.E., 2006. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the major crustacean allergen, tropomyosin, in food. *Food Agric. Immunol.* 17, 43-52.
- Gadermaier, G., Hauser, M., Egger, M., Ferrara, R., Briza, P., Santos, K.S., Zennaro, D., Girbl, T., Zuidmeer-Jongejan, L., Mari, A., *et al.*, 2011. Sensitization prevalence, antibody cross-reactivity and immunogenic peptide profile of Api g 2, the non-specific lipid transfer protein 1 of celery. *PLoS One* 6, Article ID e24150, 11 pages.
- Galeffi, P., Lombardi, A., Di, D., Latini, A., Sperandei, M., Cantale, C., Giacomini, P., 2005. Expression of single-chain antibodies in transgenic plants. *Vaccine* 23, 1823-1827.
- Gallardo, J.M., Carrera, M., Ortea, I., 2013. Proteomics in food science, en Cifuentes, A. (Ed.), *Foodomics: Advanced Mass Spectrometry in Modern Food Science and Nutrition*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, Estados Unidos, pp. 125-165.
- Garber, E.A.E., Perry, J., 2010. Detection of hazelnuts and almonds using commercial ELISA test kits. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1939-1945.
- Garet, E., Cabado, A.G., Vieites, J.M., González-Fernández, A., 2010. Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: *Palytoxin*. *Toxicon* 55, 1519-1526.
- Garrido-Fernández, S., García, B. E., Sanz, M. L., Ariz, S., Tabar, A., 2009. The role of lipid transfer proteins in the almond tree and almond fruit as contact and airborne allergens. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 19, 61-63.
- Gendel, S.M., 2012. Comparison of international food allergen labeling regulations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 279-285.
- Germini, A., Scaravelli, E., Lesignoli, F., Sforza, S., Corradini, R., Marchelli, R., 2005. Polymerase chain reaction coupled with peptide nucleic acid high-performance liquid chromatography for the sensitive detection of traces of potentially allergenic hazelnut in foodstuffs. *Eur. Food Res. Technol.* 220, 619-624.
- Geyer, C.R., McCafferty, J., Dübél, S., Bradbury, A.R.M., Sidhu, S.S., 2012. Recombinant antibodies and *in vitro* selection technologies, en Protezel, G., Ebersbach, H. (Eds.), *Antibody Methods and Protocols. Methods Mol. Biol.* Humana Press Inc., Totowa, NJ, Estados Unidos, 901, pp. 11-32.
- Godoy-Navajas, J., Aguilar Caballos, M.P., Gómez-Hens, A., 2011. Heterogeneous immunoassay for soy protein determination using Nile blue-doped silica nanoparticles as labels and front-surface long-wavelength fluorimetry. *Anal. Chim. Acta* 701, 194-199.
- Goletz, S., Christensen, P.A., Kristensen, P., Blohm, D., Tomlinson, I., Winter, G., Karsten, U., 2002. Selection of large diversities of anti-idiotypic antibody fragments by phage display. *J. Mol. Biol.* 315, 1087-1097.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., Reimhult, E., 2008. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. *Sensors* 8, 1400-1458.
- Grosse-Hovest, L., Müller, S., Minoia, R., Wolf, E., Zakhartchenko, V., Wenigerkind, H., Lassnig, C., Besenfelder, U., Müller, M., Lytton, S.D., Jung, G., Brem, G., 2004. Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6858-6863.
- Gruber, S., Schwab, H., Koefinger, P., 2015. Versatile plasmid-based expression systems for Gram-negative bacteria—General essentials exemplified with the

- bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *New Biotechnol.* **32**, 552-558.
- Guo, F., Jin, T., Howard, A., Zhang, Y. Z., 2007. Purification, crystallization and initial crystallographic characterization of Brazil nut allergen Ber e 2. *Acta Cryst.* **63**, 976-979.
- Gurkan, C., Symeonides, S.N., Ellar, D.J., 2004. High-level production in *Pichia pastoris* of an anti-p185HER-2 single-chain antibody fragment using an alternative secretion expression vector. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **39**, 115-122.
- Hackel, B.J., Huang, D., Bubolz, J.C., Wang, X.X., Shusta, E.V., 2006. Production of soluble and active transferrin receptor-targeting single-chain antibody using *Saccharomyces cerevisiae*. *Pharm. Res.* **23**, 790-797.
- Hammers, C.M., Stanley, J.R., 2014. Antibody phage display: technique and applications. *J. Invest. Dermatol.* **134**, e17.
- Han, X., Aslanian, A., Yates, J.R., 2008. Mass spectrometry for proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 483-490.
- Harju, S., Fedosyuk, H., Peterson, K.R., 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol.* **4**, 8.
- Heath, D.D., Rawson, P.D., Hilbish, T.J., 1995. PCR-based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus* spp.) genotypes on the west coast of Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **52**, 2621-2627.
- Heick, J., Fischer, M., Kerbach, S., Tamm, U., Popping, B., 2011. Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous detection of seven allergenic foods in flour and bread and comparison of the method with commercially available ELISA test kits. *J. AOAC Int.* **94**, 1060-1068.
- Herman, L., Block, J.D., Viane, R., 2003. Detection of hazelnut DNA traces in chocolate by PCR. *Int. J. Food Sci. Technol.* **38**, 633-640.
- Hirao, T., Hiramoto, M., Imai, S., Kato, H., 2006. A novel PCR method for quantification of buckwheat by using a unique internal standard material. *J. Food Prot.* **69**, 2478-2486.
- Hird, H., Lloyd, J., Goodier, R., Brown, J., Reece, P., 2003. Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 265-268.
- Hlywka, J.J., Hefle, S.L., Taylor, S.L., 2000. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of almonds in foods. *J. Food Prot.* **63**, 252-257.
- Holzhauser, T., Wangorsch, A., Vieths, S., 2000. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrixes. *Eur. Food Res. Technol.* **211**, 360-365.
- Hoogenboom, H.R., 2002. Overview of antibody phage-display technology and its applications, en O'Brien, P.M., Aitken, R. (Eds.), *Antibody Phage Display. Methods Mol. Biol.* Humana Press Inc., Totowa, NJ, Estados Unidos, **178**, pp. 1-37.
- Hoogenboom, H.R., 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1105-1116.
- Hoogenboom, H.R., de Bruine, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M., Arends, J. W., Roovers, R.C., 1998. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* **4**, 1-20.
- Hou, J., Tyo, K.E., Liu, Z., Petranovic, D., Nielsen, J., 2012. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **12**, 491-510.
- Hu, X., Xie, M., Li, L., Jiang, S., Liu, M., 2015. Expression and characterization of a bispecific antibody targeting TNF- α and ED-B containing fibronectin. *J. Biotechnol.* **31**, 722-733.
- Hua, F., Zhang, P., Zhang, F., Zhao, Y., Li, C., Sun, C., Wang, X., Yang, R., Wang, C., Yu, A., Zhou, L., 2015. Development and evaluation of an up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for rapid detection of *Francisella tularensis*. *Sci. Rep.* **5**, Article ID: 17178, 9 pages.
- Huang, X., Aguilar, Z.P., Xu, H., Lai, W., Xiong, Y., 2015. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review. *Biosens. Bioelectron.* **75**, 166-180.
- Huang, Y., Bell, M.C., Suni, I.I., 2008. Impedance biosensor for peanut protein Ara h 1. *Anal. Chem.* **80**, 9157-9161.
- Huang, Y., Suni, I.I., 2008. Degenerate Si as an electrode material for electrochemical biosensors. *J. Electrochem. Soc.* **155**, J350-J354.
- Hubalkova, Z., Rencova, E., 2011. One-step multiplex PCR method for the determination of pecan and Brazil nut allergens in food products. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 2407-2411.
- Hudson, P.J., Souriau, C., 2003. Engineered antibodies. *Nat. Med.* **9**, 129-134.
- Hunt, I., 2005. From gene to protein: A review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Expr. Purif.* **40**, 1-22.
- Hwang, W.Y., Foote, J., 2005. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* **36**, 3-10.
- ICH Expert Working Group, 2005. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1).
- Iniesto, E., Jiménez, A., Prieto, N., Cabanillas, B., Burbano, C., Pedrosa, M.M., Rodríguez, J., Muzquiz, M., Crespo, J.F., Cuadrado, C., et al., 2013. Real time PCR to detect hazelnut allergen coding sequences in processed foods. *Food Chem.* **138**, 1976-1981.
- Jackson, W.F., 2003. Food allergy, en ILSI Europe Concise Monograph Series, ILSI Press, Bruselas, Bélgica.
- Jafari, R., Holm, P., Piercecchi, M., Sundström, B.E., 2011. Construction of divalent anti-keratin 8 single-chain antibodies (sc(Fv)₂), expression in *Pichia pastoris* and their reactivity with multicellular tumor spheroids. *J. Immunol. Methods* **364**, 65-76.
- James, D., 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 Res. Int.* **37**, 395-402.
- Jenkins, D.J.A., Breiteneder, H., Mills, E.N.C., 2007. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 1399-1405.
- Jenkins, D.J.A., Hu, F.B., Tapsell, L.C., Josse, A.R., Kendall, C.W.C., 2008a. Possible benefit of nuts in type 2 diabetes. *J. Nutr.* **138**, 1752S-1756S.
- Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Marchie, A., Josse, A.R., Nguyen, T.H., Faulkner, D.A., Lapsley, K.G., Blumberg, J., 2008b. Almonds reduce biomarkers of lipid peroxidation in older hyperlipidemic subjects. *J. Nutr.* **138**, 908-913.
- Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Marchie, A., Parker, T.L., Connelly, P.W., Qian, W., Haight, J.S., Faulkner, D., Vidgen, E., Lapsley, K.G., Spiller, G.A., 2002. Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors: Blood lipids, oxidized low-density lipoproteins, lipoprotein (a), homocysteine, and pulmonary nitric oxide: A randomized, controlled, crossover trial. *Circulation* **106**, 1327-1332.
- Jiang, D., Ji, J., An, L., Sun, X., Zhang, Y., Zhang, G., Tang, L., 2013. Mast cell-based electrochemical biosensor for quantification of the major shrimp allergen

- Pen a 1 (tropomyosin). *Biosens. Bioelectron.* 50, 150-156.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Gútiérrez, L., Arbulu, S., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2014. Use of synthetic genes for cloning, production and functional expression of the bacteriocins enterocin A and bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Biotechnol.* 56, 571-583.
- Jin, T., Albillos, S.M., Guo, F., Howard, A., Fu, T.J., Kothary, M.H., Zhang, Y.Z., 2009. Crystal structure of prunin-1, a major component of the almond (*Prunus dulcis*) allergen amandin. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8643-8651.
- Joensuu, J.J., Brown, K.D., Conley, A.J., Clavijo, A., Menassa, R., Brandle, J.E., 2009. Expression and purification of an anti-Foot-and-mouth disease virus single chain variable antibody fragment in tobacco plants. *Transgenic Res.* 18, 685-696.
- Johansson, S.G., Hourihane, J.O., Bousquet, J., Brujnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M.L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., et al., EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force, 2001. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 56, 813-824.
- Johnson Jr., W.C., 1990. Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 7, 205-274.
- Johnson, P.E., Sancho, A.I., Crevel, R.W.R., Mills, E.N.C., 2011. Detection of allergens in foods, en Nollet, L.M.L., van Hengel, A.J. (Eds.), *Food Allergens: Analysis Instrumentation and Methods*. CRC Press, Boca Raton, FL, Estados Unidos, pp. 13-28.
- Jonas, D.A., Elmadafa, I., Engel, K.H., Heller, K.J., Kozianowski, G., König, A., Müller, D., Narbonne, J.F., Wackernagel, W., Kleiner, J., 2001. Safety considerations of DNA in food. *Ann. Nutr. Metab.* 45, 235-254.
- Jordan, E., Hust, M., Roth, A., Biedendieck, R., Schirrmann, T., Jahn, D., Dübel, S., 2007. Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*. *Microb. Cell Factories* 6, 2, 11 pages.
- Kamihira, M., Ono, K.I., Esaka, K., Nishijima, K.I., Kigaku, R., Komatsu, H., Yamashita, T., Kyogoku, K., Iijima, S., 2005. High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *J. Virol.* 79, 10864-10874.
- Kamil, A., Chen, C.Y.O., 2012. Health benefits of almonds beyond cholesterol reduction. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6694-6702.
- Kamiya, N., Sakabe, K., Sakabe, N., Sasaki, K., Sakakibara, M., Noguchi, H., 1983. Structural properties of Brazil nut 11 globulin, excelsin. *Agric. Biol. Chem.* 47, 2091-2098.
- Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A., Flabbee, J., Beaudouin, E., Morisset, M., Thevenin, F., 2001. Population study of food allergy in France. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 133-140.
- Kavanagh, O., Elliott, C. T., Campbell, K., 2015. Progress in the development of immunoanalytical methods incorporating recombinant antibodies to small molecular weight biotoxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 2749-2770.
- Kawabe, Y., Kamihira, M., Ono, K., Kyogoku, K., Nishijima, K., Iijima, S., 2006. Production of scFv-Fc fusion protein using genetically manipulated quails. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 297-303.
- Kay, B.K., Thai, S., Volgina, V.V., 2008. High-throughput biotinylation of proteins, en Doyle, S.A. (Eds.), *High Throughput Protein Expression and Purification, Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, Estados Unidos, pp. 185-198.
- Kelly, S.M., Jess, T.J., Price, N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* 1751, 119-139.
- Kelly, S.M., Price, N.C., 2000. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1, 349-384.
- Kendall, C.W.C., Josse, A.R., Esfahani, A., Jenkins, D.J.A., 2010. Nuts, metabolic syndrome and diabetes. *Br. J. Nutr.* 104, 465-473.
- Kerbach, S., Alldrick, A.J., Crevel, R.W.R., Dömötör, L., DunnGalvin, A., Mills, E.N.C., Pfaff, S., Poms, R.E., Popping, B., Tömösközi, S., 2009. Managing food allergens in the food supply chain - viewed from different stakeholder perspectives. *Qual. Assur. Saf. Crops Foods* 1, 50-60.
- Kingston, B., Brent, R., 2001. Protein Expression, en Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. Media, PA, Estados Unidos, pp 16.0.1-16.0.5.
- Kipriyanov, S.M., Breitling, F., Little, M., Dübel, S., 1995. Single-chain antibody streptavidin fusions: tetrameric bifunctional scFv-complexes with biotin binding activity and enhanced affinity to antigen. *Hum. Antibodies Hybridomas* 6, 93-101.
- Kirsch, S., Fourdrilis, S., Dobson, R., Scippo, M. L., Maghuin-Rogister, G., De Pauw, E., 2009. Quantitative methods for food allergens: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 57-67.
- Kobayashi, N., Oyama, H., 2011. Antibody engineering toward high-sensitivity high-throughput immunosensing of small molecules. *Analyst.* 136, 642-651.
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Köppel, R., Dvorak, V., Zimmerli, F., Breitenmoser, A., Eugster, A., Waiblinger, H.U., 2010. Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 367-374.
- Köppel, R., Velsen-Zimmerli, F. van, Bucher, T., 2012. Two quantitative hexaplex real-time PCR systems for the detection and quantification of DNA from twelve allergens in food. *Eur. Food Res. Technol.* 235, 843-852.
- Koppelman, S.J., Nieuwenhuizen, W.F., Gaspari, M., Knippels, L.M.J., Penninks, A.H., Knol, E.F., Hefle, S.L., De, J., 2005. Reversible denaturation of Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) and implication of structural destabilization on digestion by pepsin. *J. Agric. Food Chem.* 53, 123-131.
- Kretzschmar, T., Aoustin, L., Zingel, O., Marangi, M., Vonach, B., Towbin, H., Geiser, M., 1996. High-level expression in insect cells and purification of secreted monomeric single-chain Fv antibodies. *J. Immunol. Methods* 195, 93-101.
- Kristensen, P., Winter, G., 1998. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold. Des.* 3, 321-328.
- Krüger, C., Hu, Y., Pan, Q., Marcotte, H., Hultberg, A., Delwar, D., van Dalen, P.J., Pouwels, P.H., Leer, R.J., Kelly, C.G., van Dollenweerd, C., Ma, J.K., Hammarström, L., 2002. *In situ* delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat. Biotechnol.* 20, 702-706.
- Kumada, Y., 2014. Site-specific immobilization of recombinant antibody fragments through material-binding peptides for the sensitive detection of antigens in enzyme immunoassays. *Biochim. Biophys. Acta* 1844, 1960-1969.

- Kumar, S., Dilbaghi, N., Barnela, M., Bhanjana, G., Kumar, R., 2012a. Biosensors as novel platforms for detection of food pathogens and allergens. *BioNanoScience* 2, 196-217.
- Kumar, S., Verma, A.K., Das, M., Dwivedi, P.D., 2012b. Allergenic diversity among plant and animal food proteins. *Food Rev. Int.* 28, 277-298.
- Kurasawa, J.H., Shestopal, S.A., Jha, N.K., Ovanesov, M.V., Lee, T.K., Sarafanov, A.G., 2013. Insect cell-based expression and characterization of a single-chain variable antibody fragment directed against blood coagulation factor VIII. *Protein Expr. Purif.* 88, 201-206.
- Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., Pelletier, S. L., 1992. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins, en Harding, S. E., Rowe, A. J., Horton, J. C. (Eds.), *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*. Cambridge, Reino Unido. Royal Soc. Chem. pp 90-125.
- Lauer, B., Ottleben, I., Jacobsen, H.J., Reinard, T., 2005. Production of a single-chain variable fragment antibody against fumonisin B1. *J. Agric. Food Chem.* 53, 899-904.
- Lavilla, M., Marzo, I., De, L., Perez, M.D., Calvo, M., Sánchez, L., 2010. Detection of *Clostridium tyrobutyricum* spores using polyclonal antibodies and flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* 108, 488-498.
- Lee, C.M., Iorno, N., Sierro, F., Christ, D., 2007. Selection of human antibody fragments by phage display. *Nat. Protoc.* 2, 3001-3008.
- Lee, P.W., Taylor, S.L., 2011. Fish, crustaceans, and mollusks, en Nollet, L.M., van Hengel, A.J. (Eds.), *Food Allergens: Analysis Instrumentation and Methods*. CRC Press, Boca Raton, FL, Estados Unidos, pp. 177-205.
- Li, S.L., Liang, S.J., Guo, N., Wu, A.M., Fujita-Yamaguchi, Y., 2000. Single-chain antibodies against human insulin-like growth factor I receptor: expression, purification, and effect on tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* 49, 243-252.
- Li, Y., Sousa, R., 2012. Expression and purification of *E. coli* BirA biotin ligase for in vitro biotinylation. *Protein Expr. Purif.* 82, 162-167.
- Liang, H., Li, X., Chen, B., Wang, B., Zhao, Y., Zhuang, Y., Shen, H., Zhang, Z., Dai, J., 2015. A collagen-binding EGFR single-chain Fv antibody fragment for the targeted cancer therapy. *J. Controlled Release* 209, 101-109.
- Lieberman, J.A., Sicherer, S.H., 2010. The diagnosis of food allergy. *Am. J. Rhinol. Allergy* 24, 439-443.
- Linacero, R., Ballesteros, I., Sanchiz, A., Prieto, N., Iniesto, E., Martinez, Y., Pedrosa, M.M., Muzquiz, M., Cabanillas, B., Rovira, M., Burbano, C., Cuadrado, C., 2016. Detection by real time PCR of walnut allergen coding sequences in processed foods. *Food Chem.* 202, 334-340.
- Lockley, A.K., Bardsley, R.G., 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 67-77.
- Lok, T., Lau, T., 2014. Molecular testing for food allergens, en G. Siragakis, D. Kizis (Eds.), *Food allergen testing: Molecular, immunochemical and chromatographic techniques*, Wiley-Blackwell, Chichester, Reino Unido, pp. 29-48.
- López-Calleja, I.M., de la Cruz, S., González, I., García, T., Martín, R., 2015a. Development of real-time PCR assays to detect cashew (*Anacardium occidentale*) and macadamia (*Macadamia integrifolia*) residues in market analysis of processed food products. *LWT - Food Sci. Technol.* 62, 233-241.
- López-Calleja, I.M., de la Cruz, S., González, I., García, T., Martín, R., 2015b. Market analysis of food products for detection of allergenic walnut (*Juglans regia*) and pecan (*Carya illinoensis*) by real-time PCR. *Food Chem.* 177, 111-119.
- López-Calleja, I.M., de la Cruz, S., González, I., García, T., Martín, R., 2014a. Survey of undeclared allergenic pistachio (*Pistacia vera*) in commercial foods by hydrolysis probe real-time PCR. *Food Control* 39, 49-55.
- López-Calleja, I.M., de la Cruz, S., Pegels, N., González, I., Martín, R., García, T., 2014b. Sensitive and specific detection of almond (*Prunus dulcis*) in commercial food products by real-time PCR. *LWT - Food Sci. Technol.* 56, 31-39.
- López-Calleja, I.M., de la Cruz, S., Pegels, N., González, I., García, T., Martín, R., 2013a. Development of a real time PCR assay for detection of allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. *Food Control* 30, 480-490.
- López-Calleja, I.M., de la Cruz, S., Pegels, N., González, I., García, T., Martín, R., 2013b. High resolution TaqMan real-time PCR approach to detect hazelnut DNA encoding for ITS rDNA in foods. *Food Chem.* 141, 1872-1880.
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., Martín, R., 2007. Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control* 18, 1466-1473.
- Lowe, D., Dudgeon, K., Rouet, R., Schofield, P., Jermutus, L., Christ, D., 2011. Aggregation, stability, and formulation of human antibody therapeutics. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 84, 41-61.
- Lutter, P., Parisod, V., Weymuth, H., 2011. Development and validation of a method for the quantification of milk proteins in food products based on liquid chromatography with mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* 94, 1043-1059.
- Ma, J.K.C., Drake, P.M.W., Christou, P., 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* 4, 794-805.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249-270.
- Mackay, J., Landt, O., 2007. Real-time PCR fluorescent chemistries, en Hilario, E., Mackay, J. (Eds.), *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes. Methods Mol. Biol.* Humana Press Inc., Totowa, NJ, Estados Unidos, 353, pp. 237-261.
- Madsen, C. B., Crevel, R., Chan, C., Dubois, A.E.J., DunnGalvin, A., Flokstra de Blok, B.M.J., Gowland, M.H., Hattersley, S., O'B Hourihane, J., Nørhede, P., Pfaff, S., Rowe, G., Schnadt, S., Vlieg-Boerstra, B. J., 2010. Food allergy: stakeholder perspectives on acceptable risk. *Regul. Toxicol. Pharm.* 57, 256-265.
- Madsen, C.B., Hattersley, S., Buck, J., Gendel, S.M., Mouben, G.F., Hourihane, J.O., Mackie, A., Mills, E.N.C., Nørhede, P., Taylor, S.L., et al., 2009. Approaches to risk assessment in food allergy: report from a workshop developing a framework for assessing the risk from allergenic foods. *Food Chem. Toxicol.* 47, 480-489.
- Maeng, B.H., Choi, J., Sa, Y.S., Shin, J.H., Kim, Y.H., 2012. Functional expression of recombinant anti-BNP scFv in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and application as a recognition molecule in electrochemical sensors. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1027-1034.
- Mafra, I., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Oliveira, M.B.P.P., 2008. Food authentication by PCR-based methods. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 649-665.
- Makvandi-Nejad, S., McLean, M.D., Hiram, T., Almquist, K.C., MacKenzie, C.R., Hall, J.C., 2005. Transgenic tobacco plants expressing a dimeric single-chain variable fragment (scFv) antibody against *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B. *Transgenic Res.* 14, 785-792.
- Malpiedi, L.P., Díaz, C.A., Nerli, B.B., Pessoa Jr., A., 2013. Single-chain antibody fragments: Purification methodologies. *Process Biochem.* 48, 1242-1251.

- Mandalari, G., Nueno-Palop, C., Bisignano, G., Wickham, M.S.J., Narbad, A., 2008. Potential prebiotic properties of almond (*Amygdalus communis* L.) seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4264-4270.
- Mandić, A., Ilić, N., 2011. Food allergens, en Švarc-Gajić, J. (Ed.) *Nutritional Insights and Food Safety*. Nova Biomedical Press, NY, Estados Unidos, pp. 359-367.
- Marcotte, H., Köll-Klais, P., Hultberg, A., Zhao, Y., Gmür, R., Mändar, R., Mikelsaar, M., Hammarström, L., 2006. Expression of single-chain antibody against RgpA protease of *Porphyromonas gingivalis* in *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 256-263.
- Marion, D., Douliez, J. P., Gautier, M. F., Elmorjani, K., 2003. Plant lipid transfer proteins: relationships between allergenicity and structural, biological and technological properties, en Mills, E. N. C., Shewry, P. R., (Eds.), *Plant Food Allergens*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Reino Unido, pp. 57-69.
- Martin, S.R., Schilstra, M.J., 2008. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. *Methods Cell Biol.* **84**, 263-293
- Martin-Fernández, B., de los Santos-Álvarez, N., Martín-Clemente, J.P., Lobo-Castañón, M.J., López-Ruiz, B., 2016. Challenging genosensors in food samples: The case of gluten determination in highly processed samples. *Talanta* **146**, 490-495.
- Masilamani, M., Commins, S., Shreffler, W., 2012. Determinants of food allergy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **32**, 11-33.
- Mattarozzi, M., Bignardi, C., Elviri, L., Careri, M., 2012. Rapid shotgun proteomic liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry-based method for the lupin (*Lupinus albus* L.) multi-allergen determination in foods. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 5841-5846.
- Maynard, J., Georgiou, G., 2000. Antibody engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2**, 339-376.
- McLellan, T., 1982. Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH. *Anal. Biochem.* **126**, 94-99.
- McWilliam, V., Koplin, J., Lodge, C., Tang, M., Dharmage, S., Allen, K., 2015. The prevalence of tree nut allergy: a systematic review. *Curr. Allergy Asthma Rep.* Article ID 15, 13 pages.
- Meissner, F., Mann, M., 2014. Quantitative shotgun proteomics: considerations for a high-quality workflow in immunology. *Nat. Immunol.* **15**, 112-117.
- Menendez, A., Scott, J.K., 2005. The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Anal. Biochem.* **336**, 145-157.
- Mergulhão, F.J.M., Summers, D.K., Monteiro, G.A., 2005. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Adv.* **23**, 177-202.
- Mi, J., Yan, J., Guo, Z., Zhao, M., Chang, W., 2005. Isolation and characterization of an anti-recombinant erythropoietin single-chain antibody fragment using a phage display antibody library. *Anal. Bioanal. Chem.* **383**, 218-223.
- Miller, K.D., Weaver-Feldhaus, J., Gray, S.A., Siegel, R.W., Feldhaus, M.J., 2005. Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **42**, 255-267.
- Mills, E.N.C., Jenkins, J.A., Bannon, G.A., 2003. Plant seed globulin allergens, en Mills, E.N.C., Shewry, P.R. (Eds.), *Plant Food Allergens*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Reino Unido, pp. 141-157.
- Monaci, L., Losito, I., Palmisano, F., Visconti, A., 2010. Identification of allergenic milk proteins markers in fined white wines by capillary liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 4300-4305.
- Monaci, L., Losito, I., Palmisano, F., Visconti, A., 2011. Reliable detection of milk allergens in food using a high-resolution, stand-alone mass spectrometer. *J. AOAC Int.* **94**, 1034-1042.
- Monaci, L., Visconti, A., 2009. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *TrAC Trends Anal. Chem.* **28**, 581-591.
- Monaci, L., Visconti, A., 2010. Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* **21**, 272-283.
- Monsalve, R.I., Villalba, M., Rico, M., Shewry, P.R., Rodríguez, R., 2003. The 2S Albumin Proteins, en Mills, E.N.C., Shewry, P.R. (Eds.), *Plant Food Allergens*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Reino Unido, pp. 42-56.
- Moore, D., Dowhan, D., 2002. Manipulation of DNA, en Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, Estados Unidos, pp. 2.1.1-2.1.10.
- Moreno, F.J., Clemente, A., 2008. 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens? *Open Biochem. J.* **2**, 16-28.
- Moreno, F.J., Jenkins, J.A., Mellon, F.A., Rigby, N.M., Robertson, J.A., Wellner, N., Mills, E.N.C., 2004. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *Biochim. Biophys. Acta*, **1698**, 175-186.
- Mustorp, S., Dromtorp, S., Holck, A., 2011. Multiplex, quantitative ligation-dependent probe amplification for determination of allergens in food. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5231-5239.
- Muzard, J., Adi-Bessalem, S., Juste, M., Laraba-Djebari, F., Aubrey, N., Billiald, P., 2009. Grafting of protein L-binding activity onto recombinant antibody fragments. *Anal. Biochem.* **388**, 331-338.
- Narsaiah, K., Jha, S.N., Bhardwaj, R., Sharma, R., Kumar, R., 2012. Optical biosensors for food quality and safety assurance-a review. *J. Food Sci. Technol.* **49**, 383-406.
- Nguyen, T.M.H., Nguyen, T.V.A., Le, T.H., La, T.H., Nguyen, T.T.B., Le, Q.H., 2015. A case study on expression of single-chain variable fragment of anti-HER2 antibody by using recombinant baculovirus in silkworms. Presented at the *IFMBE Proceedings*, pp. 215-218.
- Nielsen, U.B., Kirpotin, D.B., Pickering, E.M., Hong, K., Park, J.W., Refaat Shalaby, M., Shao, Y., Benz, C.C., Marks, J.D., 2002. Therapeutic efficacy of anti-ErbB2 immunoliposomes targeted by a phage antibody selected for cellular endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1591**, 109-118.
- Nieto Feliner, G., Rosselló, J.A., 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Mol. Phylogenet. Evol.* **44**, 911-919.
- Niggemann, B., Beyer, K., 2007. Pitfalls in double-blind, placebo-controlled oral food challenges. *Allergy* **62**, 729-732.
- Nolan, T., Hands, R.E., Ogunkolade, W., Bustin, S.A., 2006. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal. Biochem.* **351**, 308-310.
- Nordén, K., Agemark, M., Danielson, J.Å., Alexandersson, E., Kjellbom, P., Johanson, U., 2011. Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol.* **11**, 47.
- Obembe, O.O., Popoola, J.O., Leelavathi, S., Reddy, S.V., 2011. Advances in plant molecular farming. *Biotechnol. Adv.* **29**, 210-222.

- Ono, K.I., Kamihira, M., Kuga, Y., Matsumoto, H., Hotta, A., Itoh, T., Nishijima, K.I., Nakamura, N., Matsuda, H., Iijima, S., 2003. Production of anti-prion scFv-Fc fusion proteins by recombinant animal cells. *J. Biosci. Bioeng.* 95, 231-238.
- Ornstein, L., 1964. Disc electrophoresis-I background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321-349.
- Pafundo, S., Gulli, M., Marmiroli, N., 2009. SYBR[®]GreenER[™] Real-Time PCR to detect almond in traces in processed food. *Food Chem.* 116, 811-815.
- Pafundo, S., Gulli, M., Marmiroli, N., 2010. Multiplex real-time PCR using SYBR[®] GreenER[™] for the detection of DNA allergens in food. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1831-1839.
- Pande, J., Szewczyk, M.M., Grover, A.K., 2010. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol. Adv.* 28, 849-858.
- Pang, X., Song, J., Zhu, Y., Xu, H., Huang, L., Chen, S., 2011. Applying plant DNA barcodes for *Rosaceae* species identification. *Cladistics* 27, 165-170.
- Parmley, S.F., Smith, G.P., 1988. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73, 305-318.
- Paschke, A., 2009. Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 959-962.
- Pedreschi, R., Nørgaard, J., Maquet, A., 2012. Current challenges in detecting food allergens by shotgun and targeted proteomic approaches: a case study on traces of peanut allergens in baked cookies. *Nutrients* 4, 132-150.
- Pegels, N., González, I., López-Calleja, I., García, T., Martín, R., 2013. Detection of fish-derived ingredients in animal feeds by a TaqMan real-time PCR assay. *Food Anal. Methods* 5, 784-794.
- Pegels, N., González, I., Fernández, S., García, T., Martín, R., 2012a. Sensitive detection of porcine DNA in processed animal proteins using a TaqMan real-time PCR assay. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 29, 1402-1412.
- Pegels, N., González, I., López-Calleja, I., Fernández, S., García, T., Martín, R., 2012b. Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. *Poult. Sci.* 91, 1709-1719.
- Pegels, N., Gonzalez, I., Garcia, T., Martin, R., 2011a. Detection of banned ruminant-derived material in industrial feedstuffs by TaqMan real-time PCR assay. *J. Food Prot.* 74, 1300-1308.
- Pegels, N., González, I., Martín, I., Rojas, M., García, T., Martín, R., 2011b. Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control* 22, 1189-1196.
- Perez, J. S., 2013. Guidance on food allergen management for food manufacturers. http://www.fooddrinkurope.eu/uploads/press-releases_documents/temp_file_FINAL_Allergen_A4_web1.pdf (consultado en septiembre 2014).
- Pham, V.D., Hoang, H., Phan, T.H., Conrad, U., Chu, H.H., 2012. Production of antibody labeled gold nanoparticles for influenza virus H5N1 diagnosis kit development. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 3, Article ID 045017, 7 pages.
- Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Ashraf-Khorassani, M., 2005. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9436-9445.
- Piknová, L., Pangallo, D., Kuchta, T., 2008. A novel real-time polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of hazelnuts in food. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 1155-1158.
- Piknová, L., Kuchta, T., 2007. Detection of cashew nuts in food by real-time polymerase chain reaction. *J. Food Nutr. Res.* 46, 101-104.
- Platteau, C., De, L., De, M., Taverniers, I., 2011. Detection of allergenic ingredients using real-time PCR: A case study on hazelnut (*Corylus avellana*) and soy (*Glycine max*). *J. Agric. Food Chem.* 59, 10803-10814.
- Pollet, J., Delpont, F., Janssen, K.P.F., Tran, D.T., Wouters, J., Verbiest, T., Lammertyn, J., 2011. Fast and accurate peanut allergen detection with nanobead enhanced optical fiber SPR biosensor. *Talanta* 83, 1436-1441.
- Poms, R.E., Anklam, E., Kuhn, M., 2004a. Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *J. AOAC Int.* 87, 1391-1397.
- Poms, R.E., Klein, C.L., Anklam, E., 2004b. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* 21, 1-31.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., Sohler, D., 2011. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol.* 28, 848-861.
- Predonzani, A., Arnoldi, F., López-Requena, A., Burrone, O.R., 2008. *In vivo* site-specific biotinylation of proteins within the secretory pathway using a single vector system. *BMC Biotechnol.* 8, 41.
- Prescott, S., Allen, K.J., 2011. Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatr. Allergy Immunol.* 22, 155-160.
- Prieto, N., Iniesto, E., Burbano, C., Cabanillas, B., Pedrosa, M.M., Rovira, M., Rodríguez, J., Muzquiz, M., Crespo, J.F., Cuadrado, C., *et al.*, 2014. Detection of almond allergen coding sequences in processed foods by real time PCR. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5617-5624.
- Rahman, Q.K., Berzins, K., López, M.C., Fernández, C., 2003. Breaking the non-responsiveness of C57BL/6 mice to the malarial antigen EB200 - the role of carrier and adjuvant molecules. *Scand. J. Immunol.* 58, 395-403.
- Rakonjac, J., Bennett, N.J., Spagnuolo, J., Gagic, D., Russel, M., 2011. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr. Issues Mol. Biol.* 13, 51-76.
- Ramírez, N., Ayala, M., Lorenzo, D., Palenzuela, D., Herrera, L., Doreste, V., Pérez, M., Gavilond, J.V., Oramas, P., 2002. Expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for the hepatitis B surface antigen in transgenic tobacco plants. *Transgenic Res.* 11, 61-64.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, del Ministerio de la Presidencia, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *BOE* 34, 11370-11421.
- Real Decreto 126/2015, de 27 de febrero, por el que se aprueba la norma general relativa a la información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por los titulares del comercio al por menor. *BOE* 54, 20059-20066.
- Reavy, B., Ziegler, A., Diplexcito, J., Macintosh, S.M., Torrance, L., Mayo, M., 2000. Expression of functional recombinant antibody molecules in insect cell expression systems. *Protein Expr. Purif.* 18, 221-228.
- Rebe Raz, S., Liu, H., Norde, W., Bremer, M.G.E.G., 2010. Food allergens profiling with an imaging surface plasmon resonance-based biosensor. *Anal. Chem.* 82, 8485-8491.
- Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law,

- establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Off. J. Eur. Communities L31*, 1-24.
- Regulation (EU) No 1169/2011/ of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/ EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004. *Off. J. Eur. Union L304*, 18-63.
- Regulations Amending the Food and Drug Regulations (1220-Enhanced for food allergen and gluten sources and added sulphites), 2011. SOR/2011-28, February 4. *Canada Gazette Part II*, 145, pp. 324-330.
- Renaut, L., Monnet, C., Dubreuil, O., Zaki, O., Crozet, F., Bouayadi, K., Kharat, H., Mondon, P., 2012. Affinity maturation of antibodies: Optimized methods to generate high-quality scFv libraries and isolate IgG candidates by high-throughput screening, en Chames, P. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, Estados Unidos, 907, pp. 451-461.
- Renčová, E., Piskatá, Z., Kostelníková, D., Tremlová, B., 2014. Simultaneous detection of peanut and hazelnut allergens in food matrices using multiplex PCR method. *Acta Vet. Brno* 83, S77-S83.
- Rice, J.A., Lupo, A.J., 2014. Immunodiagnosics in food allergen testing, en Siragakis, G., Kizis, D. (Eds.), *Food Allergen Testing*. John Wiley & Sons, Ltd, Media, PA, Estados Unidos, pp. 13-28.
- Ridder, R., Schmitz, R., Legay, F., Gram, H., 1995. Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* 13, 255-260.
- Rippmann, J.F., Klein, M., Hoischen, C., Brocks, B., Rettig, W.J., Gumpert, J., Pfizenmaier, K., Mattes, R., Moosmayer, D., 1998. Prokaryotic expression of single-chain variable-fragment (scFv) antibodies: secretion in L-form cells of *Proteus mirabilis* leads to active product and overcomes the limitations of periplasmic expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4862-4869
- Robbins, K.S., Shin, E.-C., Shewfelt, R.L., Eitenmiller, R.R., Pegg, R.B., 2011. Update on the healthful lipid constituents of commercially important tree nuts. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12083-12092.
- Robert, M.C., 2009. Analytical choices, en Coutts, J., Fielder, R. (Eds.), *Management of Food Allergens*. Wiley-Blackwell, Chichester, Reino Unido, pp. 166-183.
- Röder, M., Filbert, H., Holzhauser, T., 2010. A novel, sensitive and specific real-time PCR for the detection of traces of allergenic Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in processed foods. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 2279-2288.
- Röder, M., Vieths, S., Holzhauser, T., 2011. Sensitive and specific detection of potentially allergenic almond (*Prunus dulcis*) in complex food matrices by Taqman® real-time polymerase chain reaction in comparison to commercially available protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal. Chim. Acta* 685, 74-83.
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., 2013. Introduction to the Real-time PCR, en Rodríguez-Lázaro, D. (Ed.), *Real-time PCR in Food Science: Current Technology and Applications*. Caister Academic Press, Poole, Reino Unido, pp. 3-19.
- Rogers, S.O., Bendich, A.J., 1987. Heritability and variability in ribosomal RNA genes in *Vicia faba*. *Genetics*, 117, 285-295.
- Rona, R.J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S.T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., et al., 2007. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 638-646.
- Ros, E., 2010. Health benefits of nut consumption. *Nutrients* 2, 652-682.
- Ros, E., Tapsell, L.C., Sabaté, J., 2010. Nuts and berries for heart health. *Curr. Atheroscler. Rep.* 12, 397-406.
- Rouet, R., Lowe, D., Dudgeon, K., Roome, B., Schofield, P., Langley, D., Andrews, J., Whitfeld, P., Jermutus, L., Christ, D., 2012. Expression of high-affinity human antibody fragments in bacteria. *Nat. Protoc.* 7, 364-373.
- Roux, K.H., Teuber, S.S., Robotham, J.M., Sathe, S.K., 2001. Detection and stability of the major almond allergen in foods. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2131-2136.
- Roux, K.H., Teuber, S.S., Sathe, S.K., 2003. Tree nut allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 131, 234-244.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The principles of humane experimental techniques*. Johns Hopkins Bloom. Sch. Public Health, Baltimore, MD, Estados Unidos.
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T.P., Maguire, A.R., O'Brien, N.M., 2006. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 57, 219-228.
- Sakamoto, S., Pongkitwitoon, B., Nakamura, S., Maenaka, K., Tanaka, H., Morimoto, S., 2010a. Efficient silkworm expression of single-chain variable fragment antibody against ginsenoside Re using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus bacmid DNA system and its application in enzyme-linked immunosorbent assay for quality control of total ginsenosides. *J. Biochem.* 148, 335-340.
- Sakamoto, S., Taura, F., Tsuchihashi, R., Putalun, W., Kinjo, J., Tanaka, H., Morimoto, S., 2010b. Expression, purification, and characterization of anti-plumbagin single-chain variable fragment antibody in sf9 insect cell. *Hybridoma* 29, 481-488.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2006. Working with bacteriophage M13 Vectors, en Sambrook, J., Russell, D. W. (Eds.), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, Estados Unidos, pp. 3.1-3.16.
- Sampson, H.A., 2004. Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 805-819.
- Sampson, H.A., 2005. Food allergy - Accurately identifying clinical reactivity. *Allergy. Suppl.* 60, 19-24.
- Sampson, H.A., Mendelson, L., Rosen, J.P., 1992. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N. Engl. J. Med.* 327, 380-384.
- Sánchez-Paniagua, M., Frutos, G., Lobo, M.J., López-Ruiz, B., 2014. Development of a genosensor for peanut allergen Ara h 2 detection and its optimization by surface response methodology. *Biosens. Bioelectron.* 62, 350-356.
- Sastre, J., 2010. Molecular diagnosis in allergy. *Clin. Exp. Allergy* 40, 1442-1460.
- Sathe, S.K., Sharma, G.M., 2009. Effects of food processing on food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 970-978.
- Sathe, S.K., Teuber, S.S., Roux, K.H., 2005. Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnol. Adv.* 23, 423-429.
- Sathe, S.K., Wolf, W.J., Roux, K.H., Teuber, S.S., Venkatachalam, M., Sze-Tao, K.W.C., 2002. Biochemical characterization of amandin, the major storage protein in almond (*Prunus dulcis* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50, 4333-4341.
- Sato, M., Kojima, K., Sakuma, C., Murakami, M., Aratani, E., Takenouchi, T., Tamada, Y., Kitani, H., 2012. Production of scFv-conjugated affinity silk powder by

- transgenic silkworm technology. *PLoS ONE* 7, Article ID e34632, 6 pages.
- Scaravelli, E., Brohée, M., Marchelli, R., van Hengel, A. J., 2009. The effect of heat treatment on the detection of peanut allergens as determined by ELISA and real-time PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 127-137.
- Scaravelli, E., Brohée, M., Marchelli, R., Van, H., 2008. Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 857-869.
- Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H.J., Plückthun, A., 2001. *In vitro* generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Styloynchia lemnae* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8572-8577.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P., 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50, 1-17.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6241-6246.
- Scholle, M.D., Kriplani, U., Pabon, A., Sishtla, K., Glucksman, M.J., Kay, B.K., 2006. Mapping protease substrates by using a biotinylated phage substrate library. *Chem. Bio. Chem.* 7, 834-838.
- Schöringhumer, K., S., Redl, G., Cichna-Markl, M., 2009. Development and validation of a duplex real-time PCR method to simultaneously detect potentially allergenic sesame and hazelnut in food. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2126-2134.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucl. Acids Res.* 30, Article ID e57, 13 pages.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., John, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014-1026.
- Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A., Baumgartner, S., 2009. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 69-81.
- Schuck, P., 2000. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* 78, 1606-1619.
- Schütte, M., Thullier, P., Pelat, T., Wezler, X., Rosenstock, P., Hinz, D., Kirsch, M.I., Hasenberg, M., Frank, R., Schirrmann, T., Gunzer, M., Hust, M., Dübel, S., 2009. Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLOS ONE* 4, Article ID e6625, 16 pages.
- Scott, N., Reynolds, C.B., Wright, M.J., Qazi, O., Fairweather, N., Deonarain, M.P., 2008. Single-chain Fv phage display propensity exhibits strong positive correlation with overall expression levels. *BMC Biotechnol.* 8, 1-10.
- Sergeeva, A., Kolonin, M.G., Molldrem, J.J., Pasqualini, R., Arap, W., 2006. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1622-1654.
- Sharma, G. M., Mundoma, C., Seavy, M., Roux, K. H., Sathe, S. K., 2010. Purification and biochemical characterization of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* L.) seed storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5714-5723.
- Sharma, G.M., Roux, K.H., Sathe, S.K., 2009. A sensitive and robust competitive enzyme-linked immunosorbent assay for Brazil nut (*Bertholletia excelsa* L.) detection. *J. Agric. Food Chem.* 57, 769-776.
- Shewry, P.R., Jenkins, J.A., Beaudoin, F., Mills, E.N.C., 2003. The classification, functions and evolutionary relationships of plant proteins in relation to food allergies, en Mills, E.N.C., Shewry, P.R. (Eds.), *Plant Food Allergens*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Reino Unido, pp. 24-41.
- Shi, X., Karkut, T., Chamankhah, M., Alting-Mees, M., Hemmingsen, S.M., Hegedus, D., 2003. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 28, 321-330.
- Shiroza, T., Shinozaki-Kuwahara, N., Hayakawa, M., Shibata, Y., Hashizume, T., Fukushima, K., Udaka, S., Abiko, Y., 2003. Production of a single-chain variable fragment capable of inhibiting the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase in *Bacillus brevis*: construction of a chimeric shuttle plasmid secreting its gene product. *Biochim. Biophys. Acta* 1626, 57-64.
- Sicherer, S.H., Muñoz-Furlong, A., Godbold, J.H., Sampson, H.A., 2010. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 1322-1326.
- Sicherer, S.H., Sampson, H.A., 2010. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S116-125.
- Sicherer, S.H., Sampson, H.A., 2006. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117, S470-S475.
- Sidhu, S.S., 2001. Engineering M13 for phage display. *Biomol. Eng.* 18, 57-63.
- Singh, R., Sharma, P.P., Baltus, R.E., Suni, I.I., 2010. Nanopore immunosensor for peanut protein Ara h 1. *Sens. Actuators B Chem.* 145, 98-103.
- Sletta, H., Nedal, A., Aune, T.E.V., Hellebust, H., Hakvåg, S., Aune, R., Ellingsen, T.E., Valla, S., Brautaset, T., 2004. Broad-host-range plasmid pJB658 can be used for industrial-level production of a secreted host-toxic single-chain antibody fragment in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7033-7039.
- Smith, G.P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Smith, G.P., Petrenko, V.A., 1997. Phage display. *Chem. Rev.* 97, 391-410.
- Smith, K.A., Nelson, P.N., Warren, P., Astley, S.J., Murray, P.G., Greenman, J., 2004. Demystified... recombinant antibodies. *J. Clin. Pathol.* 57, 912-917.
- Sommaruga, S., Lombardi, A., Salvadè, A., Mazzucchelli, S., Corsi, F., Galeffi, P., Tortora, P., Prosperi, D., 2011. Highly efficient production of anti-HER2 scFv antibody variant for targeting breast cancer cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 613-621.
- Sørensen, H.P., Mortensen, K.K., 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 115, 113-128.
- Sorokulova, I.B., Olsen, E.V., Chen, I.H., Fiebor, B., Barbaree, J.M., Vodanoy, V.J., Chin, B.A., Petrenko, V.A., 2005. Landscape phage probes for *Salmonella typhimurium*. *J. Microbiol. Methods* 63, 55-72.
- Sotiriadis, A., Keshavarz, T., Keshavarz-Moore, E., 2001. Factors affecting the production of a single-chain antibody fragment by *Aspergillus awamori* in a stirred tank reactor. *Biotechnol. Prog.* 17, 618-623.
- Srinivas, G.R., Chichester, C.O., Barrach, H.J., Pillai, V., Matoney, A.L., 1994. Production of type II collagen specific monoclonal antibodies. *Immunol. Invest.* 23, 85-98.
- Ståhl, S., Kronqvist, N., Jonsson, A., Löfblom, J., 2013. Affinity proteins and their generation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 25-38.

- Steele, L., Mayer, L., Berin, M.C., 2012. Mucosal immunology of tolerance and allergy in the gastrointestinal tract. *Immunol. Res.* **54**, 75-82.
- Stephan, O., Vieths, S., 2004. Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3754-3760.
- Stöger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Keen, D., Perrin, Y., Christou, P., Fischer, R., 2000. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol. Biol.* **42**, 583-590.
- Su, M., Venkatachalam, M., Liu, C., Zhang, Y., Roux, K.H., Sathe, S.K., 2013. A murine monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for almond (*Prunus dulcis* L.) detection. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 10823-10833.
- Suarez, M.B., Walsh, K., Boonham, N., O'Neill, T., Pearson, S., Barker, I., 2005. Development of real-time PCR (TaqMan) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 890-899.
- Sue, M.J., Yeap, S.K., Omar, A.R., Tan, S.W., Sue, M.J., Yeap, S.K., Omar, A.R., Tan, S.W., 2014. Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis, Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis. *BioMed Res. Int.* **2014**, Article ID 653014, 6 pages.
- Sun, S.S.M., Leung, F. W., Tomic, J. C., 1987. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) proteins: fractionation, composition, and identification of a sulfur-rich protein. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 232-235.
- Sun, X., Guan, L., Shan, X., Zhang, Y., Li, Z., 2012. Electrochemical detection of peanut allergen Ara h 1 using a sensitive DNA biosensor based on stem-loop probe. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 10979-10984.
- Sunilkumar, G., Waghela, S.D., Campbell, L.M., Rathore, K.S., 2009. Expression of anti-K99 scFv in transgenic rice tissues and its functional characterization. *Transgenic Res.* **18**, 347-360.
- Svedberg, T., Sjögren, B., 1930. The molecular weights of amandin and of excelsin. *J. Am. Chem. Soc.* **52**, 279-287.
- Swartz, J.R., 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 195-201.
- Swennen, D., Paul, M.-F., Vernis, L., Beckerich, J.-M., Fournier, A., Gaillardin, C., 2002. Secretion of active anti-Ras single-chain Fv antibody by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*. *Microbiol. Read. Engl.* **148**, 41-50.
- Szeto, K., Latulippe, D.R., Ozer, A., Pagano, J.M., White, B.S., Shalloway, D., Lis, J.T., 2013. RAPID-SELEX for RNA Aptamers. *PLoS One* **8**, Article ID e82667, 11 pages.
- Tang, Y., Zeng, X., Liang, J., 2010. Surface plasmon resonance: an introduction to a surface spectroscopy technique. *J. Chem. Educ.* **87**, 742-746.
- Taylor, S. L., Crevel, R.W.R., Sheffield, D., Kabourek, J., Baumert, J., 2009. Threshold dose for peanut: Risk characterization based upon published results from challenges of peanut-allergic individuals. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 1198-1204.
- Taylor, S.L., Hefle, S.L., Bindslev-Jensen, C., Bock, S.A., Burks Jr, A.W., Christie, L., Hill, D.J., Host, A., Hourihane, J.O., Lack, G., et al., 2002. Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: How much is too much? *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 24-30.
- Taylor, S.L., Moneret-Vautrin, D.A., Crevel, R.W.R., Sheffield, D., Morisset, M., Dumont, P., Remington, B.C., Baumert, J.L., 2010. Threshold dose for peanut: Risk characterization based upon diagnostic oral challenge of a series of 286 peanut-allergic individuals. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 814-819.
- Taylor, S.L., Nordlee, J.A., Niemann, L.M., Lambrecht, D.M., 2009. Allergen immunoassays-considerations for use of naturally incurred standards. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 83-92.
- Teuber, S.S., Comstock, S.S., Sathe, S.K., Roux, K.H., 2003. Tree nut allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**, 54-61.
- Thakur, M.S., Ragavan, K.V., 2013. Biosensors in food processing. *J. Food Sci. Technol.* **50**, 625-641.
- Thie, H., Binius, S., Schirrmann, T., Hust, M., Dübel, S., 2009. Multimerization domains for antibody phage display and antibody production. *New Biotechnol.* **26**, 314-321.
- Thie, H., Toleikis, L., Li, J., von Wasielewski, R., Bastert, G., Schirrmann, T., Esteves, I.T., Behrens, C.K., Fournes, B., Fournier, N., de Romeuf, C., Hust, M., Dübel, S., 2011. Rise and fall of an anti-MUC1 specific antibody. *PLoS One* **6**, Article ID e15921, 19 pages.
- Thio, M., Kormelink, T. G., Fischer, M. J., Blokhuis, B. R., Nijkamp, F. P., Redegeld, F. A., 2012. Antigen binding characteristics of immunoglobulin free light chains: Crosslinking by antigen is essential to induce allergic inflammation. *PLoS one* **7**, Article ID e40986, 7 pages.
- Thomas, W.D., Golomb, M., Smith, G.P., 2010. Corruption of phage display libraries by target-unrelated clones: diagnosis and countermeasures. *Anal. Biochem.* **407**, 237-240.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **74**, 835-855.
- Thomson, C. D., Chisholm, A., McLachlan, S. K., Campbell, J.M., 2008. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 379-384.
- Threshold Working Group, 2008. Approaches to establish thresholds for major food allergens and for gluten in food. *J. Food Prot.* **71**, 1043-1088.
- Toh, S.Y., Citartan, M., Gopinath, S.C.B., Tang, T. H., 2015. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosens. Bioelectron.* **64**, 392-403.
- Tohidkia, M.R., Barar, J., Asadi, F., Omid, Y., 2012. Molecular considerations for development of phage antibody libraries. *J. Drug Target.* **20**, 195-208.
- Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M.B., Winter, G. 1992. The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* **227**, 776-798.
- Tortajada-Genaro, L.A., Santiago-Felipe, S., Morais, S., Gabaldón, J.A., Puchades, R., Maquieira, Á., 2012. Multiplex DNA detection of food allergens on a digital versatile disk. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 36-43.
- Trapman, S., Burns, M., Broll, H., Macarthur, R., Wood, R., Zel, J., 2009. Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. *JRC Sci. Technical Rep.*
- Trashin, S.A., Cucu, T., Devreese, B., Adriaens, A., De Meulenaer, B., 2011. Development of a highly sensitive and robust Cor a 9 specific enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of hazelnut traces. *Anal. Chim. Acta* **708**, 116-122.
- Trentmann, O., Khatiri, N.K., Hoffmann, F., 2004. Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* **20**, 1766-1775.
- UNE-EN 15842:2010. Productos alimenticios. Detección de alérgenos alimenticios. Consideraciones generales y validación de los métodos. AENOR.

- USDA, 2009. Fruit and tree nuts outlook yearbook. <http://www.ers.usda.gov/publications/FTS/index.htm#yearbook> (consultado en mayo 2010).
- Uzzaman, A., Komarow, H.D., 2013. The immunological basis of non-IgE-mediated reactions, en *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives*. Metcalfe, D. D., Sampson, H. A., Simon, R. A., Lack, G. (Eds.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, Reino Unido, pp. 31-46.
- Valasek, M.A., Repa, J.J., 2005. The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* 29, 151-159.
- van Hengel, A.J., 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 111-118.
- van Raamsdonk, L.W.D., von Holst, C., Baeten, V., Berben, G., Boix, A., de Jong, J., 2007. New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 133, 63-83.
- Venkatachalam, M., Sathe, S. K., 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4705-4714.
- Venkatachalam, M., Teuber, S.S., Roux, K.H., Sathe, S.K., 2002. Effects of roasting, blanching, autoclaving, and microwave heating on antigenicity of almond (*Prunus dulcis* L.) proteins. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3544-3548.
- Villaño, D., García-Parrilla, M.C., Morales, L., Troncoso, A.M., 2012. Alergia alimentaria, en Camean, A. M., Repetto, M. (Eds.), *Toxicología Alimentaria*, Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España, pp. 581-592.
- Wan, L., Zhu, S., Zhu, J., Yang, H., Li, S., Li, Y., Cheng, J., Lu, X., 2013. Production and characterization of a CD25-specific scFv-Fc antibody secreted from *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3855-3863.
- Wang, D.D., Su, M.M., Sun, Y., Huang, S.L., Wang, J., Yan, W.Q., 2012. Expression, purification and characterization of a human single-chain Fv antibody fragment fused with the Fc of an IgG1 targeting a rabies antigen in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 86, 75-81.
- Wang, H., Yuan, F., Wu, Y., Yang, H., Xu, B., Liu, Z., Chen, Y., 2009. Detection of allergen walnut component in food by an improved real-time PCR method. *J. Food Prot.* 72, 2433-2435.
- Wang, W., Han, J., Wu, Y., Yuan, F., Chen, Y., Ge, Y., 2011. Simultaneous detection of eight food allergens using optical thin-film biosensor chips. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6889-6894.
- Wang, Y., Zhang, X., Zhang, C., Liu, Y., Liu, X., 2012. Isolation of single chain variable fragment (scFv) specific for Cry1C toxin from human single fold scFv libraries. *Toxicon*, 60, 1290-1297.
- Ward, O.P., 2012. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnol. Adv.* 30, 1119-1139.
- Watanabe, T., Akiyama, H., Maleki, S., Yamakawa, H., Iijima, K., Yamazaki, F., Matsumoto, T., Futo, S., Arakawa, F., Watai, M., et al., 2006. A specific qualitative detection method for peanut (*Arachis hypogaea*) in foods using polymerase chain reaction. *J. Food Biochem.* 30, 215-233.
- Weber, D., Raymond, P., Ben-Rejeb, S., Lau, B., 2006. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using capillary liquid chromatography and nanoelectrospray ionization-quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer for the detection of milk allergens. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1604-1610.
- Weisser, N.E., Hall, J.C., 2009. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol. Adv.* 27, 502-520.
- Wells, D.J., 2010. Genetically modified animals and pharmacological research, en Cunningham, F., Elliott, J., Lees, P. (Eds.), *Comparative and Veterinary Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Alemania, pp. 213-226.
- Wensing, M., Penninks, A.H., Hefle, S.L., Koppelman, S.J., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Knulst, A.C., 2002. The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 915-920.
- Wezler, X., Hust, M., Helmsing, S., Schirrmann, T., Dübel, S., 2012. Human antibodies targeting CD30 (+) lymphomas. *Hum. Antibodies* 21, 13-28.
- Whiteside, G., Alcocer, M.J.C., Kumita, J.R., Dobson, C.M., Lazarou, M., Pleass, R.J., Archer, D.B., 2011. Native-state stability determines the extent of degradation relative to secretion of protein variants from *Pichia pastoris*. *PLoS ONE* 6, Article ID e22692, 10 pages.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem* 4, 1120-1128.
- Willison, L.N., Sathe, S.K., Roux, K.H., 2014. Production and analysis of recombinant tree nut allergens. *Methods* 66, 34-43.
- Willison, L.N., Zhang, Q., Su, M., Teuber, S.S., Sathe, S.K., Roux, K.H., 2013. Conformational epitope mapping of Pru du 6, a major allergen from almond nut. *Mol. Immunol.* 55, 253-263.
- Wolf, W.J., Sathe, S.K., 1998. Ultracentrifugal and polyacrylamide gel electrophoretic studies of extractability and stability of almond meal proteins. *J. Sci. Food Agric.* 78, 511-521.
- Woolfe, M., Primrose, S., 2004. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends Biotechnol.* 22, 222-226.
- Wu, F., Yuan, H., Zhou, C., Mao, M., Liu, Q., Shen, H., Cen, Y., Qin, Z., Ma, L., Song Li, L., 2016. Multiplexed detection of influenza A virus subtype H5 and H9 via quantum dot-based immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* 77, 464-470.
- Wu, S.C., Ye, R., Wu, X.C., Ng, S.C., Wong, S.L., 1998. Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *J. Bacteriol.* 180, 2830-2835.
- Wu, S.C., Yeung, J.C., Duan, Y., Ye, R., Szarka, S.J., Habibi, H.R., Wong, S.L., 2002. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3261-3269.
- Xiulan, S., Yinzi, Z., Jingdong, S., Liyan, S., He, Q., Weijuan, Z., 2010. A quartz crystal microbalance-based immunosensor for shrimp allergen determination in food. *Eur. Food Res. Technol.* 231, 563-570.
- Xu, P., Raden, D., Doyle, I., Robinson, A.S., 2005. Analysis of unfolded protein response during single-chain antibody expression in *Saccharomyces cerevisiae* reveals different roles for BiP and PDI in folding. *Metab. Eng.* 7, 269-279.
- Xu, Z.L., Dong, J.X., Wang, H., Li, Z.F., Beier, R.C., Jiang, Y.M., Lei, H.T., Shen, Y.D., Yang, J.Y., Sun, Y.M., 2012. Production and characterization of a single-chain variable fragment linked alkaline phosphatase fusion protein for detection of O,O-diethyl organophosphorus pesticides in a one-step enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5076-5083.
- Yang, C., Gu, B., Xu, C., Xu, X., 2011. Self-assembled ZnO quantum dot bioconjugates for direct electrochemical determination of allergen. *J. Electroanal. Chem.* 660, 97-100.
- Yang, J., 2009. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, 1573-1580.

- Yang, M., Caterer, N.R., Xu, W., Goolia, M., 2015. Development of a multiplex lateral flow strip test for foot-and-mouth disease virus detection using monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods* 221, 119–126.
- Yano, T., Sakai, Y., Uchida, K., Nakao, Y., Ishihata, K., Nakano, S., Yamada, T., Sakai, S., Urisu, A., Akiyama, H., *et al.*, 2007. Detection of walnut residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1793-1796.
- Yman, I.M., Eriksson, A., Johansson, M.A., Hellenäs, K.E., 2006. Food allergen detection with biosensor immunoassays. *J. AOAC Int.* 89, 856-861.
- Yuan, Q., Hu, W., Pestka, J.J., He, S.Y., Hart, L.P., 2000. Expression of a functional antizearalenone single-chain Fv antibody in transgenic *Arabidopsis* plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3499-3505.
- Yunginger, J.W., Sweeney, K.G., Sturner, W.Q., Giannandrea, L.A., Teigland, J.D., Bray, M., Benson, P.A., York, J.A., Biedrzycki, L., Squillace, D.L., Helm, R.M., 1988. Fatal Food-Induced Anaphylaxis. *J. Am. Med. Assoc.* 260, 1450-1452.
- Zamboni, S., Mallano, A., Flego, M., Ascione, A., Dupuis, M.L., Gellini, M., Barca, S., Cianfriglia, M., 2008. Genetic construction, expression, and characterization of a single chain anti-CEA antibody fused to cytosine deaminase from yeast. *Int. J. Oncol.* 32, 1245-1251.
- Zempleni, J., Wijeratne, S.S.K., Hassan, Y.I., 2009. Biotin. *BioFactors* 35, 36-46.
- Zhang, W.J., Cai, Q., Guan, X., Chen, Q., 2015. Detection of peanut (*Arachis hypogaea*) allergen by real-time PCR method with internal amplification control. *Food Chem.* 174, 547-552.
- Zhang, X., Liu, Y., Zhang, C., Wang, Y., Xu, C., Liu, X., 2012. Rapid isolation of single-chain antibodies from a human synthetic phage display library for detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1B toxin. *Ecotox. Environ. Safe.* 81, 84-90.
- Zhao, J.B., Wei, D.Z., Tong, W.Y., 2007. Identification of *Escherichia coli* host cell for high plasmid stability and improved production of antihuman ovarian carcinoma x antihuman CD3 single-chain bispecific antibody. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 795-800.
- Zheng, C., Wang, X., Lu, Y., Liu, Y., 2012a. Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay. *Food Control* 26, 446-452.
- Zheng, Z., Chinnasamy, N., Morgan, R. A., 2012b. Protein L: a novel reagent for the detection of Chimeric Antigen Receptor (CAR) expression by flow cytometry. *J. Transl. Med.* 10, Article ID 29, 6 pages.
- Zhu, T., Guo, M., Tang, Z., Zhang, M., Zhuang, Y., Chu, J., Zhang, S., 2009. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* 107, 954-963.
- Zuidmeer, L., Goldhahn, K., Rona, R.J., Gislason, D., Madsen, C., Summers, C., Sodergren, E., Dahlstrom, J., Lindner, T., Sigurdardottir, S.T., *et al.*, 2008. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1210-1218.

APÉNDICES

1. LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS
2. LISTADO DE TABLAS
3. LISTADO DE FIGURAS

APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|-------------------|--|
| Ab | anticuerpo (del inglés <i>antibody</i>) |
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| ADNr | ADN ribosómico |
| AECOSAN | Agencia española de Consumo, Seguridad alimentaria y Nutrición |
| ANOVA | análisis de varianza (del inglés <i>analysis of variance</i>) |
| AOX | alcohol oxidasa (del inglés <i>alcohol oxidase</i>) |
| AP | fosfatasa alcalina (del inglés <i>alkaline phosphatase</i>) |
| APPCC | Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos |
| ARN | ácido ribonucleico |
| ASS | sistema específico de almendra (del inglés <i>almond specific system</i>) |
| BAD | dominio aceptor de biotina (del inglés <i>biotin acceptor domain</i>) |
| BBQ | <i>BlackBerry™ Quencher</i> |
| BCA | ácido bicinconínico (del inglés <i>bicinchoninic acid</i>) |
| BCCP | proteína transportadora de biotina y carboxilo (del inglés <i>biotin carboxyl carrier protein</i>) |
| BirA | ligasa de biotina (del inglés <i>biotin ligase</i>) |
| BNS | sistema específico de nuez de Brasil (del inglés <i>Brazil nut specific system</i>) |
| bp | <i>base pair</i> |
| BRC | <i>British Retail Consortium</i> |
| BSA | albúmina sérica bovina (del inglés <i>bovine serum albumin</i>) |
| CBOL | Consortio del Código de Barras de la Vida (del inglés <i>Consortium for the Barcode of Life</i>) |
| CD | dicroísmo circular (del inglés <i>circular dichroism</i>) |
| CDR | regiones determinantes de la complementariedad (del inglés <i>complementary determining regions</i>) |
| CEBAS-CSIC | Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-Consejo Superior de Investigaciones Científicas |
| CH | contante pesada (del inglés <i>constant heavy</i>) |
| CHO | células derivadas de ovario de hámster chino (<i>Cricetus griseus</i>) (del inglés <i>Chinese hamster ovary</i>) |
| CITA | Centro de Investigación y Tecnología de Aragón |
| CLC | cromatografía líquida capilar (del inglés <i>capillary-liquid chromatography</i>) |
| Cp | <i>crossing point</i> |
| CPA | control positivo de amplificación |
| Cq | <i>quantification cycle</i> |
| CRM | material certificado de referencia (del inglés <i>certified reference material</i>) |
| Ct | <i>threshold cycle</i> |
| CV | coeficiente de variación (del inglés <i>coefficient of variation</i>) |
| Ck | constante ligera (kappa) (del inglés <i>constant light</i>) |
| Da | Dalton |
| dab | anticuerpo de dominio simple (del inglés <i>single-domain antibody</i>) |
| DFL | dispositivos de flujo lateral |
| DNA | ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| dUTP | desoxiuridina trifosfato (del inglés <i>deoxyuridine triphosphate</i>) |
| DVD | disco versátil digital (del inglés <i>digital versatile disc</i>) |
| EAACI | Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (del inglés <i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>) |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> |
| ELISA | ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) |
| EMBL | <i>European Molecular Biology Laboratory</i> |

| | |
|----------------------|---|
| EMBOSS | <i>European Molecular Biology Open Software Suite</i> |
| ESI | ionización por electroespray (del inglés <i>electrospray ionization</i>) |
| Fab | fragmento de unión al antígeno (del inglés <i>fragment antigen-binding</i>) |
| FAM | carboxifluoresceína (del inglés <i>carboxyfluorescein</i>) |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FDE | <i>FoodDrink Europe</i> |
| FPLC | cromatografía líquida rápida de proteínas (del inglés <i>fast protein liquid chromatography</i>) |
| FR | regiones de entramado (del inglés <i>framework regions</i>) |
| FRET | transferencia de energía de resonancia de Förster (del inglés <i>Förster resonance energy transfer</i>) |
| FSA | <i>Food Standards Agency</i> |
| HEK293 | células embrionarias de riñón humano 293 (del inglés <i>human embryonic kidney 293 cells</i>) |
| HPLC | cromatografía líquida de alta resolución (del inglés <i>high-performance liquid chromatography</i>) |
| HRM | alta resolución de punto de fusión (del inglés <i>high resolution melting</i>) |
| HRM | análisis de alta resolución (del inglés <i>high resolution melt</i>) |
| HRP | peroxidasa de rábano (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>) |
| ICH | <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> |
| IgE | inmunoglobulina E |
| Ig-fLCs | cadena ligera libre de inmunoglobulinas (del inglés <i>immunoglobulin free light chains</i>) |
| IgG | inmunoglobulina G |
| IGS | espaciador intergénico (del inglés <i>intergenic spacer</i>) |
| IgY | inmunoglobulina Y |
| INRA | <i>Institut National de la Recherche Agronomique</i> |
| IRMM | <i>Institute for Reference Materials and Measurements</i> |
| IRTA | <i>Institut de Recerca I Tecnologia Agroalimentaries</i> |
| IT | trampa iónica (del inglés <i>ion trap</i>) |
| ITS | espaciador interno de la transcripción (del inglés <i>internal transcribed spacer</i>) |
| IUPAC | Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>) |
| kDa | kilodalton |
| LC | cromatografía líquida (del inglés <i>liquid chromatography</i>) |
| LOD | límite de detección (del inglés <i>limit of detection</i>) |
| LOQ | límite de cuantificación (<i>limit of quantification</i>) |
| LSD de Fisher | diferencia mínima significativa de Fisher (del inglés <i>Fisher's least significant difference</i>) |
| LTP | proteínas transportadoras de lípidos (del inglés <i>lipid transfer proteins</i>) |
| MALDI | desorción/ionización láser asistida por matriz (del inglés <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>) |
| MLPA | amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (del inglés <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>) |
| MRC | Medical Research Council |
| MS | espectrometría de masas (del inglés <i>mass spectrometry</i>) |
| MS/MS | Espectrometría de masas en tándem |
| MWCO | corte de peso molecular (del inglés <i>molecular weight cut off</i>) |
| NIH | <i>National Institutes of Health</i> |
| NIST | <i>National Institute of Standards and Technology</i> |
| OAS | síndrome de alergia oral (del inglés <i>oral allergy syndrome</i>) |
| OD | densidad óptica (del inglés <i>optical density</i>) |
| PAC | control positivo de amplificación (del inglés <i>positive amplification control</i>) |

| | |
|-----------------|--|
| PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>) |
| pb | pares de bases |
| PBS | tampón fosfato salino (del inglés <i>phosphate-buffered saline</i>) |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PdBSF | <i>Prunus dulcis Biotinylated Soluble Fragment</i> |
| PeIB | Pectato liasa B (del inglés <i>pectate lyase B</i>) |
| PVDF | fluoruro de polivinilideno (del inglés <i>polyvinylidene difluoride</i>) |
| Q | cuadrupolo (del inglés <i>quadrupole</i>) |
| QCM | microbalanza de cristal de cuarzo (del inglés <i>quartz crystal microbalance</i>) |
| RBS | sitio de unión al ribosoma (del inglés <i>ribosomal binding site</i>) |
| RNA | ácido ribonucleico (del inglés <i>ribonucleic acid</i>) |
| RT | temperatura ambiente (del inglés <i>room temperature</i>) |
| scFab | fragmento Fab de cadena sencilla (del inglés <i>single chain Fab fragment</i>) |
| scFv | fragmento variable de cadena sencilla (del inglés <i>single chain variable fragment</i>) |
| SD | desviación estándar (del inglés <i>standard deviation</i>) |
| SDS | dodecilsulfato sódico (del inglés <i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SEC | cromatografía de exclusión molecular (del inglés <i>size exclusion chromatography</i>) |
| SNP | polimorfismo de nucleótido simple (del inglés <i>single nucleotide polymorphism</i>) |
| SPR | resonancia de plasmones superficiales (del inglés <i>surface plasmon resonance</i>) |
| TAMRA | tetrametilrodamina (del inglés <i>tetramethylrhodamine</i>) |
| TOF | tiempo de vuelo (del inglés <i>time of flight</i>) |
| TOP | <i>take-off-point</i> |
| UE | Unión Europea |
| UNE-EN | una norma española- <i>European Norm</i> |
| UPR | respuesta a proteínas desplegadas (del inglés <i>unfolded protein response</i>) |
| VH | variable pesada (del inglés <i>variable heavy</i>) |
| VL | variable ligera (del inglés <i>variable light</i>) |
| Vκ | variable ligera (kappa) (del inglés <i>variable light</i>) |
| WB | <i>western blotting</i> |
| WHO/IUIS | Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (del inglés <i>World Health Organization/ International Union of Immunological Societies</i>) |
| wt | tipo natural o silvestre (del inglés <i>wild type</i>) |

APÉNDICE 2. LISTADO DE TABLAS

CAPÍTULO 2

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabla 2.1. | Kits de ELISA comerciales para la detección de alérgenos alimentarios..... | 32 |
| Tabla 2.2. | Kits de DFL comerciales para la detección de alérgenos alimentarios..... | 33 |
| Tabla 2.3. | Métodos publicados basados en la detección de ADN para la detección de frutos de cáscara y cacahuete..... | 43 |
| Tabla 2.4. | Kits de PCR comerciales para la detección de alérgenos alimentarios..... | 45 |
| Tabla 2.5. | Diferentes sistemas de expresión que se han empleado en la producción de scFv | 59 |

CAPÍTULO 3/CHAPTER 3

| | | |
|-----------------|---|----|
| Table 1. | <i>Specificity of the real-time PCR system.....</i> | 66 |
| Table 2. | <i>DNA sequences and description of the primers and probes used in this study.</i> | 67 |
| Table 3. | <i>Results of the Brazil nut real-time PCR analysis of 66 commercial food products</i> | 71 |
| Table 4. | <i>Real-time PCR results obtained in the analysis of commercial food products that contained Brazil nut according to the Brazil nut specific system.</i> | 71 |

CAPÍTULO 4/CHAPTER 4

| | | |
|-----------------|--|----|
| Table 1. | <i>List of almond varieties analyzed by the almond real-time PCR system</i> | 78 |
| Table 2. | <i>Specificity of the almond real-time PCR system.....</i> | 79 |
| Table 3. | <i>DNA sequences and description of the primers and probes used in this study.....</i> | 81 |
| Table 4. | <i>Results of the almond real time PCR analysis of 214 commercial products.....</i> | 82 |
| Table 5. | <i>Real-time PCR results obtained with the ITS almond-specific system and 18S rRNA positive amplification control in the analysis of commercial food products with a declared almond percentage and those samples that didn't indicate the presence of almonds or traces on the labeling, but were found to contain almond traces.....</i> | 83 |

CAPÍTULO 5/CHAPTER 5

| | | |
|-----------------|--|----|
| Table 1. | <i>List of species showing no cross-reactivity with Brazil nut in the indirect phage-ELISA.....</i> | 90 |
| Table 2. | <i>Peptides identified by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry and Mascot database search.....</i> | 93 |
| Table 3. | <i>Determination of the presence of Brazil nut protein in various commercial processed food products using the Brazil nut ELISA.....</i> | 97 |

CAPÍTULO 6/CHAPTER 6

| | | |
|-----------------|--|-----|
| Table 1. | <i>Phage-ELISA results (OD 450 nm) obtained for different almond kernel cultivars with scFvs from clones PD1F6 and PD2C9.....</i> | 102 |
| Table 2. | <i>List of species not showing cross-reactivity with almond in the indirect phage-ELISA.....</i> | 103 |
| Table 3. | <i>Determination of the presence of almond in various commercial processed food products using almond phage-ELISA and real-time PCR.....</i> | 108 |

CAPÍTULO 7/CHAPTER 7

| | | |
|-----------------|---|-----|
| Table 1. | <i>Almond peptides identified by MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometry and Mascot Database Search.....</i> | 122 |
| Table 2. | <i>Brazil nut peptides identified by MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometry and Mascot Database Search.....</i> | 122 |

CAPÍTULO 8/CHAPTER 8

| | | |
|-----------------|---|-----|
| Table 1. | <i>Peptides identified by MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometry.....</i> | 136 |
| Table 2. | <i>Determination of the presence of almond in various commercial processed food products using multimerized-scFv ELISA and phage-ELISA.....</i> | 139 |

SUPPLEMENTARY DATA B

| | | |
|-----------------|---|-----|
| Table I. | <i>List of primers employed in this work.....</i> | 147 |
|-----------------|---|-----|

CAPÍTULO 9

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Tabla 9.1. | Listado de especies recogidas en el Anexo II del Reglamento 1169/2011 que poseen una albúmina 2S reconocida como alérgeno por la WHO/IUIS..... | 153 |
| Tabla 9.2. | Listado de cultivares de almendra analizados en este trabajo..... | 158 |
| Tabla 9.3. | Comparación de los LOD obtenidos con los distintos fago-anticuerpos en las técnicas de ELISA indirecto desarrolladas para detectar nuez de Brasil y almendra..... | 173 |

CAPÍTULO 11

| | | |
|--------------------|-------------------------------------|-----|
| Tabla 11.1. | Listado de cebadores empleados..... | 205 |
|--------------------|-------------------------------------|-----|

APÉNDICE 3. LISTADO DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

| | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 2.1. | Clasificación de reacciones adversas a los alimentos según la EAACI | 21 |
| Figura 2.2. | Representación esquemática del fago M13 | 50 |
| Figura 2.3. | Representación esquemática de un anticuerpo (Ab), un fragmento de unión al antígeno (Fab) y un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) | 53 |
| Figura 2.4. | Representación esquemática de la técnica de <i>biopanning</i> | 53 |
| Figura 2.5. | Mapa del vector pIT2, albergando un inserto codificante de un fragmento de anticuerpo (scFv) | 54 |

CAPÍTULO 3/CHAPTER 3

| | | |
|------------------|--|----|
| Figure 1. | <i>Alignment of the 2S albumin DNA sequences from Brazil nut (Bertholletia excelsa AB044391), peanut (Arachis hypogaea FJ713110.1), pecan nut (C. illinoensis AY192569.1), walnut (Juglans regia 1794251), hazelnut (Corylus avellana FJ358504.1), pistachio (Pistacia vera DQ631675.1) and cashew nut (Anacardium occidentale AY081853.1) available at the GenBank-EMBL database.....</i> | 69 |
| Figure 2. | <i>Gel electrophoresis of total genomic DNA extracted from Brazil nut.....</i> | 69 |
| Figure 3. | <i>Cp values plotted versus the logarithm of the DNA concentration (ng) of raw and heat treated (160 °C/13 min) Brazil nut</i> | 70 |
| Figure 4. | <i>Cp values plotted versus the logarithm of Brazil nut concentrations (10⁵-2.5 mg/kg) in wheat flour for raw Brazil nut mixtures, and heat treated (160 °C/13 min) Brazil nut mixtures.....</i> | 70 |

CAPÍTULO 4/CHAPTER 4

| | | |
|------------------|--|----|
| Figure 1. | <i>Deoxyribonucleic acid sequence alignment of the ITS region PCR products from almond (Prunus dulcis: Marcona/HF969276, Nonpareil/HF969274 and Lauranne/HF969277), plum (Prunus domestica HF969273 and HF969272), apricot (Prunus armeniaca HF969271), peach (Prunus pérsica JF978135), cherry (Prunus avium HM856805), sour cherry (Prunus cerasus FJ899099), pistachio (Pistacia vera AY677201), cashew nut (Anacardium occidentale AB071690), macadamia (Macadamia intergrifolia EU642799), walnut (Juglans regia HE574850), pecan (Carya illinoensis AF303825), hazelnut (Corylus avellana HQ442261), peanut (Arachis hypogaea HQ537458) and Brazil nut (Bertholletia excelsa HE806059), available at the GenBank-EMBL database</i> | 80 |
| Figure 2. | <i>Linearity test, regression line, sensitivity parameters and standard deviation of the almond-specific TaqMan system on the ITS 1 region, using three different DNA extractions of seven different almond concentrations (100,000, 10,000, 1000, 100, 10, 1, 0.1 mg/kg) for both binary mixtures of raw and heat treated almond/wheat flour.....</i> | 82 |

CAPÍTULO 5/CHAPTER 5

| | | |
|------------------|--|--|
| Figure 1. | <i>Elution profile of Brazil nut Ber e 1 protein obtained from preparative HPLC column. (Inset) SDS-PAGE electrophoresis</i> | |
|------------------|--|--|

(under reducing conditions) analysis of fraction eluted off the column92

Figure 2. Indirect phage-ELISA results obtained with polyclonal phages rescued at each round of panning against Brazil nut extract (A) and purified Ber e 1 (B).....93

Figure 3. PCR amplification and sequencing of the selected clones94

Figure 4. Representative standard curve of the developed Brazil nut indirect phage-ELISA95

CAPÍTULO 6/CHAPTER 6

Figure 1. Indirect phage-ELISA results obtained with polyclonal phages rescued at each round of selection against almond extract.....105

Figure 2. Amino acid sequences of the almond binding scFvs deduced from the nucleotide sequences by ExPASy Web site106

Figure 3. Representative standard curves of the developed almond phage ELISA107

Figure 4. Representative standard curves of the almond phage ELISA performed with protein extracts obtained from almond/wheat flour binary mixtures107

CAPÍTULO 7/CHAPTER 7

Figure 1. (A) SDS-PAGE electrophoresis (under reducing conditions) of almond and Brazil nut protein extracts. (B) (Left) Non-denaturing, continuous buffer system- electrophoresis of Brazil nut protein extracts. (Right) Western-blotting results of PVDF membrane probed with BE95 phage-clone.....117

Figure 2. Indirect phage-ELISA results obtained from Brazil nut digested with proteases and thermally treated.....118

Figure 3. Size-exclusion fractionation of Brazil nut proteins. (A) Chromatographic profile of Brazil nut protein extract. (Inset) Size-exclusion fractionation of peak B. (B) Indirect phage-ELISA results performed with different fractions eluted from peak B. (C) SDS-PAGE electrophoresis (under reducing condition) of fractions obtained from peak B119

Figure 4. Ion exchange chromatography profile of amandin (almond 11S globulin). (Inset) SDS-PAGE electrophoresis (under reducing conditions) of fractions eluted off the column.....119

Figure 5. Western blotting analysis results for almond proteins. (Left) SDS-PAGE electrophoresis (8% monomer acrylamide/bis resolving gel). (Rigth) PVDF membrane probed with PD1F6 phage-clone.120

Figure 6. (A) Distribution of the amandin sedimentation coefficients in PBS at 20 °C. (B) Distribution of the sedimentation coefficients of Ber e 2 at 20 °C in PBS.121

Figure 7. SDS-PAGE electrophoresis under reducing conditions, but without boiling in sample buffer, of fraction 5 from almond ion exchange chromatography. (B) SDS-PAGE electrophoresis under reducing conditions of fraction B from Brazil nut size exclusion chromatography.121

Figure 8. (A) Far-UV CD spectra of amandin at different temperatures. (B) Near-UV spectrum of amandin at 20 °C. (C) Variation of amandin ellipticity at 283 nm with temperature. (D) Far-UV CD spectra of Ber e 2 globulin at different temperatures.....123

SUPPLEMENTARY DATA A

| | | |
|------------------|---|-----|
| Figure I. | <i>(Left) Native-PAGE (12% acrylamide/bisacrylamide resolving gel). (Right) PVDF membrane developed with phage clone PD1F6.</i> | 129 |
|------------------|---|-----|

CAPÍTULO 8/CHAPTER 8

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figure 1. | <i>Representative screening of 24 wells expression plates after methanol induction</i> | 134 |
| Figure 2. | <i>SDS-PAGE electrophoresis of culture supernatants from the different <i>P. pastoris</i> clones employed in this work, after methanol induction (lanes 1–3) and without induction (lanes 5–7).</i> | 134 |
| Figure 3. | <i>Dot-blotting analysis of culture supernatants produced by the different <i>P. pastoris</i> clones obtained in this work, either revealed with ExtrAvidin-peroxidase (left) or mouse monoclonal anti-c-Myc antibody (right).</i> | 135 |
| Figure 4. | <i>SDS-PAGE electrophoresis in non-reducing conditions of multimeric-scFv.</i> | 135 |
| Figure 5. | <i>ScFv amino acid sequence.</i> | 137 |
| Figure 6. | <i>Distribution of the multimeric-scFv, monomeric scFv and Extravidin-Peroxidase sedimentation coefficients in PBS at 20 °C.</i> | 138 |
| Figure 7. | <i>Representative standard curve of the multimerized scFv-ELISA performed with protein extracts obtained from almond/wheat flour binary mixtures.</i> | 139 |

SUPPLEMENTARY DATA B

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figure I. | <i>pMJA181 vector containing scFv and BAD nucleotide sequences constructed in pPICZaB plasmid.</i> | 143 |
| Figure II. | <i>pMJA180 vector containing BirA nucleotide sequence constructed in pPIC6aA plasmid.</i> | 143 |
| Figure III. | <i>Vector maps of pPICZaB y pPIC6aA summarizing the features of the vectors</i> | 144 |
| Figure IV. | <i>Dot blotting analysis of supernatants from 95 different <i>P. pastoris</i> clones transformed with pMJA181 plasmid after methanol induction to produce scFv conjugated with BAD</i> | 145 |
| Figure V. | <i>Gel electrophoresis showing the PCR products obtained with primers (A) MJA254/MJA259 and (B) MJA255/MJA256.</i> | 145 |
| Figure VI. | <i>Biotin ligase reaction</i> | 146 |

CAPÍTULO 9

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 9.1. | <i>Estructura del ADN ribosómico</i> | 154 |
| Figura 9.2. | <i>Secuencias aminoacídicas deducidas en el servidor web ExPASy de las secuencias nucleotídicas de los scFv específicos de nuez de Brasil (BE95) y de almendra (PD1F6 y PD2C9)</i> | 171 |

CAPÍTULO 11

| | | |
|---------------------|---|-----|
| Figura 11.1. | <i>Figura esquemática de un dispositivo de flujo lateral de detección múltiple</i> | 202 |
| Figura 11.2. | <i>Secuencia aminoacídica del clon BE95</i> | 204 |
| Figura 11.3. | <i>Detalle del mapa de los vectores, que incluyen la secuencia nucleotídica del clon BE95 correspondiente y el BAD, construidos en el plásmido pPICZaB.</i> | 206 |

