Chinese Spring 밀의 이수체 계통에서 LabChip 시스템을 이용한 종실 글리아딘 단백질의 고속 프로파일링

장유란 · 최수진 · 임선형 · 김창국 · 윤웅한 · 강상호 · 이종열*

농촌진흥청 국립농업과학원

High-Throughput Profiling of Wheat Gliadin Proteins Using LabChip System in Chinese Spring and Its Aneuploid Lines

You-Ran Jang, Soo Jin Choi, Sun-Hyung Lim, Chang-Kug Kim, Ung-Han Yoon, Sang-ho Kang, and Jong-Yeol Lee*

National Institute of Agricultural Science, RDA, Jeonju, 54874, Korea

Abstract Gliadin proteins, which are a component of gluten and confer viscosity and extensibility on wheat dough, are major determinants of wheat processing suitability and also present dietary problems for consumers with celiac disease or wheat allergies. In this study, gliadin proteins of the hexaploid wheat variety 'Chinese Spring' (CS) and of its nullisomic-tetrasomic (NT) and ditelosomic (DT) lines missing group 1 and 6 chromosome, were analyzed using LabChip GXII Touch 24 within 1 min per sample. The chromatogram pattern analysis of gliadin proteins from group 1 aneuploid lines (N1AT1B, N1AT1D; N1BT1A, N1BT1D; N1DT1A, N1DT1B) missing 1A, 1B and 1D chromosomes respectively, from CS showed that 24, 25 and 26 sec peaks of CS, presuming to be ω 5-, ω 1,2- and γ -gliadins, were disappeared. The analysis of group 6 aneuploid lines (N6AT6B, N6AT6D, 6AL; N6BT6A, 6BL; N6DT6B, 6DL) missing 6A, 6AS; 6B, 6BS; 6D, 6DS chromosomes respectively, from CS indicated that 22, 25 and 26 sec peaks of CS, presuming to be α -/ β -gliadins, were disappeared. The results of this study will be applicable to high-throughput screening of wheat gliadin mutants among wheat breeding lines and genetic resources for the development of allergy - reduced wheat.

Keywords wheat, gliadin proteins, Chinese Spring, aneuploid lines, LabChip

Received on October 10, 2017. Accepted on December 4, 2017.

* Corresponding Author (E-mail: jy0820@korea.kr, Tel: +82-63-238-4616, Fax: +82-63-238-4604)

서 언

밀 저장 단백질은 글루텐과 비글루텐 단백질 두 가지로 분류된다. 비글루텐 단백질은 밀 단백질의 20-30%를 차지하며, 물에 녹는 알부민과 염에 녹는 글로불린으로 나뉜다. 글루텐 단백질은 밀 단백질의 70-80%를 차지하며, 알칼리에 용해되는 글루테닌과 알코올에 용해되는 글리아딘이 있다(Wieser 2007).

글루테닌은 다량체로서 분자량에 따라 고분자 글루테닌과 저분자 글루테닌으로 나뉘고, 각각 67-88kDa과 30-45kDa에 존재하며 밀반죽의 탄성에 기여한다(Cornish et al. 2006, Singh & Shepherd 1988). 고분자 글루테닌은 1번 염색체의 A, B 그리고 D의 장완에 위치한 *Glu-1*에 의해 암호화되고 x-type과 y-type으로 나뉜다(Payne et al. 1981, Payne 1987, Shewry et al. 1995, Wieser 2007, Forde et al. 1985, Payne & Lawrence 1983).

저분자 글루테닌은 1번 염색체 A, B 그리고 D의 단완에 위치한 *Glu-3*에 의해 암호화되고(Singh & Shepherd 1988) 글리아딘 일부 유전자를 발현시키는 *Gli-1*과 매우 밀접하게 연관되어있다.

글리아딘은 30-75kDa의 분자량을 가지며(Fido et al. 1997) 밀반죽의 점성과 신장성에 기여하고(Khatkar et al. 2002, Wieser 2007), A-PAGE (acid polyacrylamide gel electrophoresis)의 이동성에 따라 ω 5-, ω 1,2-, α -/ β -, γ -글리아딘으로 나뉜다(Wieser 2007, Banc et al. 2009). 대부분의 글리아딘은 1번과 6번 염색체의 단완에 위치한 *Gli-1*과 *Gli-2*에 의해 암호화된다. ω 1,2-는 1번 염색체의 단완에 위치한 *Gli-A1*과 *Gli-D1*에 암호화되고, ω 5-글리아딘은 *Gli-B1*에 암호화된다. γ -글리아딘은 *Gli-A1*, *B1*, *D1*에 의해 암호화되고, α -/ β -글리아딘은 6번 염색체의 단완에 위치한 *Gli-A2*, *B2*, *D2*에 의해 암호화된다(Brown & Flavell 1981, Ferranti et al. 2007, Wrigley & Shepherd 1973).

밀 의존 운동 유발성 과민증(wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis; WDEIA)은 신체 운동으로 유발되는 음식 알러지로 주요한 알레르겐은 ω 5-글리아딘이라고 알려져 있다(Battais et al. 2005, Matsuo et al. 2004, Matsuo et al. 2005, Morita et al. 2003, Palosuo et al. 1999, Palosuo et al. 2001). WDEIA는 두드러기와 쇼크 또는 저혈압과 같은 알러지를 유발하여 심한 경우는 사망에 이르게 하며, 주요한 항원 결정기는 QQIPQQQ와 QQFPQQ이다(Matsuo et al. 2005). 미국 인구의 약 1%에서 피해가 나타나는 셀리악 병(Celiac disease; CD)은 T 세포가 관여하는 자가면역 질환(auto-immune disease)으로 선천적으로 글루텐 단백질을 소화시키지 못하여 작은창자의 용모가 팽팽해져 영양분의 흡수가 안되어 일반적 증상으로 만성 설사와 성장이 저하되고, 체중이 감소하며 구토, 복통 등을 일으킨다. 중심 알레르겐은 α -, γ -글리아딘으로(Van Herpen et al. 2006, Väder et al. 2002) α -글리아딘의 주요한 항원 결정기는 PFPQPQLPY 등 5개이고(Sollid et al. 2012), γ -글리아딘의 주요한 항원 결정기는 PQQSFPEQQ 등 11개이다(Tye-Din et al. 2010). 이 심각한 질병을 치료할 수 있는 방법은 평생 밀이 들어간 음식을 섭취하지 않거나, 유발 정도가 낮은 밀을 섭취하는 것이 유일하다(Matsuo et al. 2004). 현재 전 세계 많은 그룹에서 전통적인 육종 또는 생명공학 기술을 이용하여 알러지 저감 밀을 육성하고 있다.

일반적으로 글리아딘 분석을 위해서 A-PAGE, SDS-PAGE 그리고 2-DGE를 사용하고 있으나(Briggle & Curtis 1987, Gupta & Shepherd 1990, Gupta et al. 1991), 이에 사용되는 SDS와 acrylamide 등과 같은 시약은 독성이 있어 위험하고, 실험 단계가 복잡하며, 충분한 해상도, 재현성 및 정량화가 어렵고, 긴 분석 시간등의 단점이 있다. 역상 고속 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)는 재현성 및 분해능이 뛰어나고 정량이 가능하여 장점이 많지만, 분석 시간이 길고, 많은 peak 해석에 어려움이 있다. 또한 상기의 실험들은 추출, 실험 및 분석에 숙련된 기술이 필요하다.

1990년대 초기에 등장한 마이크로 칩 모세관 전기영동 시스템(Lab-on-a-Chip; LabChip)은 칩 속의 실험실이란 뜻으로 유리 또는 폴리머 칩에 마이크로 크기의 채널을 포함하여 마이크로 유체로 신속하게 분리하는 기술이다(Harrison et al. 1993, Jacobson et al. 1994, Manz et al. 1992, Mathies et al. 2000). 이 칩은 기존의 실험실에서 할 수 있는 실험이나 연구 과정을 칩 속의 채널에서 신속히 가능하게 하며, 극미량의 시료와 1분 전후의 분석 시간으로 분석의 효율성을 높일 수 있다(Rhazi et al. 2009).

본 연구는 주요 글리아딘 단백질이 결손된 Chinese Spring(CS) 밀 이수체 계통에서 Lab-on-a-Chip 시스템을 이용하여 글리아딘

단백질을 고속 탐색하고 알러지 저감 밀 육성을 위한 글리아딘 돌연변이체 탐색을 위해 활용하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 재료는 21쌍의 완전한 염색체를 가지고 있는 Chinese Spring (CS)와 21쌍 중 한 쌍의 염색체가 결손 되고, 다른 한 쌍의 염색체가 배가 된 CS nullisomic-tetrasomic line (N1AT1B, N1AT1D, N1BT1A, N1BT1D, N1DT1A, N1DT1B, N6AT6B, N6AT6D, N6BT6A, N6DT6B) 그리고 21쌍의 염색체 중 한 쌍의 단원이 결손된 CS ditelosomic line (6AL, 6BL, 6DL)으로 미국 농업연구청(National Plant Germplasm System)과 일본 밀 유전자원 분양 기관인 National Bioresource Project (<https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/>)에서 분양받아 2016년 증식하여 사용하였다.

글리아딘 추출

글리아딘 추출은 Dziuba et al. (2014)를 참고하였다. 막자사발을 이용하여 분쇄한 밀 100 mg에 70% EtOH 수용액 1 ml을 혼합하여 상온에서 2시간 동안 반응시키고 20°C 15000 × g에서 5분 동안 원심분리 후 글리아딘이 녹아있는 상등액을 사용하였다.

LabChip 분석

LabChip 분석시 단백질 loading을 위한 전처리에는 Express Protein Assay Kit (Perkin Elmer, P/N 760498)에 의해 실시하였다. 추출한 글리아딘 5ul와 1M DTT가 첨가된 protein express sample buffer 7ul를 섞어 100°C에서 5분 동안 변성(denature)시키고, 멸균수 32ul로 희석하여 96well plate에 로딩하였다. 준비된 시료의 글리아딘 분석은 LabChip GXII Touch 24 (PerkinElmer, Waltham, MA)에서 LabChip GX Reviewer free software (PerkinElmer)를 이용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

LabChip에 의한 Chinese Spring과 CS nullisomic-tetrasomic line 글리아딘 분석

본 연구는 ω 5-, ω 1,2-, α - β -, γ -글리아딘을 분석하기 위해 Chinese Spring(CS)와 CS nullisomic-tetrasomic line (NT line)와

Table 1. The CS aneuploid lines used in the LabChip analysis and the disappeared peaks were indicated.

Chromosome	Encoded gliadin	Used aneuploid lines	Disappeared peaks (sec)
1A	ω 1,2-, γ -	N1AT1B, N1AT1D	26
1B	ω 5-, γ -	N1BT1A, N1BT1D	25
1D	ω 1,2-, γ -	N1DT1A, N1DT1B	24, 25, 26
6A(S)	α -/ β -	N6AT6B, N6AT6D, 6AL	22, 25, 26
6B(S)	α -/ β -	N6BT6A, 6BL	24, 25, 26
6D(S)	α -/ β -	N6DT6B, 6DL	24, 25, 26

CS ditelosomic line을 사용해 LabChip을 실시했다. CS는 7개의 염색체를 6쌍 가지는 육배체(hexaploid)로, 밀의 유전학 연구에 가장 많이 사용하고 있으며, 밀 유전체 분석을 위한 International wheat genome sequencing consortium (<https://www.wheatgenome.org/>)에 사용된 품종이다. CS의 유전분석을 위한 글리아딘을 암호화하는 1번과 6번 염색체가 결손된 NT line 10 개, ditelosomic line 3 개를 사용하여 각 글리아딘을 분석하였다(Table 1).

1번 염색체에 암호화된 글리아딘은 Table 1에서 보듯이 ω 5-, ω 1,2-, γ -글리아딘이 암호화되어 있고, ω 5-글리아딘과 γ -글리

아딘은 각각 WDEIA와 CD의 알레르겐이다. 염색체 1A에 암호화된 ω 1,2-, γ -글리아딘의 LabChip 분석을 위해 nullisomic 1A - tetrasomic 1B (N1AT1B)와 nullisomic 1A - tetrasomic 1D (N1AT1D)를 사용했다. 이 두 유전자원은 1A가 없고, 각각 1B와 1D가 4배체(tetrasomic)인 육배체 밀로 CS와 비교하여 결손된 peak가 1A임을 확인 가능하게 한다. 염색체 1B에 암호화된 글리아딘은 ω 5-, γ -글리아딘으로 nullisomic 1B - tetrasomic 1A (N1BT1A)와 nullisomic 1B - tetrasomic 1D (N1BT1D)를 사용했고, 염색체 1D에 암호화된 글리아딘은 ω 1,2-, γ -글리아딘으로 nullisomic 1B - tetrasomic 1A (N1BT1A)와 nullisomic 1B - tetrasomic 1D (N1BT1D)를 사용했다.

6번 염색체 단원에 암호화된 글리아딘은 α -/ β -글리아딘으로 CD의 중심 알레르겐으로 알려져 있다. 염색체 6A에 암호화된 α -/ β -글리아딘 분석을 위해 nullisomic 6A-tetrasomic 6B (N6AT6B), nullisomic 6A-tetrasomic 6D (N6AT6D) 그리고 ditelosomic 6AL (6AL)을 사용했다. N6AT6B와 N6AT6D는 모두 6A가 없고 각각 6B와 6D가 4배체인 육배체 밀이고, 6AL은 염색체 6A의 단원만 제거되고 장원은 존재하는 것으로 CS와 비교하여 결손된 peak가 6A 단원에 존재함을 확인 가능하게

Fig. 1. LabChip analysis of gliadin fractions of the CS and N1AT1B, N1AT1D. The red arrows indicate the disappeared peaks. The green and black arrows mean the LM(Low marker) and Xsys(system peak) respectively.

Fig. 2. LabChip analysis of gliadin fractions of the CS and N1BT1A, N1BT1D. The red arrows indicate the disappeared peaks. The green and black arrows mean the LM(Low marker) and Xsys(system peak) respectively.

Fig. 3. LabChip analysis of gliadin fractions of the CS and N1DT1A, N1DT1B. The red arrows indicate the disappeared peaks. The green and black arrows mean the LM(Low marker) and Xsys(system peak) respectively.

한다. 염색체 6B와 6D에 암호화된 글리아딘도 α - β -글리아딘으로 각각 nullisomic 6B-tetrasomic 6A (N6BT6A), ditelosomic 6BL(6BL)과 nullisomic 6D-tetrasomic 6B (N6DT6B), ditelosomic 6DL (6DL)을 사용했다.

염색체 1A가 제거된 N1AT1B, N1AT1D와 CS를 LabChip으로 분석한 결과 Fig. 1에서 보듯이 26초에 빨간색 화살표로 나타낸 peak는 CS와 비교하여 사라진 부분으로 염색체 1A에 암호화되어 있는 ω 1,2-글리아딘이다. 염색체 1B가 제거된 N1BT1A, N1BT1D와 CS를 비교한 결과 Fig. 2의 빨간색 화살표로 나타낸 25초에 peak가 사라진 것을 확인했다. 이는 염색체 1B에 암호화되어 있는 ω 5-글리아딘과 γ -글리아딘이다. 염색체 1D가 제거된 N1DT1A, N1DT1B와 CS를 비교한 결과는 Fig. 3에 나타났고, 24초, 25초, 26초에 나타난 총 세 개의 peak가 사라짐을 확인했고 빨간색 화살표로 나타냈다. 이는 1D에 암호화된 ω 1,2-, γ -글리아딘이다.

염색체 6A가 제거된 N6AT6B, N6AT6D 그리고 6AL을 CS와 비교하여 Fig. 4에 나타냈다. 사라진 피크는 22초, 25초, 26초에 빨간색 화살표로 표시된 peak들로 α - β -글리아딘이다. 염색체 6B가 제거된 N6BT6A와 6BL을 CS와 비교한 결과 Fig. 5의 빨간색 화살표로 나타냈듯이 24초, 25초와 26초에서 세 개의 peak가 사라졌고, 이들은 α - β -글리아딘이다. 염색체 6D가 제거된 N6DT6B와 6DL을 CS와 비교한 결과 6B와 똑같이 24초, 25초와 26초에서 세 개의 peak가 사라졌고, 이 또한 α - β -글리아딘이다(Fig. 6).

염색체 1B가 배가된 N1AT1B는 N1B에서 사라진 25초 peak가 CS보다 높게 나타났고(Fig. 1), 염색체 6B가 배가된 N6AT6B는 N6B에서 사라진 24초 peak가 높게 나타났(Fig. 4). 염색체 1D가 배가된 N1AT1D와 N1BT1D는 N1D에서 사라진 24초 peak는 높게 나타났지만 25, 26초 peak는 CS와 동일한 높이로 나타났(Figs. 1, 2). 염색체 1A와 1D가 ω 1,2-글리아딘을, 염색

Fig. 4. LabChip analysis of gliadin fractions of the CS and N6AT6B, N6AT6D, 6AL. The red arrows indicate the disappeared peaks. The green and black arrows mean the LM(Low marker) and Xsys(system peak) respectively.

Fig. 5. LabChip analysis of gliadin fractions of the CS and N6BT6A, 6BL. The red arrows indicate the disappeared peaks. The green and black arrows mean the LM(Low marker) and Xsys(system peak) respectively.

Fig. 6. LabChip analysis of gliadin fractions of the CS and N6DT6B, 6DL. The red arrows indicate the disappeared peaks. The green and black arrows mean the LM(Low marker) and Xsys(system peak) respectively.

체 1B와 1D가 γ -글리아딘을 만든다고 할 때, 각 염색체에 암호화 된 글리아딘이 서로 상이하기 때문에 24초에 나타난 peak처럼 배가된 1D가 더 높게 나타날 수도 있고, 1D가 배가되었지만 결손된 1A나 1B에 의해 글리아딘 단백질 양이 25초와 26초에 나타난 peak처럼 CS와 비슷하게 나타날 가능성도 있다. 1A가 배가된 N1BT1A도 N1A에서 사라진 26초 peak가 더 높게 나타나지 않고, CS와 비슷하게 나타났다. 이처럼 N1AT1B, N1AT1D, N1BT1D, N6AT6B와 같이 배가된 염색체에 의해 글리아딘 단백질 양이 CS보다 높게 나타날 수도 있고, 이를 제외한 나머지 돌연변이체들처럼 단백질의 양이 CS와 비슷하게 나타날 가능성도 있다.

LabChip은 최소 한 개의 샘플 분석을 기준으로 기존에 분석을 위해 사용하던 SDS-PAGE, 2-DGE, RP-HPLC 그리고 PCR 보다 최소 70배 이상 빠르다. SDS-PAGE는 젤을 제조하는 등 약 2시간의 전처리 시간과 전기영동 약 1시간이 소요되고, 2-DGE는 1차원 전기영동(Isoelectric focusing) 약 25시간과 약 23시간의 2차원 전기영동을 해야 하며, RP-HPLC는 전처리 시간포함 약 90분의 분석시간이 소요된다. DNA 표지 인자를 활용한 PCR 분석은 전기영동을 포함한 분석시간이 최소 약 3시간이 걸려 많은 수의 자원 분석이 어려우며, 현재 각 글리아딘의 유전자좌 특히 DNA 표지인자도 거의 없는 상황이다. 이에 비해 LabChip은 전처리 시간 20분과 샘플당 1분 이내의 분석시간으로 신속한 수단이다. 또한, 높은 재현성과 아주 적은 시료로 고감도 검출이 가능하고 작고 간단한 장비를 사용하여 휴대 가능하므로 실험실에만 국한된 다른 분석 수단보다 더 편리성을 제공한다는 장점이 있다. 하지만 한 번에 적은 시료를 분석할 경우 소모되는 용액이 대량의 시료를 분석할 때 소모되는 용액의 양과 같아서 소량의 시료를 분석할 경우에는 가격과 유지비가 높은 단점이 있다. 또한 LabChip 시스템을 이용하여 글루테닌 단백질의 동정이 가능하며(Rhazi et al. 2009) 밀 육종 현장에서 가공적성에 많은 영향을 미치는 HMW-GS와 LMW-GS의 고속 탐색에 응용 가능하리라 생각된다. 향후 분리 채널의 증가와 추출 과정의 변형을 통해 LabChip의 분해능 향상이 가능할 것이다.

본 연구에서는 LabChip과 CS의 주요 글리아딘이 없는 aneuploid 돌연변이를 이용 1분 이내에 주요 글리아딘 단백질을 고속 탐색하였다. 본 기술을 활용하여 많은 수의 유전자원과 육종 계통을 탐색한다면 기존의 방법보다 빨리 일부 글리아딘이 결손된 알리지 저감 밀을 선발할 수 있을 것이다.

적요

밀 글루테닌 단백질의 구성 성분인 글리아딘 단백질은 밀반죽에 점성과 신장성을 부여하여 가공적성에 많은 영향을 미치며, 셀리악병(Celiac disease, CD)과 밀 알러지의 중요한 항원으로 알려져 있다. 본 연구에서는 LabChip GXII Touch 24를 이용 샘플당 1분 이내에 6배체 밀 ‘Chinese Spring’ (CS)과 1번, 6번 염색체가 결손된 nullisomic-tetrasomic (NT) aneuploid 계통들과 ditelosomic (DT) aneuploid 계통들의 글리아딘 분해를 비교 분석하였다. CS와 1A, 1B, 1D 염색체가 결손된 그룹 1번 aneuploid 계통들(N1AT1B, N1AT1D; N1BT1A, N1BT1D; N1DT1A, N1DT1B)의 글리아딘 분해의 크로마토그래피 분석에서 ω 5-, ω 1,2-, γ -글리아딘으로 추정되는 CS의 24, 25, 26초의 피크가 사라졌다. CS와 6A, 6B, 6D 염색체가 결손된 그룹 6번 aneuploid 계통들(N6AT6B, N6AT6D, 6AL; N6BT6A, 6BL; N6DT6B, 6DL)의 분석에서는 α - β -글리아딘으로 추정되는 CS의 22, 25, 26초의 피크가 사라졌다. 본 연구 결과는 알리지 저감 밀 육성을 위해 많은 수의 육종 계통, 유전 자원 중에서 밀 저장단백질 돌연변이체를 고속 탐색하는데 유용하게 사용될 것이다.

사사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ012458) 및 농촌진흥청 차세대바이오그린 21사업(과제번호: PJ011021 및 PJ011057) 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

1. Banc A, Desbat B, Renard D, Popineau Y, Mangavel C, Navailles L. 2009. Exploring the interactions of gliadins with model membranes: Effect of confined geometry and interfaces. *Biopolymers* 91: 610-622.
2. Battais F, Courcoux P, Popineau Y, Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Denery-Papini S. 2005. Food allergy to wheat: differences in immunoglobulin E-binding proteins as a function of age or symptoms. *J Cereal Sci* 42: 109-117.
3. Brown JWS, Flavell RB. 1981. Fractionation of wheat gliadin and glutenin subunits by two-dimensional electrophoresis and the role of group 6 and group 2 chromosomes in gliadins synthesis. *Theor Appl Genet* 59: 349-359.

4. Burns MA, Burke DT, Johnson BN, DeNuzzio JD, Beyer JrWF. 2002. U.S. Patent No. 6,379,929. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
5. Cornish SL, Thompson ST, Wieman CE. 2006. Formation of bright matter-wave solitons during the collapse of attractive Bose-Einstein condensates. *Phys Rev Lett* 96: 170401.
6. Dziuba M, Nałecz D, Szerszunowicz I, Waga J. 2014. Proteomic Analysis of Wheat α /A-and β -Gliadins. *Czech J Food Sci* 32: 437-442.
7. Fido RJ, Bekes F, Gras PW, Tatham AS. 1997. Effects of α -, β -, γ - and ω -gliadins on the dough mixing properties of wheat flour. *J Cereal Sci* 26: 271-277.
8. Forde J, Malpica JM, Halford NG, Shewry PR, Anderson OD, Greene FC, Mifflin BJ. 1985. The nucleotide sequence of a HMW glutenin subunit gene located on chromosome 1A of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Nucleic Acids Res* 13: 6817-6832.
9. Ferranti P, Mamone G, Picariello G, Addeo F. 2007. Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease. *J Mass Spectrom* 42: 1531-1548.
10. Gupta RB, MacRitchie F, Shepherd KW, Ellison F. 1990. Relative contribution of LMW and HMW glutenin subunits to dough strength and dough stickiness of bread wheat. *Gluten proteins* 71-80.
11. Gupta RB, Shepherd KW. 1990. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutelin. *Theor Appl Genet* 80: 183-187.
12. Harrison DJ, Fluri K, Seiler K, Fan Z, Effenhauser CS, Manz A. 1993. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip. *Science (New York then Washington)* 261: 895-895.
13. Khatkar BS, Fido RJ, Tatham AS, Schofield JD. 2002. Functional properties of wheat gliadins: 1. Effects on mixing characteristics and bread making quality. *J Cereal Sci* 35: 299-306.
14. Manz A, Harrison DJ, Verpoorte EM, Fettingner JC, Paulus A, Lüdi H, Widmer HM. 1992. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: capillary electrophoresis on a chip. *J Chromatogr A* 593: 253-258.
15. Mathies RA, Glazer AN, Woolley AT, Lao K. 2000. Electrochemical detector integrated on microfabricated capillary electrophoresis chips. U.S. Patent No. 6,045,676. 4 Apr.
16. Matsuo H, Kohno K, Morita E. 2005. Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of ω -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Febs J* 272: 4431-4438.
17. Matsuo H, Morita E, Tatham AS, Morimoto K, Horikawa T, Osuna H, Ikezawa Z, Kaneko S, Kohno K, Dekio S. 2004. Identification of the IgE-binding epitope in ω -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Biol Chem* 279: 12135-12140.
18. Morita E, Matsuo H, Mihara S, Morimoto K, Savage AWJ, Tatham AS. 2003. Fast ω -gliadin is a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci* 33: 99-104.
19. Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Koivuluhta M, Mikkola J, Keskinen H, Kalkkinen N, Reunala T. 1999. A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 103: 912-917.
20. Palosuo K, Varjonen E, Kekki OM, Klemola T, Kalkkinen N, Alenius H, Reunala T. 2001. Wheat ω -5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J Allergy Clin Immunol* 108: 634-638.
21. Payne PI, Holt LM, Law CN. 1981. Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. *Theor Appl Genet* 60: 229-236.
22. Payne PI, Lawrence GJ. 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res Commun* 11: 29-35.
23. Payne PI. 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Annu Rev Plant Physiol* 38: 141-153.
24. Quisenberry KS, Reitz LP. 1967. Wheat and wheat improvement. American Society of Agronomy. Inc. Madison, US.
25. Rhazi L, Bodard AL, Fathollahi B, Aussenac T. 2009. High throughput microchip-based separation and quantitation of high-molecular-weight glutenin subunits. *J Cereal Sci* 49: 272-277.
26. Shewry, Peter R, Johnathan A. Napier, Arthur S Tatham. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell Online* 7: 945-956.
27. Singh NK, Shepherd KW. 1988. Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. *Theor Appl Genet* 75: 628-641.
28. Sollid LM, Qiao SW, Anderson RP, Gianfrani C, Koning F. 2012. Nomenclature and listing of celiac disease relevant

- gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics* 64: 455-460.
29. Tye-Din JA, Stewart JA, Dromey JA, Beissbarth T, van Heel DA, Tatham A, Henderson K, Mannering SI, Gianfrani C, Jewell DP, Hill AVS, McCluskey J, Rossjohn J, Anderson RP. 2010. Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med* 2: 41.
30. Vader W, Kooy Y, van Veelen P, de Ru A, Harris D, Benckhuijsen W, Pena S, Mearin L, wouter Drijfhout J, Koning F. 2002. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterol* 122: 1729-1737.
31. van Herpen TW, Goryunova SV, van der Schoot J, Mitreva M, Salentijn E, Vorst O, Schenk MF, van Veelen PA, Koning F, van Soest LJ, Vosman B, Hamer RJ, Gilissen LJWJ, Smulders MJM. 2006. Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. *BMC genomics* 7: 1.
32. Wieser H. 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* 24: 115-119.
33. Wrigley CW, Shepherd KW. 1973. Electrofocusing of grain proteins from wheat genotypes. *Ann N Y Acad Sci* 209: 154-162.