

FEHÉRJÉK IZOELEKTROMOS FOKUSZÁLÁSÁNAK ELVE ÉS ALKALMAZÁSA VÉKONYRÉTEGŰ POLIAKRILAMID GÉLBEN

TÖRÖK ATTILLÁNÉ DR.*

Az izoelektromos fókuszálás az utóbbi években gyors fejlődésnek lendült, széles körben vizsgált módszere a biokémiai kutatásoknak. Főleg a fehérjeanalitika területén vált fontos és eredményes eszközzé, mivel amfolitok — mint pl. fehérjék, peptidok — analitikai, ill. preparatív elválasztását teszi lehetővé, a komponensek izoelektromospontbeli különbözősége alapján (1, 2).

Széles körű alkalmazását indokolja, hogy a legkülönbözőbb típusú fehérjék és enzimek vizsgálatára felhasználható, viszonylag egyszerű eszközökkel megvalósítható, analitikai feloldóképessége igen jó. Ezenkívül egyazon kísérleten belül elvégezhető az elválasztás és az izoelektromos pont meghatározása is, amely a molekulasúly mellett a fehérjéknek egy másik igen fontos fiziko-kémiai jellemzője.

Az elválasztás lényege egy olyan rendszer, amelyben elektromos feszültségkülönbség áll fenn, valamint a pozitív és a negatív pólus között a pH folytonosan és egyenletesen növekszik, vagyis egyidejűleg van jelen feszültség gradiens és pH gradiens. Ha az így létrehozott rendszerben elhelyezünk egy olyan fehérjét, amelynek izoelektromos pontja a pH gradiens pH tartományán belül van, akkor az egyes fehérje molekulák elektromos töltésre tesznek szert. A molekula kifelé mutatott össztöltésének jellegét két tényező szabja meg: az egyik a fehérje molekula saját izoelektromos pontja, a másik pedig az a pH, amely ahhoz a helyhez tartozik, ahol a molekula az adott pillanatban tartózkodik. Az ily módon töltéssel rendelkező részecske az elektromos erőter hatására elmozdul a rendszerben a megfelelő pólus felé. Elmozdulása közben az eredetitől eltérő pH-jú közegen halad át, amelynek eredményeképpen a molekula töltése is pontról pontra változik, egészen addig, amíg nettó töltése zéróvá nem válik. Ez a rendszernek azon helyén következik be, ahol a pH a molekula izoelektromos pontjával megegyezik. Erről a pontról a molekula a továbbiakban már nem mozdul el. Ily módon a fehérjék a rendszer bármely pontjáról arra a helyre összpontosíthatók, amellyel izoelektromosak. Ezután a rendszer ezen helyének pH-ját meghatározva, megkapjuk az elválasztott fehérjekomponens izoelektromos pontját.

Mivel az összpontosítást, vagyis a fókuszálást az elektromos tér hozza létre, a folyamatot izoelektromos fókuszálásnak nevezik.

Fenti alapelv gyakorlati alkalmazásához két alapvető feltételt kell megvalósítani:

1. alkalmas pH gradiens létrehozása,
2. a rendszer stabilizálása áramlás, keveredés és minden olyan nemkívánatos mozgás ellen, amely a kialakult pH gradienst, ill. a már fókuszált fehérjesávokat újra elegyíti.

* Kémia Tanszék

1. A pH gradiens kialakítása

Szemben az elektroforézises eljárásokkal, amelyeknél valamely pufferoldat által biztosított állandó pH-t alkalmazunk, az izoelektromos fókuszálás alapja, — amint erről az előzőekben szó volt — egy olyan rendszer, amelyben a pH egyenletesen változik az anód és a katód között, emellett egyenletes és jó vezetőképességgel, valamint kielégítő pufferkapacitással rendelkezik.

Hosszas kísérletezés után svéd kutatók szintetizáltak olyan vegyületsorozatot, amely a fenti, elméleti úton megállapított feltételeknek megfelel, majd ipari méretekben történő előállítását is megoldották (3). A kereskedelemben „Ampholine” elnevezéssel kerül forgalomba (LKB-Produkter, A. B., Bromma, Sweden.), és ezideig az egyetlen alkalmas rendszernek tekinthető, bár történtek kutatások hasonló anyagok létrehozására (4). Az „Ampholine” tulajdonképpen kis molekulású (300—600) amfolitok — alifás poliamino-polikarbonsavak — keveréke, amelyben a komponensek izoelektromos pontjai az egész kívánt pH tartományt felölelik, és egymástól csak egy-két század pH egységben különböznek. A pH gradiens azáltal jön létre, hogy elektromos áram hatására a komponensek izoelektromos pontjaik sorrendjében helyezkednek el és így a gradiens minden egyes pontját egy izoelektromos állapotban levő amfolit alkotja. Az így kialakult gradiens hosszú ideig stabilis marad, ha a rendszer egyébként áramlás és keveredés ellen stabilizálva van. A pH gradiens profilját az amfolit komponensek száma, relatív mennyiségük, pufferkapacitásuk és izoelektromos pontjaik határozzák meg.

A pH gradiens feloldóképessége

Ezen azt a Δ pH értéket értjük, amellyel két, egymástól még elválasztott fehérjefrakció izoelektromos pontja különbözik. A pH gradiens feloldóképessége függ az alkalmazott feszültség által létrehozott télerősségtől (E), a gradiens meredekségétől (dpH/dx), az elválasztandó komponensek töltésviszonyaitól és diffúziós állandójától. A feloldóképességet egy adott kísérletnél tehát csak a télerősség és a pH gradiens meredekségének változtatásával tudjuk befolyásolni, mivel az elválasztandó fehérje tulajdonságai a diffúziós állandót és az egyéb tényezőket megszabják. Nagy molekulájú fehérjék esetében, amelyeknek diffúziós állandója kicsi, jobb elválasztás érhető el azonos körülmények között, mint kisebb molekulású fehérjék esetében. Kísérleti adatok szerint, ha az egyes fehérjék izoelektromos pontja 0,02 pH egységgel különbözik, már sikeresen elválaszthatók (1, 5).

Az izoelektromos pont értéke függ a hőmérséklettől. A hőmérséklet függés mértéke azonban nem azonos az egyes fehérjékre nézve. Így nem lehet az izoelektromos pontok értékét átszámolni egyik hőmérsékletről a másikra. Ezért a pH mérésnek mindig azon a hőmérsékleten kell történnie, amelyen az izoelektromos fókuszálás végbement, és ezt a hőmérsékletet közölni kell az izoelektromos pont értékének megadásánál (6).

2. Áramlás elleni stabilizáció

Az izoelektromos fókuszálás gyakorlati kivitelezésének másik fontos feltétele, az elektrolit rendszer stabilizálása nem kívánatos áramlás, újra keveredés ellen. Ez több módon megvalósítható. A legrégebb és ma is igen elterjedt a sűrűség gradiens rendszer, amelyet elektromosan semleges anyaggal, egy függőleges oszlopban hoznak létre — rendszerint szaharóz, vagy olyan nem ionos anyag oldatával, amely a

vizsgálható fehérjével nem lép kölcsönhatásba. Másik lehetőség a géllal történő stabilizálás, amelyhez alkalmazható polimerizált gél vagy granulált gél, mind oszlop, mind vékonyréteg formájában.

Egyetlen stabilizáló közeg sem mentes azonban bizonyos mellékhatásoktól. Mivel a közeg sokkal nagyobb koncentrációban van jelen, mint a vizsgálható minta, adszorpció következtében veszteségek léphetnek fel.

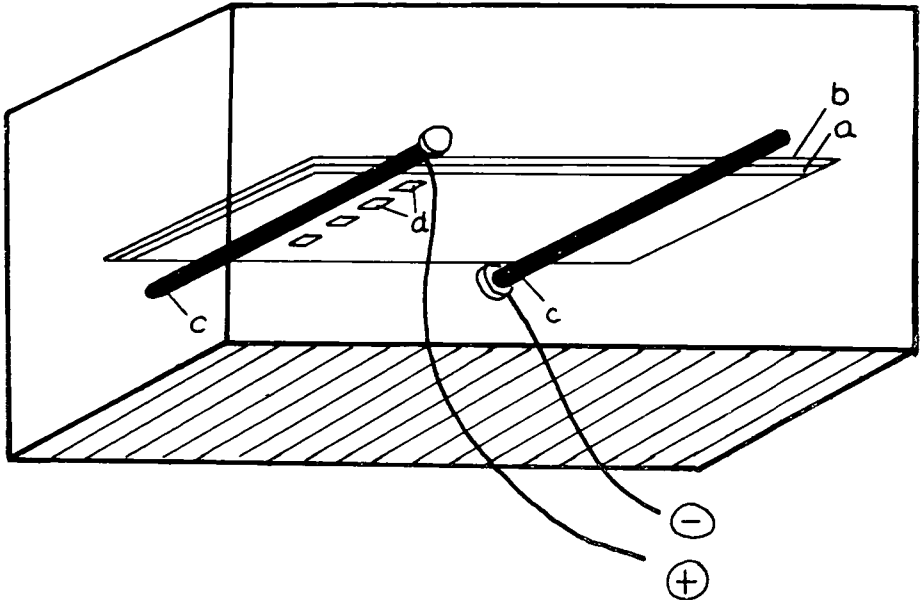
A stabilizáció módszerétől függően az izoelektromos fókuszálás kivitelezése, az elválasztott fehérjeminták értékelése és a pH meghatározás módja igen eltérő.

A sűrűség gradienssel történő stabilizációs módszer az izoelektromos fókuszálással egyidejűleg alakult ki (5). Jó elválasztást és pontos izoelektromos pont meghatározást eredményez, azonban korlátozó tényezői vannak. Költséges berendezést igényel (hűthető oszlop, átfolyó-küvettás fotométer, frakciószedő). Az oszlop üritése közben a már elválasztott komponensek keveredhetnek, egyes fehérjék az izoelektromos pontjuknál bekövetkező instabilitás miatt kicsapódhatnak, ami zavarja az elektromos transzportot. A fókuszálási idő hosszú (2—3 nap), tehát egyetlen elválasztás végrehajtása is anyag- és munkaigényes.

A pH gradiens stabilizálásának másik lehetősége gél alkalmazása (7). Legelterjedtebben poliakrilamid gél használatos. A gél stabilizálás előnyei: az elválasztott komponensek újra keveredésének veszélye nem áll fenn, mivel a fókuszálás befejezése után a gél és ezáltal a fehérjék helyzete azonnal rögzíthető. A készülék rendkívül egyszerű. A szükséges Ampholine mennyisége igen kevés. Több minta fókuszálása történhet egyidejűleg. Egybekapcsolható más eljárásokkal, pl. immuno-elektroforézissel. Ezen jelentős előnyök mellett hátrányai is vannak: a polimerizációhoz szükséges katalizátor kedvezőtlen hatást fejthet ki. A gélben történő pH meghatározása körülményesebb. Bár a gél molekulaszűrő hatása a módszerben nem játszik szerepet, nagyobb molekulású fehérjék mozgását gátolhatja a gél porozitása. A gél utókezelése — fixálás, festés, mosás, denzitometrállás elég sok időt vesz igénybe. Analitikai jellegű elválasztást tesz lehetővé, tehát preparatív munkára nem alkalmas.

A vékonyrétegű poliakrilamid gélben történő izoelektromos fókuszálás végrehajtása igen egyszerű eszközökkel megoldható (8, 9, 10). A poliakrilamid gél polimerizációja két, igen gondosan megtisztított üveglap között megy végbe, amelyek egymástól 1—1,5 mm távolságra vannak. Az Ampholine oldatot rendszerint már a polimerizáció előtt belekeverjük a gélbe, s riboflavint alkalmazunk katalizátorként. Az oldat poliakrilamid koncentrációja 5%-os, Ampholine koncentrációja 2%-os. A polimerizáció természetes fény vagy UV sugárzás hatására két óra alatt tökéletesen végbemegy. Az elkészített vékonyrétegű gél azonnal felhasználható, vagy +4 °C-on tárolható, védve a kiszáradástól. Az 1%-os fehérje oldatokból 10—20 μ l-t alkalmazunk 1×1 cm-es Whatman 3 MM szűrőpapír kockákon, amelyeket közvetlenül a gél tetejére helyezünk. A gél rövidebb oldalain, az elektródáknak megfelelő helyre két db 1 cm széles szűrőpapír csíkot helyezünk, az anódos oldalnál 5%-os foszforsavval, a katódos oldalnál 5%-os etiléndiaminnal megnedvesítve. Az elektród legtöbb esetben két grafitrúd, de alkalmazható rozsdamentes acélelektrod is. A két elektród egy műanyag doboz két oldalfala közé rögzíthető. A géltreget hordozó üveglapot a géltreteggel lefelé fordítva helyezzük rá az elektródákra. A doboz aljába kevés desztillált vizet öntünk, a gél nedvességtartalmának egyensúlyban tartására. Az izoelektromos fókuszálást 4 °C-os laboratóriumban célszerű végrehajtani, éppúgy, mint a fókuszálást követő pH mérést. 18 cm-es elektródtávolság esetében 20 mA áramerősséget alkalmazunk, amely a kísérlet végére, 16 óra elteltével 2 mA-re csökken.

A pH mérés azonnal a fókuszálás befejezése után következik. A legpontosabb módja, ha a pH-t közvetlenül a gélen, egy kombinált mikro-felszíni elektródával mérjük, a két elektróda közötti távolság mentén cm²-enként. Ez könnyen megvalósítható, ha az átlátszó gélréteg alá beosztással ellátott papírt helyezünk. Ezt követően a réteget 10%-os triklórecetsavba merítjük, amely az elválasztott fehérjesávok



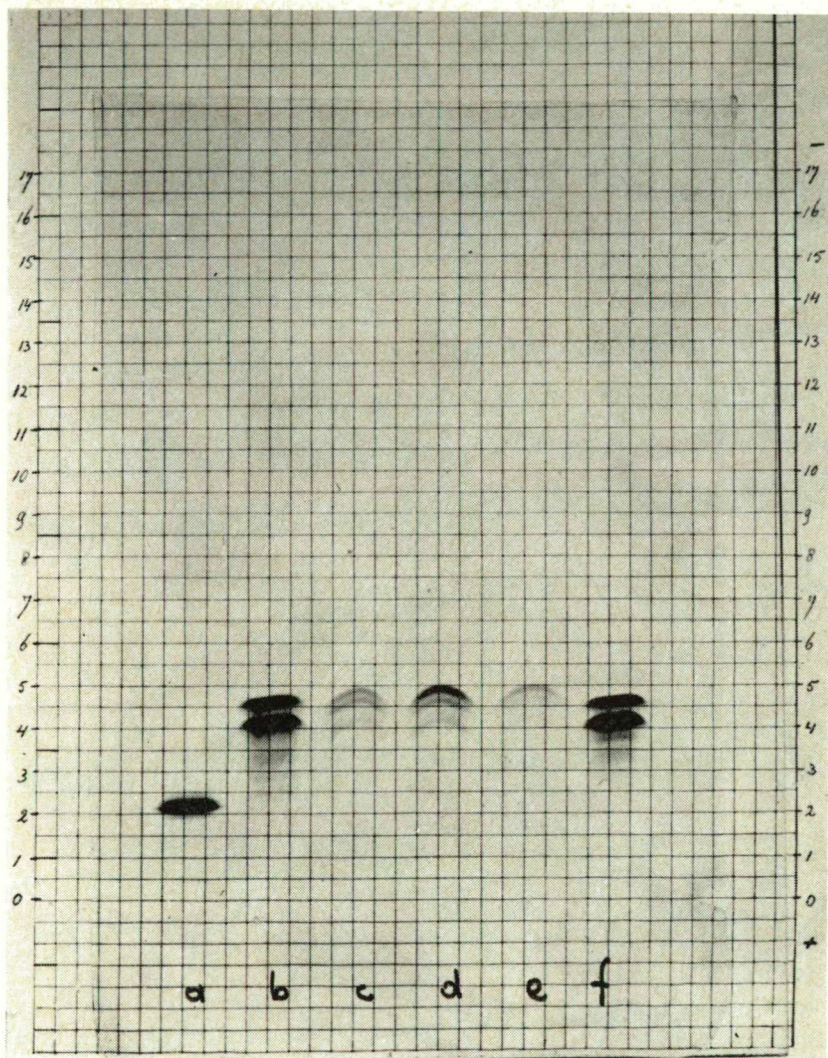
1. ábra

1. ábra. Vékonyrétegű poliakrilamid gélben történő izoelektromos fókuszálás kivitelezése
a: gélréteg, b: üveglap, c: grafit elektródák, d: szűrőpapír kockák

rögzítését és az Ampholine komponensek eltávolítását szolgálja. A triklórecetsav eltávolítása metanol-ecetsav-víz 45:9:46 arányú elegyével történik. A festés Coomassie Brilliant Blue R 250 0,05%-os oldatával végezhető a leghatékonyabban. A háttér festékmentesítése szintén a fenti szerves oldószerkeleggyel történik. Ha a festési és mosási eljárások folyamán a gél méretében változás következne be, 7%-os ecetsav oldattal duzzasztható eredeti méretére. Az így megfestett fehérjesávok izoelektromos pontjait úgy állapítjuk meg, hogy a gél ismét ráhelyezzük a beosztott papírra és megmérjük az egyes sávok elektródáktól mért távolságát. A pH mérések adataiból készített grafikonról leolvasható a megfelelő távolságokhoz tartozó izoelektromos pont.

Egyidejűleg 6—8 minta futtatható azonos körülmények között, így közöttük közvetlen összehasonlítás végezhető. A vékonyréteg hűtése az oszlophoz viszonyítva intenzívebb, így a feszültség növelhető, amely a fókuszálás idejét lerövidíti.

Az ismertetett módszert alkalmaztuk élelmiszerfehérjék és különböző enzimek izoelektromos pontjának meghatározására (11). A 2. ábra ovalbumin (a), különböző oltóenzimek (b, c, d, e) és β -laktoglobulin (f) izoelektromos fókuszálással elválasztott sávjait mutatja. A gélréteg lefényképezése az elektródák közötti távolságot feltüntető négyzethálós papírral együtt történt.



2. ábra

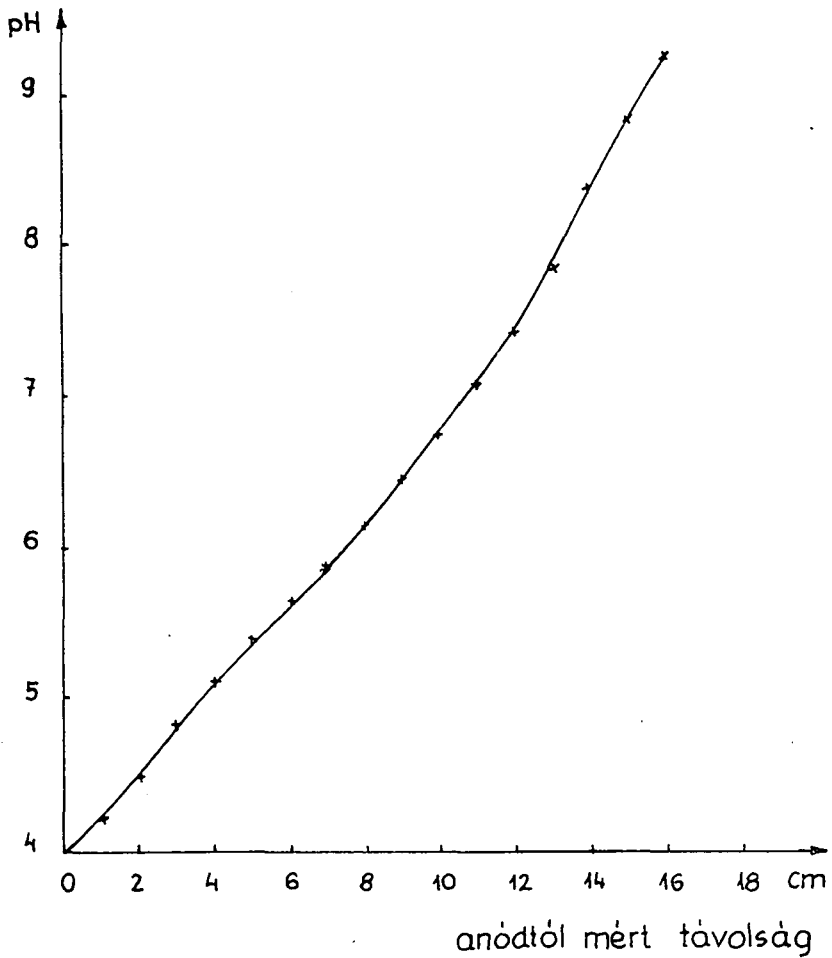
2. ábra. Vékonyrétegű poliakrilamid gélben fókuszált minták

A 3. ábra ugyanezen poliakrilamid gélréteg pH értékeit mutatja az elektródák közötti távolság függvényében, amelyről a megfestett fehérjesávok izoelektromos pontja leolvasható.

Számos irodalmi adat mellett (1, 10, 12) az itt közölt ábra is bizonyítja a vékonyrétegű poliakrilamid gélben történő izoelektromos fókuszálás magas feloldóképességét. A vizsgált fehérje fő komponensei mellett kimutatja azokat a mikroheterogenitásokat is, amelyeket az egymástól csak egy-két ionizált csoportban eltérő molekulák okoznak (13). Sok esetben, más eljárásokkal (elektroforézis, immunoelektroforézis)

homogénnek bizonyuló minták ezúton további komponensekre bonthatók (12). Mindez a vizsgált fehérje tulajdonságainak részletesebb megismerését biztosítja.

Az ismertetett eljárás által nyújtott eredmények új lehetőséget biztosítanak az élelmiszerkutatók területén belül is a fehérjék mélyreható tanulmányozására és átalakulási folyamatainak követésére.



3. ábra

3. ábra. A gélrétegben meghatározott pH gradiens

IRODALOM

1. Vesterberg, O.—Svensson, H.: Acta Chem. Scand. 20, 820 (1966).
2. Haglund, H.: Methods of Biochemical Analysis (Ed. Glick, D.). Vol. 19, I. John Wiley and Sons, New York. (1971).
3. Svensson, H.: Acta Chem. Scand. 16, 456 (1962).
4. Vinogradov, S. N.—Lowenkron, S.—Andonian, M. R.—Bagshaw, J.: Biochemical and Biophysical Research Communications 54, 501 (1973).

5. *Vesterberg, O.*: Methods in Enzymology (Ed. Jacoby, W. B.). Vol. 22, 389. Academic Press, London and New York. (1971).
6. *Beeley, J. A.—Stevenson, S. M.—Beeley, J. G.*: Biochim. Biophys. Acta 285, 293 (1972).
7. *Wrigley, C. W.*: Science Tools 15, 17 (1968).
8. *Vesterberg, O.*: Biochim. Biophys. Acta 257, 11 (1972).
9. *Bours, J.*: J. Chromatogr., 60, 225 (1971).
10. *Söderholm, J., Allestam, P., Wadström, T.*: FEBS Letters 24, 89 (1972).
11. *de Koning, P. J.—Török, E.*: Közlés alatt.
12. *Bours, J.*: Dissertation, Univ. of Utrecht. 1974.
13. *Beeley, J. G.*: Biochim. Biophys. Acta 230, 595 (1971).

PRINCIPLE AND APPLICATION OF ISOELECTRIC FOCUSING OF PROTEINS IN THIN LAYER POLYACRYLAMIDE GEL

É. Török

An account is given of the basic principles of the isoelectric focusing of proteins, and of the conditions necessary for its carrying-out in practice. A detailed description is provided of the application of the method in thin-layer polyacrylamide gel, the advantages of this over other methodological solutions, and also the limiting factors. Experimental examples are presented to demonstrate the applicability of the procedure for the examination of foodstuff-proteins.

PRINZIP UND ANWENDUNG DES ISOELEKTRISCHEN FOKUSSTANDES VON EIWEISSEN IM DÜNNSCICHT POLYAKRYLAMID GEL

É. Török

Es werden die prinzipiellen Grundlagen des isoelektrischen Fokusstandes der Proteine und die zur Verwirklichung in der Praxis erforderlichen Bedingungen erörtert. Ausführlich geschildert werden die Anwendung der Methode in Dünnschicht-Polyakrylamid-Gel, ihre Vorteile anderen methodischen Lösungen gegenüber sowie auch die einschränkenden Faktoren. Anhand experimenteller Beispiele wird die Anwendbarkeit des Verfahrens beim Studium von Lebensmitteleiweissen demonstriert.

ПРИНЦИП ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ БЕЛКОВ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ТОНКОСЛОЙНОМ ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Д-р Э. Төрök

Автор знакомит с основами изоэлектрического фокусирования белков и условиями, необходимыми для его практического осуществления. Подробно описывается применение этого метода для тонкослойного полиакриламидного геля, его преимущества по сравнению с другими методическими решениями, а также ограничивающие его факторы. На основе опытного примера показывается применимость этого метода для изучения пищевых белков.