

# Újabb módszer fehérje PAGE ferogramok ezüst színezésére

HORVÁTHNÉ ALMÁSSY KATALIN

Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Élelmiszeripari Főiskolai Kar, Szeged

Érkezett: 1986. május 15.

Napjainkban a korszerű fehérjeanalitikai metodikák széles skálája áll a tudományos kutatás és a gazdasági termelés legkülönbözőbb területein a fehérjék vizsgálatával foglalkozó szakemberek rendelkezésére. Az eljárásokat műszeres-analitikai mérési elvük alapján csoportosíthatjuk. Eszerint megkülönböztethetünk spektrofotométer segítségével elvégezhető vizsgálatokat (kolorimetriás, spektrofotometriás, turbidimetriás és fluorimetriás mérések), elektroforetikus módszereket, kromatográfiás eljárásokat és ultraszűrésen alapuló módszereket.

Fentiek közül elsősorban rendkívüli felbontóképessége minimális anyagigénye, viszonylag gyors kivitelezhetősége és az egyszerre párhuzamosan vizsgálható minták nagy száma következtében a poliakrilamid-gél elektroforézis (PAGE) egyre kiemelkedőbb jelentőségű.

## 1. A poliakrilamid-gél elektroforézis módszereinek áttekintése

A poliakrilamid, az akrilamid és az N,N'-metilén-biszakrilamid térhálós szerkezetű polimerizációs terméke. A PAGE általában valamennyi fehérje elválasztására és analizésére alkalmas. Azonos jó eredménnyel szeparálhatók neutrális, bázikus vagy savanyú karakterű fehérjék, mivel pedig maga a poliakrilamid-gél teljesen inert, nem változtatja meg az elválasztandó fehérjemolekulák natív tulajdonságait (1).

Az utóbbi másfél évtizedben a PAGE különböző alaptípusait fejlesztették ki, melyek a következők:

- Savas közegű poliakrilamid-gél elektroforézis (APAGE) (2),
- Nátrium-dodecilszulfátos, lúgos közegű poliakrilamid-gél elektroforézis (SDS PAGE) (3),
- Izoelektromos fókuszálás poliakrilamid-gélben (IF PAGE) (4).

Mindhárom vizsgálati eljárás lényege, hogy a megfelelően előkészített poliakrilamid-gélbe felvitt minta fehérjei elektromos egyenfeszültség hatására vándorolnak a részecskével ellentétes töltésű pólus felé. A polipeptidek szeparálódása az APAGE és az SDS PAGE rendszerében molekulatömeg szerint történik. Az IF PAGE-nél a fehérjemolekulákra a gél molekulaszűrő hatást nem fejt ki – ilyen a pórrendszer –, hanem a gélben kialakult egy kontinuus pH gradiens sorozat, s az elektromos térben a polipeptidek addig vándorolnak, míg az izoelektromos pontjukat megfelelő pH-jú helyig el nem érnek. Itt kicsapódnak, mozgékonyáguk gyakorlatilag nullára csökken. Az azonos izoelektromos pontú fehérjék azonos sávban akumulálódnak.

Az utóbbi időben a felbontás további javítására az egyes PAGE fehérje-elválasztási eljárásokat kombinálták. Így létrejött a kétdimenziós poliakrilamid-gél elektroforézis. Típusai a fenti rövidítésekkel jelölve a következők:

- |                         |   |                          |
|-------------------------|---|--------------------------|
| – APAGE (I. dimenzió)   | – | SDS PAGE (II. dimenzió), |
| – IF PAGE (I. dimenzió) | – | SDS PAGE (II. dimenzió). |

## 2. A fehérjesávok detektálásának lehetőségei poliakrilamid-gélben

A vonalgazdag fehérjespektrumok előhívása, azaz láthatóvá tétele több módon lehetséges:

- A színezés amidofeketével a legrégebbi, a papírelektroforézis technikájából átvett eljárás, ma már kevésbé használatos, mert nem eléggé érzékeny.
- Napjainkban legelterjedtebb módszer a Coomassie Brilliant Blue R-250-nel, illetve G-250-nel, vagy ezekkel analóg kémiai szerkezetű, de más fantázianevű színezékekkel történő előhívás.
- Az elválasztandó fehérjéket jelezhetjük radioizotóppal, pl. 35 S izotóppal (5), s a fehérjemintázatot a radioaktivitás mérésével detektálhatjuk az elektroforézis után.
- A színezés legújabb módja az úgynevezett ezüst színezés, mely előnyös tulajdonságai miatt egyre nagyobb teret hódít a PAGE technikában.

A felsorolt detektálási módszerek között elsősorban a kimutatás érzékenységeiben van különbség. A gyakorlatban az egydimenziós PAGE esetében leginkább a Coomassie Brilliant Blue R és G 250 használatos. Ha azonban a kombinált, két-dimenziós elektroforézissel dolgozunk, a kimutatandó fehérjemennyiség gyakran csak néhány tíz nanogram, így a szakirodalom szerint a csak mikrogram mennyiségű fehérjét érzékelő első három detektálási eljárás nem eléggé érzékeny a teljes szeparátumskála láthatóvá tételére.

A fentiek alapján foglalkoztunk az ezüst színezés technikai kivitelezhetőségével.

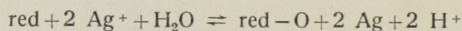
## 3. Ezüstszínezés fehérjék előhívására

Az ezüstszínezést a poliakrilamid-gél elektroforézis gyakorlatában az utóbbi 5-6 évben dolgozták ki, s ma már világviszonylatban kiterjedt szakirodalma van. Többféle változatát is kidolgozták, de az ezüst proteinekhez való kötődésének pontos mechanizmusát máig sem sikerült tisztázni.

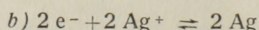
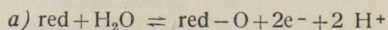
A fehérjék ezüsttel történő előhívásának ismereteink szerint két alpmódszere alakult ki.

*Fehérjék ezüst színezése „bevitt” aldehid-csoportok segítségével*

A Tunan és Johannson által leírt módszer (6) kivitelezése úgy történik, hogy a fixált, SDS PAGE esetén a Na-dodecilsulfáttól kimosott ferogramot glutár-dialdehid oldatban áztatják. Ekkor aldehid-csoportok kapcsolódnak a polipeptid-láncokra. A glutár-dialdehid feleslegét vizes mosással eltávolítva megfelelő lúgos ezüst oldatba kerül a gél. Az oldatból az  $Ag^+$  ionok az aldehid-csoportokon adszorbeálódnak, majd redukálódnak. Ezáltal válnak láthatóvá a fehérjesávok. A szerzők szerint a színezés bruttó folyamata a következő:



A folyamat lépésekre bontva



*Ezüstszínezés Ag - fehérje komplexen keresztül*

Az eljárás azon alapszik, hogy a polipeptidekben eredetileg is vannak olyan kémiaiilag aktív centrumok, amelyek az ezüst ionokkal komplexet képeznek. Az



így megkötött  $\text{Ag}^+$  ionokat azután különféle redukálószerrel sötét színű, koloidális eloszlású fémezüstté lehet alakítani.

E módszert írják le többek között Sammons és munkatársai (7,10) Wray és munkatársai (8), Oakley és munkatársai (9) stb. Az eljárások mindegyike különleges vegyszerminőséget, hosszú időt és nagy körültekintést igényel.

#### 4. Saját módszer a PAGE fehérjespektrumok ezüsttel törtéző detektálására

Búzafehérjék vizsgálatához laboratóriumunkban reprodukálni próbáltuk a fent említett, Sammons és munkatársai (1981) (7) által leírt eljárást. Ez viszonylag könnyen kivitelezhetőnek tűnt. A kapott mintaalap-fehérjespektrum és háttér egyaránt – teljesen befeketedett. A fehérjesávok nyomai sem tűntek elő. Feltevézésünk szerint ennek oka a nem megfelelő vegyszerminőség volt. Célul tűztük tehát ki, hogy a módszert úgy módosítsuk, hogy a mi körülményeink között is használható gélképet kapjunk.

Vizsgálatainkat lúgos közegű SDS PAGE rendszerben végeztük. Megtartva a Sammons (13) által leírt géllap előkészítést, új redukáló közeget alakítottunk ki (11), (12), (13), (14), amely viszonylag gyorsan, kevés közbeeső segédművelettel a gélben megkötött összes  $\text{Ag}^+$  iont redukálja. A fehérjéhez nem kötött redukált ezüst ezután Na-tioszulfát oldattal eltávolítható és megmarad az előhívott fehérjemintázat. A sávok színe általában barnásfekete. A reakciókörülményeket standardálva jól reprodukálható az eredmény.

#### A vizsgálathoz szükséges anyagok

*Fehérjekicsapó és SDS kimosó fürdők:*

etanol – ecetsav – desztillált víz (50 : 10 : 40)	(A),
etanol – ecetsav – desztillált víz (25 : 10 : 65)	(B),
etanol – ecetsav – desztillált víz (10 : 0,5 : 89,5)	(C).

*Equilibráló oldat:*

ezüstnitrát-oldat (1,9 g/cm<sup>3</sup>) (D).

*Előhívó oldat:*

1 dm <sup>3</sup> -hez	25 g nátrium-szulfit x 7 H <sub>2</sub> O	
	5 g amidol	
	1 g kálium-bromid	(E).

*Ezüst kimosó oldat:*

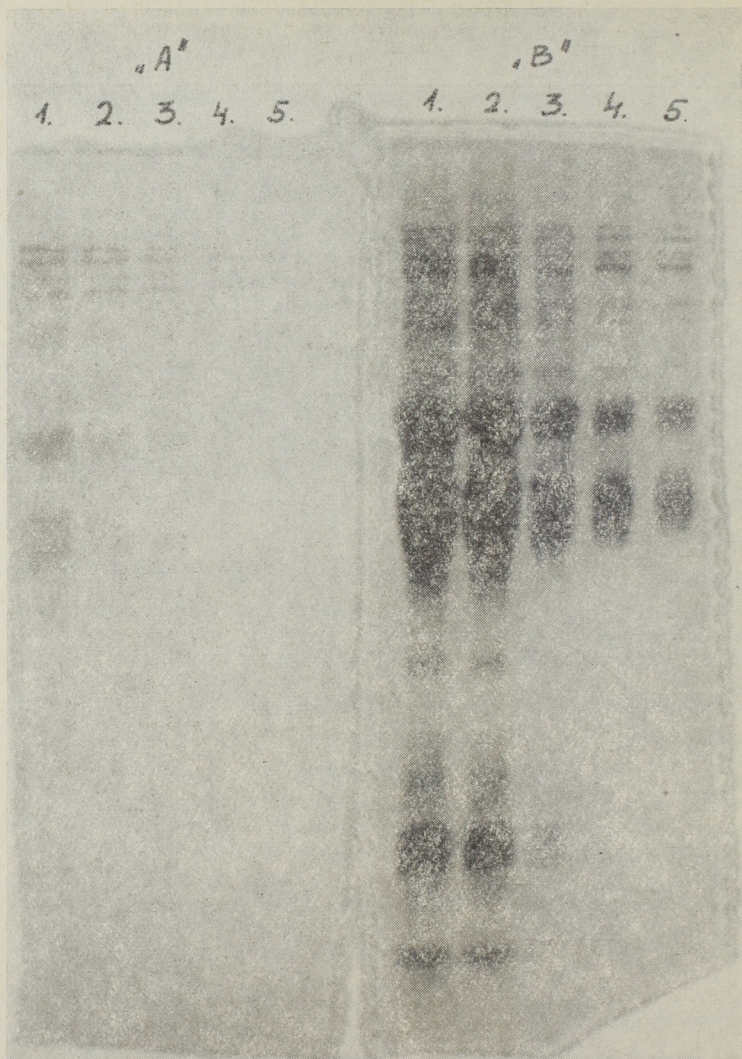
1 dm <sup>3</sup> -hez	80 g nátrium-tioszulfát x 5 H <sub>2</sub> O	
	8 g kálium-piroszulfit	(F).

*Lemosó oldat:*

1 tf %-os ecetsav (G).

#### Az eljárás leírása

Az elektroforézis befejeztével a géllapot 2×1 órán át az (A) oldatban, majd 2×1 órán át a (B) oldatban áztatjuk. Egy-egy óra eltelte után a folyadékot frissel lecseréljük. Végül fél óráig a (C) oldatban tartjuk. Az ezüst adszorbeáltatása a (D) oldatban történik 1 órán keresztül. Ezt igen rövid desztillált vizes öblítés követi, majd beletesszük a gélét a frissen készített (E) előhívóba. A fehérjesávokon kötött ezüst nehezebben redukálódik, mint a nem kötött, ezért a kép először negatívan jelenik meg. A hívás során azonban az átlátszó fehérje csíkok sötétednek, végül megjelenik a viszonylag sötét háttérben a jól látható pozitív kép. Amikor



7. ábra: Az általunk kidolgozott ezüst színezési eljárás és a Coomassie Brillant Blue R-250-nel történő detektálás érzékenységének összehasonlítása („A” 1-5. CBB 250 R-rel előhívott minták, „B” 1-5. ezüsttel előhívott minták)  
 Összfehérje mennyiségek: 1.: 80  $\mu\text{g}$ ., 2.: 40  $\mu\text{g}$ ., 3.: 10  $\mu\text{g}$ ., 4.: 1  $\mu\text{g}$ ., 5.: 0,2  $\mu\text{g}$ .  
 Vizsgált búzafehérje: GK Tiszatáj glutenin frakciója  
 Módszer: Nátrium-dodecyl-szulfátos poliakrilamid-gél elektroforézis.



a sávok színmélysége már nem nő, a lapot a (G) oldattal és vízzel leöblítjük és az (F) fixáló oldatba tesszük. A háttér hamarosan világosodni kezd. (Az egyenletes érintkezést az oldattal úgy biztosítjuk, hogy a kádat rázógépen rázatjuk.) A művelet közben a gélt néhányszor az (F) oldatból kiemeljük és 40–50 °C-os csapvízben átmoszuk, hogy a kioldódott ezüst eltávolítását ezzel meggyorsítsuk. Ha elértük a megfelelően világos háttérrel, vízzel kimossuk a tioszulfát maradókat.

A reakciók 22 °C-os közegben zajlanak le legoptimálisabban. Gélvastagság 1,6 mm.

Az előhívott gélképet lehetőleg áteső fényben fényképezzük.

A géllapot polietilén fóliába hegesztve hűtőszekrényben hosszabb ideig, változatlan minőségben tárolhatjuk.

Az 1. ábrán a GK Tiszatáj búzából előállított fehérje-glutenin frakciójának SDS PAGE módszerrel nyert fehérjespektruma látható. A jobboldali öt oszlopban ezüstreakcióval tettük láthatóvá a sávokat, a baloldali ötben pedig Coomassie Brilliant Blue G 250-nel. A felvitt mintamennyiségek mindkét előhívás esetében azonos sorrendben követik egymást. (Minta összfehérje: 1. 80 µg 2. 40 µg 3. 10 µg 4. 1 µg 5. 0,2 µg)

Látható, hogy az ezüsttel előhívott mintalap sávjai az ötödik oszlopban is jól láthatók és értékelhetők, közel olyan mértékben, mint a Coomassie Brilliant Blue-val színezettek közül a 3. oszlop alegységei. Bár túl nagy fehérjekoncentráció esetén az egyes sávok összefolyhatnak, azonban csökkentve a felvitt minta mennyiségét, ezek az alegységek is értékelhetővé válnak.

#### I R O D A L O M

- (1) Kerese István Fehérjevizsgálati módszerek, 1975. Bp. Műszaki Könyvkiadó.
- (2) Bushuk, W., Zillmann, R. R., (1978): Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclatur. Can. J. Plant. Sci. 58 505–515.
- (3) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T 4. Nature, 227, 680–685.
- (4) Paterson, B., Sreohman, R. (1971): Biochemistry, 9 4094.
- (5) Zapolski, E. J., Podarsky, F., Ledley, R. S., Gersten, D. M. (1984): Demonstration of proteins in electrophoresis gels using radioactive stains. Electrophoresis, 5 354–357.
- (6) Tunan, P., Johansson, K. E. (1984): Jet another improved Silver staining method for the detection of protein in polyacrilamid gels. J. Biochem. and Biophys. Meth. 9 171–179.
- (7) Sammons, D. V., Adams, L. D., Nishizawa, E. E. (1981): Ultrasensitiv silver-based color staining of polypeptides in polyacrilamid gels. Electrophoresis, 2 135–141.
- (8) Wray, W., Boulikas, T., Wray, W. P., Hancock, R. (1981): Silver staining of proteins resolved in complex polyacrilamid gels. Anal. Biochemistry, 118 197–203.
- (9) Oakley, B. R., Kirsch, G. R., Morris, N. R. (1980): A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels. Anal. Biochemistry, 105 361–363.
- (10) Ochs, D. C., McConkey, E. H., Sammons, D. V. (1981): Silver stains for proteins in polyacrilamid gels. Comparison of six methods. Electrophoresis, 2 304–307.
- (11) Fevcsik Jenő (1959): Fényképezés, Bp. Műszaki Könyvkiadó.
- (12) Fotolexikon (1963) Bp. Akadémiai Kiadó.
- (13) Lentz, N., Kindl, E. (1960): Fotovegyszer lexikon 2. kiadás.
- (14) Polster, A., Lentz, N. (1957): 100 fotorecept 2. kiadás.

## ÚJABB MÓDSZER FEHÉRJE PAGE FEROGRAMOK EZÜST SZÍNEZÉSÉRE

*Horváthné Almássy K.*

A nemzetközi irodalomban leírt fehérje poliakrilamid-gél elektroforézis ezüstszínezési eljárásokat leegyszerűsítve kidolgoztunk egy könnyen kivitelezhető előhívó módszert a ferogramok fehérjesávjainak láthatóvá tétele céljából. Az eljárás jól reprodukálható, gyorsabb és kevésbé befolyásolja a reakciókörülmények, mint az eddig ismert módszereket. Az érzékenységi tapasztalataink szerint kb. ötvenszerese a Coomassie Brilliant Blue-val történő előhívásnak. A közönséges fotovegyszer-minőség megfelelő.

## A NEWER METHOD FOR SILVER COLOURING OF PROTEIN PAGE FERROGRAM

*Horváth – Almássy, K.*

The author simplified the silver colouring of the protein polyacrylamid gel electrophoresis in the international literature described and worked up a lightly accomplishable developer method for sightening of protein bands on the ferograms. The method is a good reproducible, faster and the circumstances of the reaction influence it less, than known methods until now. According to the author's experience the sensitivity of the method is about fifty times as much as the sensitivity of the method with Coomassie Brilliant Blue developed. Common photo reagent quality is convenient.

## НОВЫЙ МЕТОД ОКРАСКИ СЕРЕБРОМ PAGE ЭЛЕКТРОФЕРОГРАММЫ БЕЛКОВ

*К. Хорватнэ Алмаши*

После упрощения, описанных в международной технической литературе методов окраски серебром полиакрил-амид гелевого электрофореза белков, был разработан легковыполнимый метод проявления с целью получения видимых полос белков на электроферограммах. Метод хорошо воспроизводим, является более быстрым и, по сравнению с известными в настоящее время методами, на проведение анализа не влияют условия реакции.

По опытным данным чувствительность метода приблизительно в пятьдесят раз превышает чувствительность метода проявления с помощью Coomassie Brilliant Blue.

Для проявления соответствует по качеству обыкновенный фотореактив.

## NEUE METHODE FÜR DIE SILBERFÄRBUNG VON EIWÄEISS PAGE FERROGRAMMEN

*Horváthné Almássy, K.*

Durch die Vereinfachung der Silberfärbungsverfahren der in der internationalen Literatur beschriebenen Eiweiß-Poliacrylamid-Gelelektrophorese wurde eine leicht ausführbare Entwicklungsmethode zur Sichtbarmachung der Eiweißstreifen von Ferrogrammen entwickelt. Das Verfahren ist gut reproduzierbar, schneller und wird von den Reaktionsbedingungen weniger als die bisher bekannten Methoden beeinflusst. Die Empfindlichkeit beträgt etwa das 50 fache der Entwicklung mit Coomassie Brilliant Blue. Die Qualität der üblichen Photochemikalie ist ausreichend.