

Hazai búzák lipoproteinjeinek vizsgálata IV. Purotionin frakciók finomabb összetételének vizsgálata

BÉKÉS FERENC és VÁRADI GYULA

Budapesti Műszaki Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett: 1975. szeptember 17.

A hazai lisztek purotionin tartalmával kapcsolatos munkánkban Tanszékünk kutatói számos megállapítást tettek az anyag előfordulásával, kinyerésének körülményeivel, összetételével kapcsolatban. A purotionin első hazai izolálása (1) után egy viszonylag egyszerű kinyerési és tisztítási eljárás kidolgozására került sor (2, 3), amelynek alkalmazásával megfelelő tisztasági és mennyiségű preparátum nyerhető. A közölt adatok alapján ismertté vált a kereskedelmi BL-112-es liszt pontos purotionin-tartalma és a purotionin-fogalom egy új megvilágításba került. Eszerint a *purotionin* a búzaliszt petroléteres extraktjából sósavas hasítással előállítható fehérje frakciók *gyűjtőnévének* tekinthető. Ezen frakciók ugyanis – amellet, hogy izolálásuk módja alapján együttesen képezhetik a búzaliszt *lipopurotioninját* – aminosavösszetételüket tekintve is sok rokon vonást mutatnak.

Jelen közleményben folytatjuk a purotionin-frakciók vizsgálati eredményeinek ismertetését. Közöljük valamennyi, Sephadex G-75-ös gélen elkülönített molekulaméret szerint egységes purotionin frakció C- és N-terminális aminosavait, valamint a poliakrilamid-gélelektroforézises finomfrakcionális eredményeit.

Anyagok és módszerek

Vizsgálatainkhoz az előző közleményeinkben leírtak szerint előállított és tisztított, majd Sephadex G-75-ös oszlopon frakcionált purotionin-frakciókat használtuk. A kiindulási nyersanyag 1973-as termesztésű búzából őrlött BL-112-es liszt volt.

Terminális aminosavak meghatározása

Az N-terminális aminosavak meghatározását a Varga által, gliadinra kidolgozott dinitrofenil-módszerrel végeztük (4,5).

A purotionin frakciók desztillált vizes oldatainak kémhatását NaHCO_3 -al állítottuk be, amikor is az anyag finom porszerű csapadék formájában kivált. A visszaoldás 6–8 órás rázatással történt. A dinitrofenilezés 40°C -on 4 óra alatt játszódott le. A sósavval kicsapott dinitrofenil származékokat a szokásos mosási-lépések után szárítottuk, majd 300-szoros mennyiségű, 5,6 n HCl-val $105 \pm 1^\circ\text{C}$ -on hidrolizáltuk. A DNF-aminosavak kinyerését a hidrolizátumból éterrel, ill. etilacetáttal is elvégeztük. Az etilacetátos extraktok alkalmazhatók voltak a minták N-terminálisainak egylépésben történő kvalitatív értékelésére, de a mennyiségi meghatározáshoz vissza kellett térni a hagyományos éteres kirázásra.

A DNF-aminosavak elválasztása és azonosítása vékonyrétegekromatográfiás módszerrel történt. Az éter-, ill. etilacetátoldható DNF-aminosavak a kétirányú vékonyrétegekromatográfiával választottuk szét. Az alkalmazott réteg Kieselgel G volt. A kromatogramok kifejlesztésére az alábbi futtató elegyeket használtuk:

I. irányban: piridin – 0,8 n NH₃OH toluol – etilénklórhidrin
(30 : 60 : 100 : 60)
A kétfázisú rendszer felső fázisát alkalmaztuk.
Futtatási idő: 2 óra

II. irányban: kloroform – benzilalkohol – jégecet
(70 : 30 : 3,5)
Futtatási idő: 2 óra

A vízoldható DNF-aminosavak elválasztása egyirányú vékonyrétegekromatográfiával, Kieselgel G lapon n-butanol-25%-os NH₄OH (70 : 30) futtatóelegyen történt (1,5 óra).

A mennyiségi kiértékelés kontroll aminosav-származékok [(készítésük *Dévényi és Gergely* kézikönyve szerint (6)), kromatográfiás feltjainak denzitogramjai alapján felvett kalibrációs görbével történt. A denzitásokat Vitatron-denzitométeren vettük fel.

A C-terminálisok meghatározásánál alkalmazott módszer a *Wöller* (7, 8), illetve a *Sajgó és Dévényi* (9) féle karboxipeptidázos módszerek kombinációjának tekinthető.

Az emésztésben Serva gyártmányú, szabad aminosavaktól mentes karboxipeptidáz A- és B- állt rendelkezésünkre, amelyet használat előtt nem kellett tisztítanunk. Azonos aktivitású A- és B-enzimoldat-keveréket készítettünk, amelyet diizopropil fluorofoszfáttal kezeltünk az esetlegesen jelenlevő kimotripszin és tripszin hatástalanítása céljából.

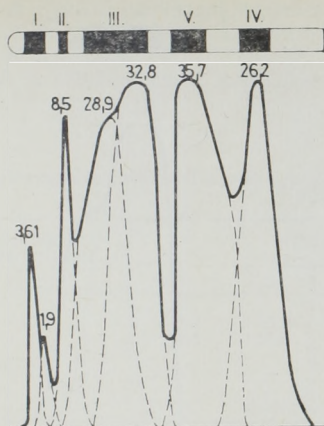
A puotionin frakciók emésztését 0,5%-os oldatainkban végeztük pH = 8,0-on, szobahőmérsékleten. A reakcióelegyből két óránként vettünk mintát 10%-os triklórecetsavval, hűtés mellett kicsaptuk a fehérjéket és Sartorius SH 2136 típusú membránon szűrtük az oldatokat.

A C-terminálisok kimutatása, mennyiségi meghatározása, illetve az emésztés követése két módszerrel történt: az emésztés időbeli követését Fixion-típusú ioncserelő vékonyréteg lapon végeztük (10), mennyiségi kiértékelésre egyesminták automatikus aminosavanalízises vizsgálatát alkalmaztuk. Az alkalmazott készülék és kísérleti paraméterek megegyeztek a bruttó aminosavösszetétel meghatározásánál használtakkal (3).

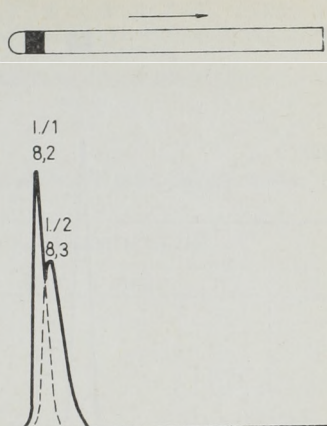
Gélektroforézises finomfrakcionálás

A poliakrilamid gélektroforézises vizsgálatokat Reanal gyártmányú Model – 69 készülékkel, illetve vegyszerkészlettel végeztük. Az irodalomban több helyen bevált, úgynevezett savas rendszert alkalmaztuk (11) 3,1-es pH-jú β -alanin-ecetsavpufferrel és 10, illetve 15%-os gélkoncentrációval. A fehérjék közötti kölcsönhatások kiküszöbölésére a gélanyagba 100 cm³-enként 24 gramm karbamidot is adagoltunk.

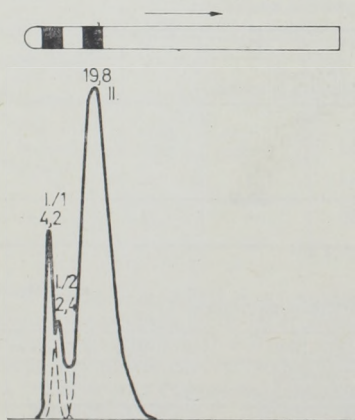
A 2,5 órás elektroforézis első félórájában 2, majd 4 mA/cső áramerősséggel dolgoztunk. A fehérjék jelzése *Chrambach* módszerével Coomassie Brilliant BLUE színezéssel történt. A mennyiségi értékelést Cromoscan típusú denzitométerrel végeztük.



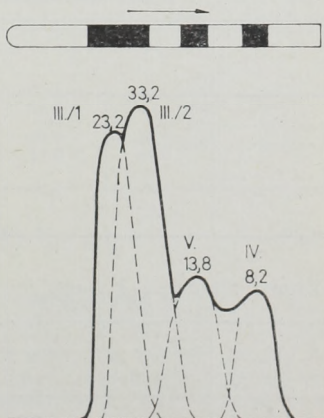
1. ábra
Purotionin PAG-elfogramja és denzitogramja



2. ábra
Purotionin I. frakció PAG-elfogramja és denzitogramja



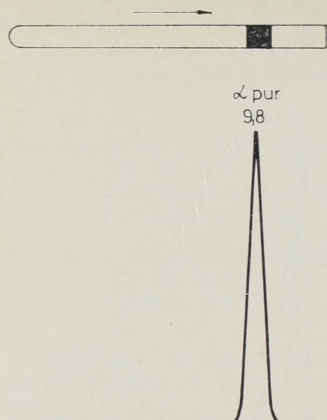
3. ábra
Purotionin II. frakció PAG-elfogramja és denzitogramja



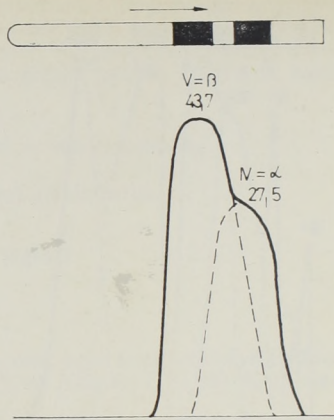
4. ábra
Purotionin III. frakció PAG-elfogramja és denzitogramja

Eredmények

A purotionin frakciók N- és C-terminális aminosavait, illetve ezek mennyiségét mg aminosav/g fehérje koncentrációban az 1. és 2. táblázatban foglaltuk össze.



5. ábra
Purotionin IV. frakció PAG-elfogramja és
denzitogramja



6. ábra
Purotionin V. frakció PAG-elfogramja és
denzitogramja

1. táblázat

A purotionin-frakciók N-terminális aminosavai

| | I. | II. | III. | IV. | V. | VI. |
|-----------|------------------------------------|------|------|------|------|------|
| | Frakció (mg aminosav/g fehérje) | | | | | |
| ALA | — | — | — | — | — | 17,6 |
| ARG | 0,48 | 0,10 | 1,72 | — | — | — |
| ASP | 0,65 | 0,17 | — | — | — | — |
| GLU | — | — | 0,74 | — | — | — |
| LYS | — | 1,00 | — | 30,4 | 9,4 | — |
| SER | — | — | 0,55 | — | 12,3 | — |

2. táblázat

A purotionin-frakciók C-terminális aminosavai

| | I. | II. | III. | IV. | V. | VI. |
|-----------|------------------------------------|------|------|-------|------|------|
| | Frakció (mg aminosav/g fehérje) | | | | | |
| ALA | 0,45 | 0,09 | — | — | — | — |
| ARG | — | — | 0,71 | — | 24,4 | — |
| ASP | 0,34 | 0,11 | 0,90 | — | — | — |
| GLY | — | — | — | — | — | 17,4 |
| LEU | — | 0,83 | 0,97 | — | — | — |
| LYS | — | — | 1,40 | 33,80 | 12,5 | — |
| VAL | — | — | 1,06 | — | — | — |

A tisztított purotionin gélelprogramjának sematikus rajzát és denzitogramját mutatja be az 1. ábra. A feltüntetett római számok a molekulaméret szerinti frakcionálásnál kapott frakciók jelzése. A denzitogramon feltüntetett

számok a görbe alatti terület mérőszámai. A 2–6. ábrán az I–V. frakció elfogramját és denzitogramját mutatjuk be. A VI. frakciót gélelektroforetikusan nem tudtuk detektálni.

A 3. táblázatban az egyes frakciók százalékos frakcioeloszlását tüntettük fel.

3. táblázat

A puotionin molakulámeret szerint egységese frakcióinak finomfrakcionálásakor kapott %-os frakcióeloszlás

| Gélfiltrációnál elkülönített frakciók | Gélelektroforézissel kimutatott frakciók | | | | | | |
|---------------------------------------|--|------|------|--------|--------|-------|------|
| | I/1. | I/2. | II. | III/1. | III/2. | IV. | V. |
| I. | 34,5 | 65,5 | — | — | — | — | — |
| II. | 10,1 | 15,6 | 74,4 | — | — | — | — |
| III. | — | — | — | 29,5 | 42,3 | 10,4 | 17,6 |
| IV. | — | — | — | — | — | 100,0 | — |
| V. | — | — | — | — | — | 38,7 | 61,3 |
| VI. | nem lehet kimutatni | | | | | | |

4. táblázat

| | I. | | II. | III. | | IV. | V. | VI. | |
|--------------------------------------|-------|-----|-----|-------|-------|-----|------|------|-----|
| | I/1 | I/2 | | III/1 | III/2 | | | | |
| N-term. | ARG | ASP | LYS | GLU | ARG | | LYS | SER | ALA |
| C-term. | ASP | ALA | LEU | ASP | LEU | VAL | LYS | ARG | GLY |
| Molekulasúly ($\times 10^{-3}$) | | | | | | | | | |
| M_s gélfilt. ... | 132 | | 125 | | 32 | | 11,2 | 8,9 | 4,2 |
| M_s UC ... | 134,6 | | 120 | | 57,3 | | 8,8 | 8,7 | — |
| M_s N-term. ... | 145 | 133 | 132 | 51,5 | | 49 | 5,9 | 4,6 | 5,0 |
| M_s C-term. ... | 133 | 129 | 116 | 43,6 | | 57 | 5,15 | 5,18 | 4,3 |

MEGBESZÉLÉS

A puotionin mind a gélelektroforézises, mind a terminális vizsgálatok alapján minimálisan nyolc fehérjefrakció keverékének tekinthető. Ezen frakciók gélfiltrációs technikával 4 élesen elkülönülő, illetve 6, többszöri rekromatografálással egymástól szétválasztható főfrakciót képeznek, melyek további finomfrakcionálása már csak az elektromos térben mutatott mobilitáskülönbség hatására lehetséges. Amint a 2., illetve 4. ábrán látható, az I. és III. frakció bontható alfrakciókra (I/1, ill. I/2., illetve III/1. és III/2).

A gélelektroforézises eredményeket összevetve a már közölt aminosavösszetételei adatokkal (3) megállapíthatjuk, hogy a más szerzők által α és β -puotioninnak nevezett frakciók az általunk izolált IV. és V.-től azonosíthatók. Emellett szól az irodalomban található egyetlen C-terminális adat is (13).

Érdekes ebből a szempontból, hogy a géliszűrési technikával éppen a IV. frakciót (vagyis a α -puotionint) lehetett egyedül, minden egyéb fehérjekomponenstől mentesen, tisztán előállítani, amit mind a gélelektroforézis eredménye (5. ábra), mind a terminális aminosavak vizsgálatánál kapott 1–1 terminális adat is igazol.

Az elektroforézis-vizsgálatnál kapott valamennyi frakció N- és C-terminálisát – az egyes főfrakcióknál kapott értékek alapján – meg lehetett határozni. Egyedül a III. frakció C-terminális meghatározásánál mutatkozik bizonytalanság, mivel a gélelektroforézisnél kapott dublettchez három, azonos nagyságrendben jelentkező C-terminálist találtunk. Ennek oka az analízis közben bekövetkező valamiféle bomlástermék jelenléte, vagy a C-terminális oldalról második aminosav megjelenése lehet.

A kapott adatok alapján mód van az egyes purotionin frakciók molekulásúlyának, a terminálisok mennyiségi adatokból való meghatározására.

A 4. táblázatban összesítve közöljük a különböző módszerekkel meghatározott molekulásúly-értékeket – részben már régebbi munkáinkban közölt – valamint az egyes frakciók terminális aminosavait.

IRODALOM

- (1) Lásztity R. – Monori J. S. – Kovács Á.: ÉVIKE 15, 157, 1969.
- (2) Békés F. – Monori S.: ÉVIKE 21, 163, 1975
- (3) Békés F.: ÉVIKE 22, 135, 1976
- (4) Varga J.: ÉVIKE 14, 153, (1968)
- (5) Varga J.: Műszaki doktori értekezés. BME 1968
- (6) Dévényi T. – Gergely T.: Aminosavak, peptidok, fehérjék. Budapest, 1963.
- (7) Nedelkovits J. – Wöller L.: ÉVIKE 16, 281 1970.
- (8) Wöller, L.: Műszaki doktori értekezés. BME 1973
- (9) Salgó A. – Dévényi T.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Hung. 7, 233, 1972.
- (10) Dévényi T.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Hung. 5, 435, 1970.
- (11) Gordon, A. N.: Elektroforézis of protein in pak and starch gel. North-Holland, Amsterdam 1973.
- (12) Chambach A.: Anal. Biochem. 15, 544, 1966
- (13) Redman, D. N. – Fisher, N.: J. Sci. Food Agric. 20, 427, 1969.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЕНГЕРСКИХ IV. ИССЛЕДОВАНИЕ БОЛЕЕ ТОНКОГО СОСТАВА ФРАКЦИЙ ПУРОТИОНИНА

Ф. Бекш и Дзэ. Варди

Были исследованы фракции puroтионина полученные с помощью гель-фильтрации и электрофореза на полиакриламидовом геле. На основе результатов электрофореза и числа терминальных аминокислот puroтионина изолированного из муки этот продукт считается 8 компонентной смесью; авторы приводят терминальные всех фракций а так же молекулярные веса определенные по четырем разным методам. На основании полученных данных установили, что изолированные ими IV–V фракции могут быть иоденцифицированы фракциями обозначенными в литературе α β -пуротинином.

UNTERSUCHUNG DER LIPOPROTEINE VON UNGARISCHEN WEIZEN. IV. UNTERSUCHUNG DER FEINEREN ZUSAMMENSETZUNG DER PUROTHIONIN-FRAKTIONEN

F. Békés und Gy. Váradi

In bezug auf Molekulargröße homogene Purothioninfraktionen wurden durch die in früheren Mitteilungen beschriebenen Methoden isoliert. Die Anzahl der N- und C-terminalen Aminosäuren dieser Fraktionen bzw. die Ergebnisse

der feiner Fraktionierung der Fraktionen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese werden angegeben. Auf Grund der Gelelektrophorese und der Anzahl der terminalen Aminosäuren wird das aus dem ungarischen Weizenmehl BL-112 isolierte Purothionin als ein Gemisch aus 8 Komponenten betrachtet. Die N- und C-Terminale aller Fraktionen, ferner ihre nach verschiedenen Methoden bestimmte Molekulargewichte sind angeführt. Auf Grund der erhaltenen Angaben wird festgestellt, dass die vom Weizenmehl isolierten Fraktionen IV und V der in der Literatur als α - bzw. β -Purothionin bezeichneten Fraktion identisch sind.

INVESTIGATION OF THE LIPOPROTEINS IN WHEATS GROWN IN HUNGARY IV. INVESTIGATION OF THE FINE COMPOSITION OF PUROTHIONINE FRACTIONS

F. Békés and Gy. Váradi

Purothionine fractions homogeneous according to molecular size were isolated by methods described in their earlier communications. Numbers of N- and C-terminal aminoacids in these fractions and, respectively, the results of the fine fractionation of these fractions by polyacrylamide gel electrophoresis are described. On the basis of the data of gel electrophoresis and of the number of terminal aminoacids, purothionine isolated from Hungarian wheat flour of type BL-112 is considered to be an 8-component mixture. The N- and C-terminals of all the fractions are given, together with their molecular weights determined by four different methods. On the basis of the obtained data it was found that the fractions IV and V isolated by the described methods can be identified as fractions denoted in literature by the names α - and β -purothionine.