

Tej előkészítése poliakrilamid-gél elektroforézises vizsgálatokhoz

PHAM VAN MINH* ÉS KÁDAS LAJOS

Kereskedelmi és Vendéglátóipari Főiskola Élelméztudomány Tanszék, Budapest

Érkezett: 1978. január 5.

Ma már a tejfehérjék fizikai-kémiai jellemzői (oldhatóság, molekulásúly, stabilitás stb.) többnyire jól ismertek, sokban megegyeznek a többi állati eredetű fehérje tulajdonságaival. Viszonylag keveset tudnak azonban a tejfehérjék szerkezeti sajátosságairól. Az utóbbi évek kutatásai éppen az egyes tejfehérjék elkülönítését, differenciálását, felépítésüknek tanulmányozását vették célba. Ezt számos metodikai és technikai eljárás segítette pl. izoelektromos, precipitációs mérések, dialízis, sókkal vagy alkohollal végzett frakcionálás, hőkoagulációs vizsgálatok stb. A legutóbbi években azonban egyre inkább előtérbe kerül a kromatográfia és az elektroforézises vizsgálati módszer.

Raymond (1), valamint Ornstein és Davis (2) az 1950-es évek végén dolgozta ki a poliakrilamid-gél elektroforézis módszerét. Közleményeikben tisztázták a módszer elvi alapját, valamint azokat a követelményeket, amelyeket a gyakorlati munkában szem előtt kell tartani.

A poliakrilamid-gél elektroforézis módszer, mint vizsgálati eljárás kezdetben a tisztán biokémiai kutatásokban játszott fontos szerepet. Napjainkban azonban egyre inkább teret nyer mint alkalmazott biokémiai kutatómódszer az élelmiszerkémiai (3, 4, 5, 6, 7) és ezen belül a tejfehérjék kutatásában is (8, 9, 10, 11, 12).

Szükséges megjegyezni, hogy az egyes vizsgálati eredmények között azonban jelentős eltérések tapasztalhatók. Ezek a poliakrilamid-gél elektroforézis technikai megoldásaiban, a minták előkészítésének módszerében, a különböző akrilamid oldatok, gélpufferek és elektródpufferek, valamint az egyéb kísérleti körülményekben fellelhető különbözőségekből adódnak.

VIZSGÁLATI ANYAG ÉS MÓDSZER

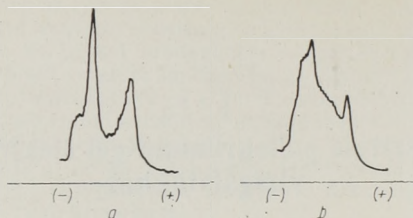
A minták előkészítése:

A vizsgálatokhoz a kereskedelmi forgalomban kapható friss fogyasztási tejet használtunk. A kazein és savófehérjék különválasztása előtt a tejet minden esetben zsírtmentítettük 15 percig 6000 fordulatszám mellett történő centrifugálással.

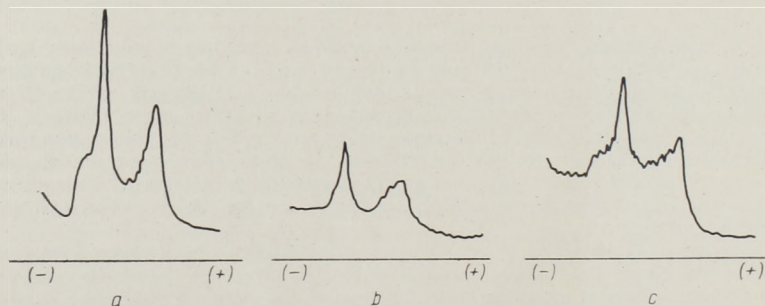
A kazein és savófehérjék elválasztására a következő eljárásokat próbáltuk ki, illetőleg alkalmaztuk a vizsgálatok során:

„a” A tej kémhatását állandó keverés közben 1 n ecetsavval pH 4,5 értékre állítottuk be. Ezt követően centrifugáltuk, a leváló csapadékot kevés hideg desz-

* Élelmiszeripari Kutató, Hanoi (Vietnam)



1. ábra: Zsírmentes tej denzitogramjai különböző sűrűségű gelben
 a – 7,5%-os poliakrilamid-gél
 b – 10%-os poliakrilamid-gél

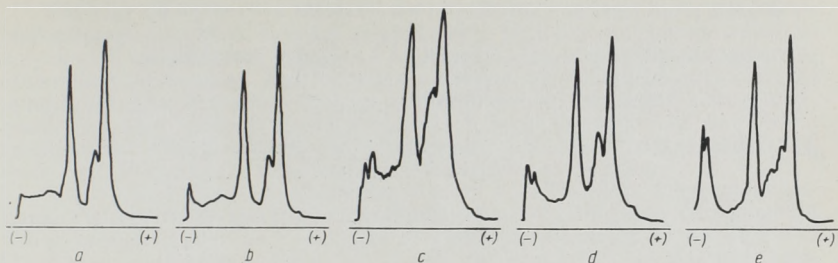


2. ábra: Zsírmentes tej denzitogramjai különböző elektródpuffer oldatok alkalmazása során
 a – TRIS-Glicin puffer
 b – 4,5 mólos karbamid tartalmú TRIS-Glicin puffer
 c – veronálpuffer

tillált vízzel átmostuk, újra centrifugáltuk, majd vákuumszűrőn különválasztottuk. A csapadék a kazein fehérje részt a felülúszó pedig a savófehérjéket tartalmazta. A csapadékból 3 g-ot 10 cm³ elektródpuffer (8,3 pH TRIS-Glicin puffer) és 15 cm³ 9-mólos karbamid oldat segítségével feloldottunk és szobahőmérsékleten 24 óráig állni hagytuk.

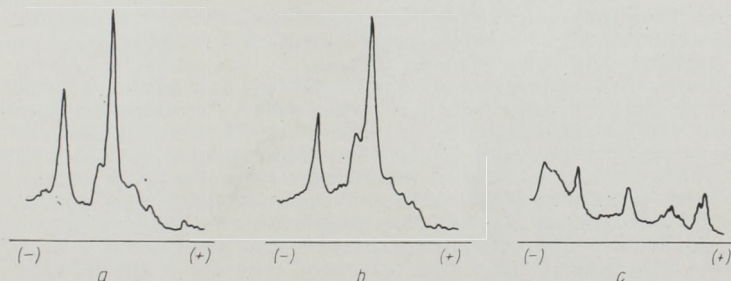
„b” 60 cm³ zsírmentes tejet 20 cm³ 1 n sósavval kicsaptuk és centrifugálás után a savófehérjéket tartalmazó felülúszótól elválasztottuk a kazeint tartalmazó csapadékot. Ennek 3 g-jához 10 cm³ elektródpuffer-oldatot és 15 cm³ 9-mólos karbamid oldatot adtunk, így a kazein fehérjéket újra oldatba vittük. 10–12 órai állás után az elegyet centrifugáltuk és az ekkor a felületén képződött felületi hártya alól kiszivott oldatból történt a kazein vizsgálata.

„c” 50 cm³ zsírmentes tejet vízfürdőn 40 °C-ra melegítettünk és pH értékét 1 n ecetsavval 4,5-re állítottuk be, majd kihűlés után centrifugáltuk. A felülúszó rész a tej savófehérjeit tartalmazta. A kazein tartalmú csapadékot desztillált vízzel ötször átmostuk és 3 g-ját feloldottuk 25 cm³ veronálpufferben (összetétele: 20,6 g nátriumveronál, 1,84 g veronál, 400 g karbamid 1000 cm³ oldathoz), majd 24 óráig állni hagytuk.



3. ábra: A tejből különböző módokon elválasztott kazeinminták denzitogramjai

- a – ecetsavval (az „a” pont szerint)
- b – sósavval (a „b” pont szerint)
- c – aludttejből (az „e” pont szerint)
- d – melegítést követően ecetsavval leválasztva, majd veronálpufferben oldva (a „c” pont szerint)
- e – ecetsavval leválasztva, majd karbamid oldatban oldva (a „d” pont szerint)



4. ábra: A tejből különböző módokon elválasztott savófehérjék denzitogramjai

- a – a kazeinfehérjék ecetsavval történő lecsapása után nyert oldatból (az „a” pont szerint)
- b – a kazeinfehérjék sósavval történő lecsapása után nyert oldatból (a „b” pont szerint)
- c – melegítést követően a kazeinfehérjék eltávolítása után nyert oldatból (a „c” pont szerint)

„d” Kazein önálló, a savófehérjétől független vizsgálatához a tejhez ecetsavat adtunk (az „a” pont szerint), a levált csapadékot centrifugálással elválasztottuk és desztillált vízzel többször átmostuk. Ezt követően 3 g-ot 25 cm³ 9-mólos karbamid oldatban feloldottunk és az így nyert oldatot 24 óráig szobahőmérsékleten állni hagytuk.

„e” Kazein fehérjék vizsgálatához oly módon is nyertünk anyagot, hogy a friss tejet hagytuk megaludni, majd az alvadékot megtörve, a csapadéktól vákuumszűrőn különválasztottuk a savót.

A gél-elektroforézis körülményei

A vizsgálatokhoz a REANAL cég „MODEL 69” típusjelű poliakrilamid gél-elektroforetikus készülékét, valamint ahhoz a gyártó által ajánlott vegyszer-kollekciót használtuk.

A gélek előállításához a következő törzsdadatokat készítettük el:

„A” oldat:	48,0 cm ³ 36,6 g 0,23,cm ³	1 n HCl TRIS TEMED	100 cm ³ oldatra
„B ₁ ” oldat:	28,0 g 0,735 g	Akrilamid BIS	100 cm ³ oldatra
„B ₂ ” oldat:	40,0 g 0,4 g	Akrilamid BIS	100 cm ³ oldatra
„C” oldat:	0,14 g	Ammonium- per-szulfát	100 cm ³ oldatra

A vizsgálatokhoz tervezett, az akrilamid monomerre nézve eltérő koncentrációjú géleket a törzsdatokból a következő elegyítési arányok alapján kaptuk:
7,5%-os akrilamid

$$„A” : „B_1” : H_2O : „C” = 1 : 2 : 1 : 4$$

10%-os akrilamid

$$„A” : „B_2” : H_2O : „C” = 1 : 2 : 1 : 4$$

Az elektroforézis során a poliakrilamid gél-elektroforézises technikában általában elterjedt 8,3 pH TRIS-Glicin elektrodpuffert és ennek 4,5 mólos karbamidot tartalmazó változatát alkalmaztuk.

Kipróbáltunk ezen túlmenően két másik, ritkábban használatos elektrodpuffert is, nevezetesen savófehérjék esetében a veronál puffert (összetétele: 9,81 g nátriumveronál, 6,57 g nátriumacetát egy liter oldatban. A pH-t sósavval 8,6-ra állítottuk be) és kazeinfehérjék esetében 4,5 mólos karbamidot tartalmazó veronálpuffert.

Az elektroforézishez az egyes géloszlopokra a tej és a kazein esetben 20 μ l, savófehérje esetében 40 μ l fehérjetartalmú oldatot vittünk fel és 2 mA/cső áramerősséget alkalmaztunk. Az elektroforézist követően a géleket az egyes fehérjefrakciók láthatóvá tétele céljából amidófejekete festékdoldattal megfestettük. A festéket nem adszorbeáló (fehérjét nem tartalmazó) részekből az amidófejeketét 7%-os ecetsav oldatban történő többszöri átmosással távolítottuk el.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A teljes tejben előforduló fehérjeféleségek száma viszonylag nagy, átlagosan 30–40-re tehető (ez nem foglalja magába az enzimfehérjéket). Ennek megfelelően az elektroferogramokon viszonylag nagyszámú sav észlelhető, ámbar a gyakorlatban a fent jelölt értékeket nem éri el és a különböző közleményekben is jelentős eltérések tapasztalhatók. Ez a mintaelőkészítés és a metodikai körülmények különbözőségeinek, a tej adó állatok fajtatulajdonságainak és egyéb befolyásoló tényezőknek figyelembevételével magyarázható.

Következésképpen az egyes frakciók minőségi megítélésében és megnevezésében sem mutatkozik egységes szemlélet, ehhez szükségesnek látszik az egyes frakciók fehérjekomponenseinek pontosabb elválasztása és jellemzése.

Mi jelen munkánk során – annak célkitűzéseiből következően – nem törekedtünk a fehérjék ilyen jellegű elválasztására, csupán annak tanulmányozására szorítottunk, hogy a különböző előkészítési műveletek és elektroforetikus körülmények közül melyik a legalkalmasabb a tejfehérjék poliakrilamid gélben történő elválasztására.

Elsőként arra kerestünk választ, hogy az elektroforézishez alkalmazott különböző sűrűségű gélek közül melyiket a legcélszerűbb használni. Az irodalmi adatok és a gyakorlati tapasztalatok alapján a 7,5%-os, valamint a 10%-os gélkoncentráció látszott erre alkalmasnak. A párhuzamosan elvégzett vizsgálatok alapján a további munkákhoz egyértelműen a 7,5%-os poliakrilamid koncentrációt választottuk, amely az 1. ábra tanúsága szerint jobban tagolt képet, nagyobb fokú elválasztást eredményezett. (Szükséges megjegyezni, hogy a 10%-os koncentrációjú gél nagyobb mértékben duzzad és így technikailag is nehezebben kezelhető.)

A különböző elektrodpuffer oldatok közül a TRIS-Glicin, a karbamid tartalmú TRIS-Glicin és a veronálpuffer hatását hasonlítottuk össze zsirmentes tej elektroforézise során nyert eredmények alapján, amit szemléletesen a 2. ábra mutat. A három pufferoldat közül a legjobb szétválasztást a TRIS-Glicin puffer eredményezte. A veronálpuffer a denzitogramon tapasztalható, de a géleken vizuálisan is megfigyelhető módon elmosódott, kevésbé diszkrét frakcióba csoportosult fehérjeképet mutatott. A karbamid tartalmú TRIS-Glicin puffer bizonyult a legkevésbé eredményesnek.

A tejből eltérő módon elválasztott és külön vizsgált kazein- és savófehérjék esetében kapott eredményeket a 3. és 4. ábra mutatja.

A kazein esetében megfigyelhető, hogy a szokásos módon ecetsavval vagy sósavval történő kicsapással nyert kazeint elektroforetizálva lényeges különbségek nem mutatkoznak. Ha a csapadékot azonban veronál vagy karbamid oldat alkalmazásával visszük újra oldatba, megjelenik az a két kis sebességgel vándorló fehérjefrakció, amelyet a savval történő kicsapást követően nem tapasztaltunk, de a spontán alvadással nyert kazein elektroforézise is kimutat. Sőt a csapadéknak karbamiddal történő feloldásakor – amelyet kazein esetében a legcélravezetőbbnek találtunk – a mobilisabb fehérjék is megbonthatók, egy másutt nem tapasztalt frakciót eredményezve.

A savófehérjék denzitogramjaiból látható, hogy az alkalmazott enyhe melegítés hatására (amely a kazeinfehérjéket nem befolyásolta), a savófehérjék egy része denaturálódott, így a módszert mint előkészítési technikát esetükben el kell vetnünk. A másik két vizsgált eljárás, nevezetesen az ecetsavval vagy sósavval történő kazeinlecsapás után nyert savófehérjék elfogramjai, illetőleg denzitogramjai lényegileg nem különböztek egymástól, a két előkészítési módot egyenlő értékűnek fogadhatjuk el.

IRODALOM

- (1) Raymond, S.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 350. 1964.
- (2) Ornstein, L., Davis, B. J.: A new high resolution electrophoresis method. Deliv. at the Soc. for the Study of Blood at the New York Acad. Med. 1959.
- (3) Alekszejev, N. Ju., Djacsenko, P. F.: Novúje danúje o kazeinovom Komplexe moloka Moszkva, 1965.
- (4) Szejtov, Z. Sz., Zsumasev, Zs.: Belkovúj szosztav oscevo kazeina korovjevo moloka Biohimija tom. 35. Moszkva 1970.
- (5) Farkas J.-né: ÉVIKE 16, 155. 1970.
- (6) Nedelkovits J., Teleky-Vámosy Gy.: ÉVIKE 20, 299. 1974.
- (7) Hajdu I., Vajda P., Kádás L., Lindner K.: A fehérjedenaturáció vizsgálata húskokban poliakrilamid-gél elektroforézissel. Nagykőrös, Konzervipari Higiéniai Napok. 1976. május.
- (8) Swaisgood, H.: Methods of Gel Electrophoresis of milk Proteins. American Dairy Sci. Assoc. Urbana, USA.
- (9) Darling, D. F., Butcher, D. W.: J. Dairy Sci. 59, 863, 1976.
- (10) Hiller, R. M.: Dairy Reseach, 43, 259. 1976.
- (11) Lee, D. N., Moore, E. E., Richard, L.: J. of Dairy Sci. 58, 658. 1975.
- (12) Kirschmeir, O.: Z. U. L. 157, 205. 1975.

El Negiumy, A. M., J. of Dairy Sci 59. 153. 1976.