

Poliakrilamidgél-elektroforézis alkalmazása búzaliszt összetettfehérje-frakciójának elválasztására

NEDELKOVITS JÁNOS és TELEKY-VÁMOSSY GYÖNGYI
Budapesti Műszaki Egyetem, Biokémiai és Élelmiszerteknológiai Tanszék

Az összetett fehérjék szerepe és jelentősége egyre nagyobb figyelmet igényel mind a tudományos kutatásban, mind a gyakorlati feladatok megoldásában. A biológiai eredetű anyagokban mindig előfordulnak olyan összetett fehérjék, amelyekhez lipidek, szénhidrátok kapcsolódnak. A különböző gabonamagvak, így a legfontosabb kenyérgabonánk a búza is tartalmaz ilyen komplex vegyületeket (1).

Ezek a vegyületek a búzaliszt sütőipari, technológiai értékét jelentősen befolyásolják. Nagy hatásuk van a tészta minőségére, a kelesztés során lejátszódó enzimes, mikrobiológiai és kolloidkémiai folyamatokra, valamint a kenyér öregedésére. A megfelelő technológia alkalmazásához feltétlenül szükséges ezeknek a vegyületcsoportoknak az ismerete is. A gabonafehérje kutatások során az egyszerű fehérjekomponensek mellett ezen fehérjekomplexek tanulmányozása is rendkívül fontos feladat, annál is inkább, mivel ezek kinyerési módja pontosabb összetétele, szerepe még nem teljesen tisztázott. A fehérjekomplexek kinyerésére különböző eljárások ismeretesek, de általában az előállított termék nem egységes anyag, az további frakciókra bontható. A fehérjekomplexek frakciókra bontásához jól alkalmazhatók a gélkromatográfiai, vékonyrétegekromatográfiai és elektroforézises módszerek. Jelen közleményben a búzalisztból *Folch* módszerével (2) előállított fehérjekomplex gélelektroforézises frakcionálásáról, illetve annak alkalmazási lehetőségeiről számolunk be.

Vizsgálatainkhoz „Bezostája” búzából örölt BL-55 jelzésű lisztet használtunk. Petroléteres zsírtalanítás után kloroform-metanol 2 : 1 arányú elegyével vontuk ki a fehérjekomplexeket. A vizsgálatra szánt frakciót desztillált vízzel szembeni diffúzióval nyertük ki. Az így előállított termék világossárga, áttetsző szilárd anyag, amely csak dimetilformamidot, karbamidot vagy guanidin-hidrokloridot tartalmazó pufferoldatokban és Al-laktát vizes oldatában oldódott.

A fehérjekomplex frakcionálása poliakrilamid elektroforézissel

Vizsgálatainkat LABOR MIM gyártmányú „PAG” elektroforézis készülékkel végeztük. Az elválasztáshoz szükséges törzs és munkaoldatok összetételét az alábbi részletezés szerint állítottuk össze:

„A” oldat:

1 n HCL	48 cm ³
TRIS (hidroxilaminometán)	36,6 g
TEMED (N, N, N'N'-tetrametiletiléndiamin)	0,23 cm ³ /100 cm ³

„B” oldat:	
1 n HCl	48 cm ³
TRIS	5,98 g
TEMED	0,46 cm ³
vízzel	100 cm ³ -re
„C” oldat:	
akrilamid	28,0 g
BIS/N,N'-metilénbis-akrilamid)	0,735 g
vízzel	100 cm ³ -re
„D” oldat:	
akrilamid	10,0 g
BIS	2,5 g
vízzel	100,0 cm ³ -re
„E” oldat: riboflavin	4 mg/100 cm ³
„F” oldat: szacharóz	40 g/100 cm ³
„2b” oldat: ammóniumperszulfát	0,14 g/100 cm ³

A kész törzsoldatokból az analízishez szükséges géleket az alábbi arányokba készítettük:

„alapgél”	1 tf A 2 tf C 1 tf víz 4 tf 2b
„tömörítő és mintagél”	1 tf B 2 tf D 1 tf E 4 tf F

A gél kialakításához 2–2 cm³ alapgél oldatot, a tömörítőgél oldatból 0,2–0,2 cm³-t használtunk fel. A mintagélt 2 : 1 arányú minta: tömörítőgélből alakítottuk ki. A polimerizálást szobahőmérsékleten nappali fényben, illetve UV fényben végeztük. A mintákból mindig 2%-os oldatot készítettünk, amely gyakorlatunkban 2,4 mg anyagot jelentett csövenként. Az alkalmazott áramerősség az elektroforézis első félórájában 2 mA/cső, a továbbiakban 5 mA/cső volt.

Az akrilamid-gélen elválasztott frakciók előhívása

A gélen szétválasztott anyagot specifikus színezék oldatokkal, illetve kémiai reakció segítségével hívtuk elő és azonosítottuk az egyes frakciókat zsírfehérje-szénhidrát komplexként.

1. előhívás fehérjére (3)

előhívó oldat: amidofekete 10B	10 g
7%-os ecetsavval	1 literre oldva
mosó- és tároló folyadék:	7%-os ecetsav
előhívási idő: 1 óra	

2. előhívás szénhidrátra (3)

perjódsvas Schiff-reakció (PAS) szükséges oldatok:

- 1,2 g perjódsvas 30 cm³ desztillált vízben oldva + 15 cm³ 0,5 m Na-Acetát + 100 cm³ 96%-os etilalkohol.
- 5 g KI és 5 g Na₂S₂O₃ 100 cm³ desztillált vízben oldva + 150 cm³ 96%-os etilalkohol és 2,5 cm³ 2 n HCl.
- 1,5 g fukszin bázis 200 cm³ desztillált vízben oldva + 1,5 g K-metabiszulfit és 3 cm³ cc. HCl. Az oldat 12 óráig hűtőszekrényben állt, majd 3–4 g aktívzén hozzáadása után szűrtük.
- 0,4 g K-metabiszulfit 100 cm³ desztillált vízben + 1 cm³ cc HCl.

Az a), b) d) oldatot 2–3 naponként, a c) oldatot 8–10 naponként frissen kell készíteni.

Színezési eljárás:

a gél 10 percig az a reagensben kell tartani, majd vízzel többször lemosni. Ezután 8 percig a b) oldatban kell tartani és desztilláltvízes mosás után a c) reagensben 1 órát kell tartani. A reakció befejezése után a d) reagenssel addig kell mosni, míg az előntött folyadék lilás színeződést ad.

Tároló folyadék: desztillált víz, vagy 1%-os K-metabiszulfit

A tároló folyadék 4–6 hétig biztosít állandó szint a frakciónak.

3. előhívás lipidre (4)

Színező oldat: szudánfekete telített propilén-glikolos oldata.

Ez az eljárás a fehérjekomplex lipid részének előhívására szolgál. A mintát az elektroforézist megelőzően színezni kell és együttesen felvinni a géltre. (1 rész minta + 1 rész tömörítőgél + 1 rész szudánfekete oldat).

Színezési idő: 30 perc

Tároló folyadék: desztillált víz.

Az akrilamidgél-elektroforézisnél alkalmazott gélkonzentrációk, elektrodpufferek és a vizsgálati anyag oldási körülményei

1. gélkonzentrációk:

Az előzőekben megadott, a gélkészítéshez szükséges munkaoldatokból 7%-os gél készítettünk. Az elvégzett elektroforézisek alapján megállapítottuk, hogy ez a gélkonzentráció nem alkalmas a fehérjekomplex elválasztására, mert a gél szerkezet tömörsége miatt az anyag csak a géltartó cső és a géloszlop közé tudott behatolni. Ezért a 7%-os géloldatból hígítással lazább szerkezetű alapgéleket állítottunk elő. Az alkalmazott gélkonzentrációk: 3,5%-os, 3,3%-os és 3,0%-os. Készítettünk többretegű ún. „gradiens” gél is, ahol az egyes rétegek 3,5%-os, 3,3%-os, 2,8%-os sorrendben következtek egymást után. A tömörítőgél minden esetben 2,8%-os volt.

2. elektrodpufferek:

Az anyag szétválasztását mind savas, mind bázikus pH tartományban megpróbáltuk.

Az alkalmazott pufferoldatok:

8,3 pH TRIS-glicin:

TRIS	6 g
glicin	28,8 g
víz	1000 cm ³ -re

elválasztás 10-szeres hígítással, $\mu = 0,02$

9,3 pH TRIS-glicin:	TRIS glicin vízzel	18 g 28,8 g 1000 cm ³ -re
elválasztás 10-szeres hígítással, $\mu = 0,03$		
9,5 pH TRIS – HCl:	TRIS TEMED vízzel	363 g 4,6 cm ³ 500 cm ³ -re,
majd annyi 1 n HCl-t, hogy a pH 9,5 legyen és vízzel 1000 cm-re feltöltve. elválasztás 8-szoros hígítással, $\mu = 0,2$		
3,1 pH Al-laktát:	Al-laktát cc tejsav vízzel	4,905 g 5,2 cm ³ 1000 cm ³ -re
elválasztás hígítás nélkül.		
3,5 pH β -alanin – jégecet:	β -alanin jégecet vízzel	31,2 g 18 cm ³ 1000 cm ³ -re
elválasztás 10-szeres hígítással, $\mu = 0,03$		
4,3 pH -alanin-jégecet:	β -alanin jégecet vízzel	31,2 g 8 cm ³ 1000 cm ³ -re
elválasztás 10-szeres hígítással, $\mu = 0,02$		

3. az anyag oldási körülményei:

A vizsgálati anyag teljes oldódása végett különböző szerek adagolását alkalmaztuk és egyúttal ezek befolyásoló hatását is megfigyeltük. Az oldáshoz elsősorban karbamidot és guanidin-hidrokloridot használtunk. E mellett nem-ionos detergensként TRITONT, valamint anionos detergenset Na-dodecilsulfát (SDS)-ot alkalmaztunk.

A bázikus pH tartományban történő elválasztáshoz az anyagot 8,3 pH-jú 8 m karbamidot és 0,08 m guanidin-hidrokloridot, illetve 0,08 m guanidinhidrokloridot tartalmazó TRIS-glicin pufferben oldottuk. A TRITON-ból 10%-os, az SDS-ből 2%-os oldatot készítettünk ugyanezen pufferben és ebben végeztük az oldást.

A savas pH tartományban elválasztott anyagot egyrészt 4,3 pH-jú Al-laktátban, másrészt 4,3 pH-jú az előzővel azonos mennyiségű karbamid és guanidinhidroklorid tartalmú β -alanin-jégecet pufferben oldottuk. A detergens tartalmú puffer koncentrációja az előzővel megegyező volt.

Eredmények

Az általunk búzalisztból izolált fehérjekomplexet poliakrilamidgél-elektroforézises elválasztás során az alkalmazott körülményektől függően sikerült több frakcióra bontani.

A bázikus pH tartományban (8,3–9,5 pH) 3,5%-os alapgélkoncentráció alkalmazásával minden esetben 2–3, csak amidofeketével színeződő frakciót kaptunk. A tömörítőgél felszínén, illetve a gélben is mindig maradt 1, vagy 2 elkülönülő frakció, amelyek nem hatoltak be az alapgélbe. Az elválasztásoknál



1. ábra

Fehérjekomplex frakcionálása 3,5%-os poliakrilamidgélben, 8,3 pH, amidofeketével előhívva

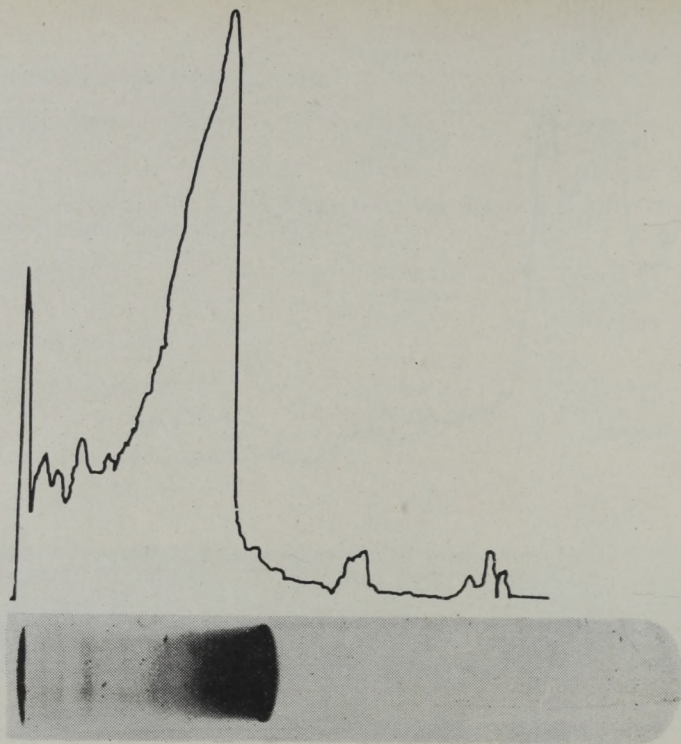
kapott frakciók a különböző bázikus pH értékeknél csak diffúzióban különböztek. Viszont jól elkülönülő frakciókat a 8,3 pH-jú puffer alkalmazásával kaptunk (1. ábra).

Ebben a pH tartományban és ilyen gélkoncentráció mellett csak fehérjére színeződő frakciót kaptunk. Ez arra mutat, hogy maga a fehérjekomplex ilyen körülmények között nem vándorol, hanem csak a fehérjerész mozdul el elektromos tér erő hatására annak következtében, hogy részben, vagy teljesen felbomlik az összetett fehérje.

A savas elektródpuffer pH-tartományban (3,1–4,3 pH) 3,5%-os alapgél-koncentráció alkalmazásával több frakciót lehetett elkülöníteni, mint az előzőekben leírt körülmények között. Minden esetben kaptunk egy olyan frakciót, amelyik amidofeketével, szudánfeketével és PAS-reagenssel egyaránt színeződött, a többi 3–6 frakció kizárólag amidofeketével volt előhívható. A 4,3 pH-jú pufferrel végzett elválasztás képe a 2. ábrán látható.

Az ábrán látható frakciók közül az 1–6-ig számoztak amidofeketével, a 7. nagy tömegű sáv pedig mindhárom előhívóval színeződött. Ebben a pH tartományban és az adott gélkoncentráció mellett a fehérjekomplex elmozdul, de csak egy frakciót ad.

A továbbiakra az elektroforézises elválasztásra „grandiens” géleket alkalmaztunk. Mivel a 4,3 pH-jú puffer bizonyult a legjobbnak, ezért a „gradiens”



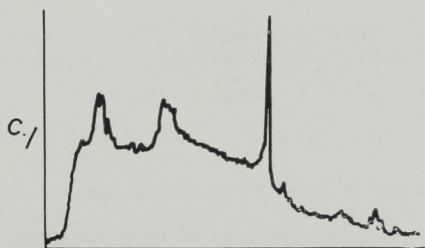
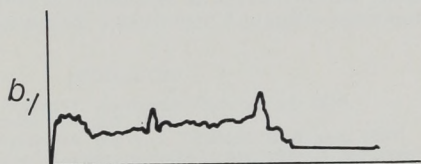
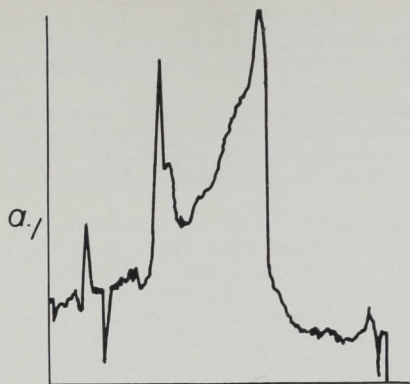
2. ábra

Fehérjekomplex frakcionálása 3,5%-os poliakrilamidgélén, 4,3 pH amidofeketével előhívva

gélén az elválasztást ezzel a pufferrel végeztük. A 3,5%-os, 3,0%-os, 2,8%-os gékoncentrációkat tartalmazó géloszlop esetén egy olyan határozott sávot kaptunk a 3,5%-os géltartományban, mely mindhárom előhívó reagenssel pozitív eredményt adott. A 3,0%-os és a 2,8%-os géltartományban diffúz frakciók adódtak. Ezen tapasztalatok alapján finomítottuk a gékoncentráció-lépcsőket és 3,5%-os, 3,3%-os, 2,8%-os géleket tartalmazó oszlopot rétegeztünk. A frakcionálás eredményét a 3. ábra szemlélteti.

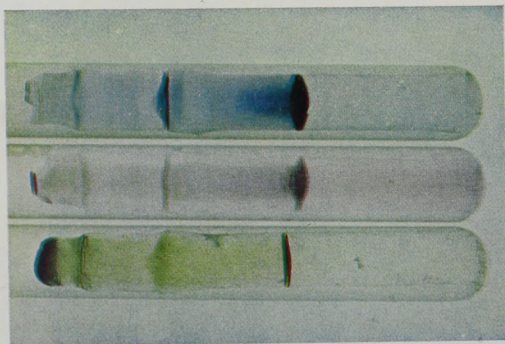
Mint ahogy az ábrán is jól látható, három, illetve a tömörítőgél felszínén maradt frakcióval együtt négy jól elkülönülő frakciót kaptunk, amelyek fehérjére, lipidre és szénhidrátra egyaránt előhívhatók. Az amidofeketével színezett géleken még további három: halvány fehérjefrakció is megjelent. Tehát a kipróbált puffer és gékoncentráció változatok közül ez a legutóbbi bizonyult a komplex frakcionálásához a legmegfelelőbbnek.

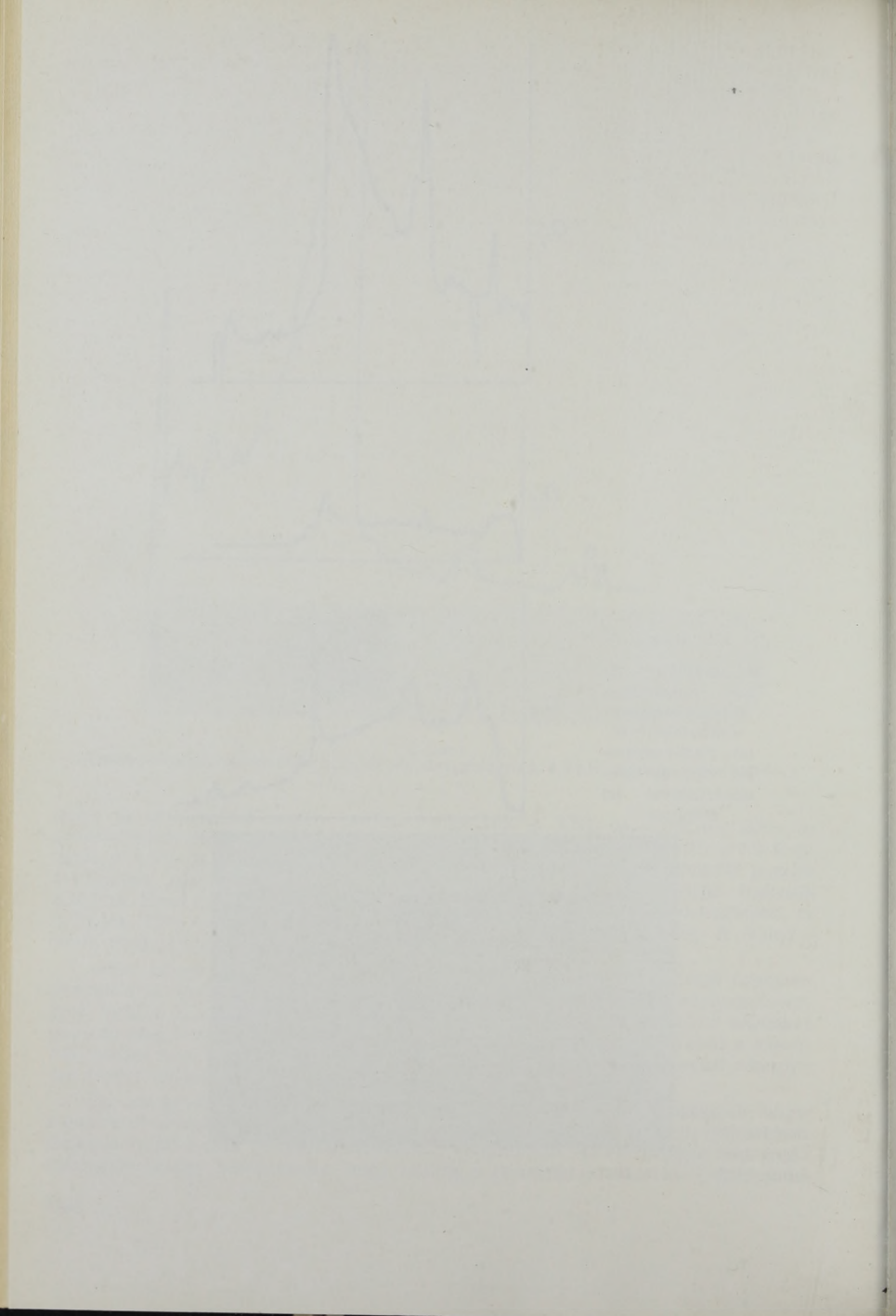
Az anyag oldhatósági viszonyainak vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a guanidin-hidroklorid + karbamid tartalmú pufferben gyorsabban és teljesebben oldódik, mind a csak guanidinhidroklorid tartalmában. Az előzőekben leírt eredményeket ez úgy befolyásolta, hogy mindig a guanidinhidroklorid + karbamid



3. ábra

A „gradiens” gé-
len elválasztott
fehérjekomplex
amidofeketével
(a), PAS-reagens-
sel (b), és szu-
dánfeketével (c)
előhívva.





tartalmú oldószerben oldott minta adott határozottabb és kevésbé diffúz elválasztást. Ennek magyarázata az lehet, hogy a két anyag együttesen gyorsabban fejtí ki, mintegy kiegészíti egymás hatását azzal, hogy a fehérjeláncok kinyújtását fokozottabban elősegítik.

A TRITON nem-ions detergens hatása abban mutatkozott meg, hogy mindig a TRITON-os pufferben oldott anyag adta az előzőekben leírt kevesebb, de élesebben elvált fehérjefrakciót. Valószínűleg stabilabbá teszi a fehérjekomplexekben levő kötéseket és így kevesebb frakció szakadhat le az összetételben szereplő más vegyületekről.

SDS anionos detergens tartalmú pufferben oldott anyag a guanidinhidroklorid + karbamid tartalmú pufferben oldott anyaghoz képest nem mutatott változást. Ugyanannyi frakciót kaptunk a bázikus és savas pH-tartományban, adott gélkoncentráció mellett, mint a guanidín-hidroklorid + karbamid esetében. A SDS jellegénél fogva szétszakítja a komplexet összetartó kötéseket.

A búzalisztból előállított fehérjekomplexek poliakrilamidgél elektroforézises elválasztására végzett eddigi vizsgálatainkból megállapítható, hogy a megfelelően megválasztott kísérleti körülmények során eredményes frakcionálást lehet elérni. Az elválasztások további finomítása és az egyes frakciók vizsgálata folyamatban van. Az elért eredményekről a későbbiek folyamán számolunk be.

IRODALOM

- (1) Lászlóty R. *Nedelkovits J. és Varga J.*: Élelmezési Ipar. 24, 14, 1970.
- (2) Folch, és Lees, M.: *J. Biol. Chem.* 191, 807, 1951.
- (3) Dévényi T. és Gergely I.: *Aminosavak, peptidek, fehérjék.* Budapest, 1963.
- (4) Kiszely Gy. és Barka T.: *Gyakorlati mikrotechnika és hisztokémia.* Budapest, 1958.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ГЕЛЯ ПОЛИАКРИЛАМИДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФРАКЦИИ СЛОЖНОГО БЕЛКА ПШЕНИЧНОЙ МУКИ

Я. Неделкович и Дь. Телеки – Вамоши

Авторы занимались электрофорезом сложных белков геля полиакриламида выделенных из пшеничной муки. Определение проводили использованием разных базисных и кислых буферов, а также разных гелевых концентраций. На гелевом градиенте в буфере pH – 4,3, β – аланин – ледяной уксусной кислоте получили четыре хорошо определяемых фракции содержащих белок, углевод и липиды.

ANWENDUNG DER POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE ZUR TRENUNG DER KOMBINIERTEN PROT EINFRAKTION VOM WEIZENMEHL

J. Nedelkovits und Gy. Teleky – Vámosy

Das aus Weizenmehl extrahierte kombinierte Protein wurde einer Elektrophorese an Polyacrylamidgel unterworfen. Die Abtrennung der Fraktionen wurde bei Anwendung verschiedener basischer und saurer Puffersubstanzen, sowie verschiedener Gelkonzentrationen durchgeführt. Auf Gradiensgel in einem β -Alanin-Eisessig-Puffer vom pH 4,3 wurden vier, voneinander gut abtrennbare Fraktionen erhalten, die Protein, Kohlenhydrat und Lipid gleicherweise enthielten.

USE OF POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS FOR THE SEPARATION OF THE COMBINED PROTEIN FRACTION OF WHEAT FLOUR

J. Nedelkovits and Gy. Teleky - Vámosy

Combined protein extracted from wheat flour was subjected to polyacrylamide gel electrophoresis. Separations were carried out on using various alkaline and acid buffers and various gel concentrations. On gradient gel, in a β -alanine-glacial acetic acid buffer of pH 4.3, four fractions sharply separated from each other were obtained. These fractions contained protein, carbohydrate and lipid as well.

APPLICATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE EN GEL DE POLY-ACRYLAMIDE POUR SÉPARER LA FRACTION COMPLEXE DE LA FARINE DE FROMENT

J. Nedelkovits et Gy. Teleky-Vámosy

Les auteurs ont effectué l'électrophorèse en gel de poly-acrylamide, d'une protéine complexe extraite de la farine de froment. La séparation a été effectuée en utilisant des divers tampons acidiqes et basiques, ainsi que des diverses concentrations de gels. Dans un gel à gradient et un tampon bêta-alanine - acide acétique glacial du pH 4,3 on a obtenu 4 fractions bien séparées. Celles-ci contenaient également des protéines, des carbohydrates et des lipides.