Elektroforeza w żelu skrobiowo-mocznikowym glutelin i zeiny kukurydzy (*Zea mays*)

Starch gel-urea electrophoretic characterization of zein and glutelin in zeo maize (Corn)

J. DZIUBA, P. MASŁOWSKI

WSTĘP

Kontynuując badania nad kompleksem białek występujących w ziarnach kukurydzy (Masłowski 1962, 1968) przystąpiono do frakcjonowania jego składników a w szczególności zeiny i gluteliny.

Próby zastosowania metody elektroforezy w żelu skrobiowym wg Smithiesa (1955) do charakterystyki tych białek jak też modyfikacji Jonesa i innych (1963), bądź Poulika (1960), nie dały zadowalających wyników.

Celem więc niniejszej pracy było podjęcie systematycznych badań eksperymentalnych nad ustaleniem optymalnych warunków ekstrakcji i rozdziału tych białek w polu elektrycznym w żelu skrobiowo-mocznikowym.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Przygotowanie materiału

Do badań użyto ziarna kukurydzy odmiany „Wigor”. Materiał bezpośrednio po sprężeniu liofilizowano a następnie rozdrabniano z dodatkiem suchego lodu na młynku tarczowym. Uzyskaną mąkę przesiewano przez sito o przekroju oczek 0,0383 cm i odłuszczano 24 godziny n-butanolem nasyconym wodą w temperaturze 4°C. Suszono w ekzykatorze próżniowym i przechowywano w szczelnie zamkniętych słoikach.

2. Ekstrakcja zeiny

100 g odłuszczonej mąki mieszano cztery godziny w temperaturze 4°C z 1000 ml wody destylowanej (pozbawionej CO₂) i wirowano. Osad zawieszano w 800 ml 65% etanolu (v/v), mieszano przez noc w temperaturze 4°C i wirowano. Supernatant

zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 0°C do uzyskania gęstej papki, którą następnie wlewano wąskim strumyczkiem do 500 ml wody redestylowanej. Powstały osad odwirowano, przemywano dwukrotnie wodą i liofilizowano.

3. Ekstrakcja gluteliny

Pozostałą po ekstrakcji zeiny mąkę zawieszano w 500 ml 0,02 n NaOH i wykłócano przez 18 godzin w temperaturze 4°C . Po odwirowaniu, supernatant dializowano 48 godz. wobec wody destylowanej z dodatkiem paru kropli toluenu, zmienianej co 4 godziny, w temperaturze 4°C . Roztwór po dializie wirowano i osad liofilizowano.

4. Hydroliza skrobi

250 g handlowej skrobi ziemniaczanej „Superior” dekantowano dwukrotnie 2 litrami wody redestylowanej, sączono, przemywano kilkakrotnie acetonem i suszono w temp. $45-50^{\circ}\text{C}$. Następnie umieszczano w zlewce o objętości 1 litra i ogrzewano w termostacie do 37°C . Równolegle ogrzewano do tej samej temperatury 500 ml stężonego roztworu HCl w acetonie (5:495 v/v), w którym następnie zawieszano skrobię, dokładnie mieszano i hydrolizowano w temperaturze 37°C . Po 45 minutach wprowadzano do mieszaniny 250 ml 1 M octanu sodowego celem zahamowania hydrolizy. Mieszaninę sączono na lejku Büchnera. Osad skrobi przemywano kilkakrotnie wodą i pozostawiano na noc. Po tym czasie sączono, ponownie przemywano wodą, następnie kilkakrotnie acetonem i suszono w temp. $45-50^{\circ}\text{C}$.

Ryc. 1. Kuweta wraz z zatyczką do elektroforezy
Cuvette with the stopper for electrophoresis

a — ramka z plexiglasu; b — płytka szklana; c — przykrywka;
d — zatyczka

a — frame from plexiglass; b — glass plate; c — cover; d — stopper

5. Przygotowanie żelu skrobiowo-mocznikowego

21 g zhydrolizowanej skrobi wykłócano z 150 ml 1 n CH_3COOH i ogrzewano, energicznie mieszając, w zlewce na łaźni wodnej o temp. 72°C . Po wyklarowaniu żelu (ok. 15 min.) dodawano 6 M mocznika, całość dokładnie mieszano i ogrzewano do $80-85^{\circ}\text{C}$. Otrzymany żel skrobiowo-mocznikowy wylewano do formy z plexi-

glasu o wymiarach $25 \times 10 \times 0,3$ cm i po lekkim ostygnięciu zamykano płytką za pomocą ściskaczy śrubowych. Następnie do otworów przykrywy (znajdujących się w odległości 8 cm od brzegu anodowego) wprowadzano zatyczkę z 4 ząbkami (długości 1 cm, grubości 0,1 cm) (ryc. 1). Tak przygotowany żel pozostawiano na noc w temperaturze pokojowej.

6. Nanoszenie próbek

Po usunięciu przykrywy i zatyczki wprowadzano do otworów w żelu roztwór zawierający 3,5–7 mg preparatu białkowego.

Roztwory białek sporządzano w ten sposób, że zeinę rozpuszczano w buforze TRIS (0,0825 M TRIS – 6 n HCl, pH 8,7) z dodatkiem 0,1 M merkaptotetanolu i 8 M mocznika.

Glutelinę rozpuszczano w buforze TRIS z dodatkiem 6 M mocznika, 0,1 M merkaptotetanolu oraz kroplę 2% roztworu sublimatu. Tak sporządzone roztwory białek przed umieszczeniem na elektroforegram przechowywano przez noc w temperaturze 4°C .

7. Rozwijanie elektroforegramów

Po naniesieniu badanej próbki powierzchnię żelu przykrywano warstwą 5% parafiny w wazelinie ogrzanej do 50°C . Błoczek żelowy umieszczano na płycie metalowej chłodzonej bieżącą wodą. Końce błoczka łączono za pomocą pasków bibuły Whatman Nr 3 z naczyniami elektrodowymi (ryc. 2).

Ryc. 2. Schemat aparatu do elektroforezy
Scheme of apparatus for electrophoresis

a – chłodnica metalowa; b – blok żelowy; c – bibuła Whatman Nr 3; d – naczynia elektrodowe
a – metal cooler; b – starch block; c – filter paper Whatman No 3; d – dishes with electrodes

Elektroforegramy rozwijano 14 godzin przy zastosowaniu spadku potencjałów 22 V/cm.

8. Barwienie elektroforegramów

Po zakończonej elektroforezie, zdejmowano warstwę wazeliny i umieszczano płytkę żelową w 0,025% roztworze nigrozyny w mieszaninie 96% etanolu, kwasu octowego lodowatego, wody, w stosunku 5:1:5 (v/v). Po 17 godzinach nadmiar barwnika usuwano przepłukując żel 7% kwasem octowym w temp. 4°C aż do uzyskania mlecznej barwy tła.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Przy opracowaniu techniki rozdzielu gluteliny i zeiny metodą elektroforezy w żelu skrobiowo-mocznikowym przeanalizowano szereg czynników wpływających na zdolność rozdzielczą i jakość obrazu elektroforetycznego.

Jednym z podstawowych czynników jest właściwie przygotowany żel skrobiowy.

Poulik i Smithies (1958) przeprowadzając badania nad przydatnością do elektroforezy różnych rodzajów skrobi wykazali, że na jakość żelu wpływa przede wszystkim czas hydrolizy skrobi. Za krótko, względnie za długo hydrolizowana skrobia daje żele zbyt miękkie, ewentualnie lepkie i niezbyt elastyczne. Właściwy żel winien być twardy i stosunkowo kruchy.

Ryc. 3. Elektroforetyczny rozdział zeiny w zależności od buforu użytego do preparatyki żelu
Zein electrophoretic patterns in dependence on buffer used to gel preparations

a' – 1 N CH_3COOH + 6 M mocznik pH 3,5; b' – 0,17 M mleczan glinu pH 3,1 + 6 M mocznik; c' – 0,025 M kwas borowy + trójetanoloamina, pH 8 + 6 M mocznik; d' – 0,0825 M TRIS + 6 N HCl, pH 8,7 + 6 M mocznik
Elektroforeza w żelu skrobiowo-mocznikowym, 22 V/cm, 14 godzin

a' – 1 N CH_3COOH + 6 M urea without mercaptoethanol; a' – 1 N CH_3COOH + 6 M urea with mercaptoethanol; b' – 0,17 M aluminium lactate, pH 3,1 + 6 M urea with mercaptoethanol; c' – 0,025 M boric acid + triethanolamine, pH 8 + 6 M urea with mercaptoethanol; d' – 0,0825 M TRIS buffer + 6 N HCl, pH 8,7 + 6 M urea with mercaptoethanol; Starch-urea electrophoresis, 22 V/cm, 14 hr.

Przeprowadzając szereg prób z mączką ziemniaczaną „Superior” produkcji krajowej stwierdzono, że najlepszy żel uzyskuje się ze skrobi hydrolizowanej wg Kleczkowskiej (1967) acetonowym roztworem kwasu solnego w temp. 37°C w czasie 45 min.

Następnym krokiem było sprawdzenie przydatności różnych roztworów buforowych. Stosowano bufor: boranowy o pH 8 (0,025 M H_3BO_3 — trójetanoloamina) wg Kleczkowskiej (1967), TRIS o pH 8,7 (0,0825 M TRIS — 6 n HCl) wg Eltona i Ewarta (1964), mleczanowy o pH 3,1 (0,017 M mleczan glinu — kwas mlekowy) wg Jonesa i innych (1963) oraz 1 n kwas octowy.

Wyniki badań przedstawione na ryc. 3 i 4 wykazują, że najlepszy rozdział uzyskuje się na żelu sporządzonym z 1 n kwasem octowym z dodatkiem 6 M mocznika, pH 3,5. Stwierdzono poza tym, zgodnie z Poulikiem (1960), że dodatek mocznika wpływa korzystnie na zdolność rozdzielczą żelu skrobiowego, przy czym najlepsze efekty uzyskuje się przy stężeniu w granicach od 3 do 6 M. Wyższe stężenia wpływają tylko na zdolność „rozklejania” się żelu bez widocznej zmiany w obrazie

Ryc. 4. Elektroforetyczny rozdział gluteliny w zależności od buforu użytego do preparatyki żelu i od dodatku merkaptioetanolu

Glutelin electrophoretic patterns in dependence on buffer used to gel preparation and on mercaptoethanol addition

a — 1 n CH_3COOH + 6 M mocznik bez dodatku merkaptioetanolu; *a'* — 1 n CH_3COOH + 6 M mocznik z dodatkiem merkaptioetanolu; *b* — 0,17 M mleczan glinu, pH 3,1 + 6 M mocznik z dodatkiem merkaptioetanolu; *c* — 0,025 M kwas borowy + trójetanoloamina, pH 8 + 6 M mocznik z dodatkiem merkaptioetanolu; *d* — 0,0825 M bufor TRIS + 6 n HCl, pH 8,7 + 6 M mocznik z dodatkiem merkaptioetanolu

Elektroforeza w żelu skrobiowo-mocznikowym, 22 V/cm, 14 godzin

a — 1 N CH_3COOH + 6 M urea without mercaptoethanol; *a'* — 1 N CH_3COOH + 6 M urea with mercaptoethanol; *b* — 0,17 M aluminium lactate, pH 3,1 + 6 M urea with mercaptoethanol; *c* — 0,025 M boric acid + triethanolamine, pH 8 + 6 M urea with mercaptoethanol; *d* — 0,0825 M TRIS buffer + 6 N HCl, pH 8,7 + 6 M urea with mercaptoethanol; Starch-urea electrophoresis, 22 V/cm, 14 hr.

elektroforetycznym. Wyraźny natomiast wpływ — zarówno na jakość, jak i na stopień rozdzału zeiny i gluteliny — posiada merkaptotetanol o stężeniu 0,1 M wprowadzony do badanej próbki przed naniesieniem na elektroforegram i pozostawieniu jej na noc w temperaturze 4°C.

Wpływ merkaptotetanolu na rozdział gluteliny i zeiny ilustruje ryc. 4 i 5. Należy przy tym podkreślić, że w przypadku gluteliny należy wprowadzić do roztworu białkowego związek hamujący aktywność β -amylazy, która powoduje pojawienie się na elektroforegramach zacieków określonych w literaturze mianem „Fringh”.

Rys. 5. Elektroforetyczny rozdział zeiny w zależności od roztworu ekstrahującego i od dodatku merkaptotetanolu

Zein electrophoretic patterns in dependence on extracting solution and on mercaptoethanol addition

Białko ekstrahowane 65% etanolem i rozpuszczone: *a* — w buforze bez dodatku merkaptotetanolu; *a'* — w buforze z dodatkiem merkaptotetanolu; Białko ekstrahowane 60% izopropanolem i rozpuszczone: *b* — w buforze bez dodatku merkaptotetanolu; *b'* — w buforze z dodatkiem merkaptotetanolu; Białko ekstrahowane 95% etanolem i rozpuszczone: *c* — w buforze bez dodatku merkaptotetanolu; *c'* — w buforze z dodatkiem merkaptotetanolu

Elektroforeza w żelu skrobiowo-mocznikowym, 22 V/cm, 14 godzin, w buforze octanowym o pH 3,5

Protein extracted with 65% ethanol and dissolved: *a* — in buffer without mercaptoethanol; *a'* — in buffer with mercaptoethanol; Protein extracted with 60% isopropanol and dissolved: *b* — in buffer without mercaptoethanol; *b'* — in buffer with mercaptoethanol; Protein extracted with 95% ethanol and dissolved: *c* — in buffer without mercaptoethanol; *c'* — in buffer with mercaptoethanol; Starch-urea electrophoresis, 22 V/cm, 14 hrs. acetic buffer pH 3,5

Z opisanych przez Eltona i Ewarta (1962) inhibitorów β -amylazy najlepsze wyniki dał 2% roztwór sublimatu stosowany w ilości ok. 0,2 ml/1 ml roztworu białkowego.

Dalszym etapem badań było sprawdzenie przydatności różnych barwników do uwidoczniania plamek frakcji białkowych na elektroforegramach, jak też roztworów służących do wymywania barwnika z żelu skrobiowego.

Używano do barwienia nasyconego roztworu czerni amidowej 10 B w mieszaninie: metanol:woda:kw. octowy lodowaty (50:50:50) wg Smithiesa (1955), 0,1 % roztwór w 5 % kwasie octowym wg Jonesa i innych (1963) oraz 0,25 % roztwór w 5 % metanolu i 7 % kwasie octowym wg Blomendala (1960).

We wszystkich przypadkach, mimo stosowania różnych czasów barwienia (od 20 minut do 10 godzin) nie uzyskano zadowalających wyników.

Słabe powinowactwo barwnika do badanych białek można by tłumaczyć tym, że białka te zawierają stosunkowo mało (glutelina), względnie nie zawierają wcale (zeina) lizyny, której ϵ -aminowa grupa w pierwszym rzędzie jest odpowiedzialna za reakcję z sulfhydryłowymi grupami czerni amidowej.

Przeprowadzono poza tym próby barwienia nigrozyną, barwnikiem nadającym się wg Kohna (1958) do białek występujących w śladowych ilościach (10–70 μ g). Stosowano 0,05 % roztwór barwnika w mieszaninie metanol — woda — kwas octowy w stos. 5:5:1 wg Coulsona i Sima (1964) oraz 0,07 % roztwór w 2 % kwasie octowym wg Eltona i Ewarta (1964). Najwyraźniejsze frakcje uzyskano wywołując elektroforegram w 0,025 % roztworze nigrozyny w mieszaninie metanol — kwas octowy lodowaty — woda w stos. 5:1:5 przez 17 godz. w temperaturze pokojowej, szczególnie, gdy powszechnie stosowany metanol zastąpiono 96 % etanolem, który wykazał większą zdolność denaturującą białka niż metanol.

W przypadku roztworu płuczącego najlepszym okazał się 5–8 % roztwór kwasu octowego, gdy odbarwianie prowadzono w temp. 4–5°C. W roztworze tym można przechowywać elektroforegramy całymi tygodniami bez widocznych zmian w obrazie elektroforetycznym. Uzyskuje się przy tym ciemnoniebieskie prążki białek na mlecznym nieprzezroczystym tle, co w dużym stopniu ułatwia fotografowanie.

Przy opracowaniu techniki rozdziału elektroforetycznego zeiny i gluteliny, brano również pod uwagę rodzaj rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji tych białek a w szczególności zeiny. Stosowano ekstrakcję 65 % i 95 % etanolem i 60 % izopropanolem. Wyniki analiz przedstawione na rys. 4 i 5 wykazują, że najlepszy obraz i najwięcej frakcji uzyskuje się w przypadku ekstrakcji zeiny 60 % izopropanolem i 65 % etanolem, w przypadku gluteliny — 0,02 n wodorotlenkiem sodowym. Okazało się przy tym, że zeina jest białkiem heterogennym, złożonym z 7 frakcji (w tym cztery o dużym stężeniu i małej ruchliwości elektroforetycznej, trzy o znikomym stężeniu, lecz o dużej ruchliwości. Podobnie też glutelina jest agregatem pięciu mniejszych składników.

STRESZCZENIE

Opracowano metodę rozdzielania glutelin i zeiny ziarn kukurydzy przy zastosowaniu elektroforezy żelowo-skrobiowej, w oparciu o metodę Smithies i modyfikację Poulika i Jonesa.

Jako nośnik stosowano żel skrobiowy sporządzony z krajowej mączki ziemniaczanej „Superior” z dodatkiem 6 M mocznika.

Białka rozdzielano na aparacie własnej konstrukcji chłodzonym bieżącą wodą.

Stosowano bufor octanowy o pH 3,5 (1 n CH_3COOH + 6 M mocznik), spadek potencjałów 22 V/cm w czasie 14 godzin.

Elektroforegramy barwiono 0,025 % roztworem nigrozyny w mieszaninie 96% etanolu, kwasu octowego i wody w stosunku 5:1:5 (v/v) przez 17 godz., a nadmiar barwnika usuwano 7% kwasem octowym w temp. 4°C.

Uzyskano rozdział glutelin na 5 frakcji, zeiny zaś na 8 frakcji.

*Katedra Biochemii Żywności
W.S.R. w Olsztynie*

(Wpłynęło dnia 6.5.1969 r.)

SUMMARY

Method of separation of the maize glutelin and zein using starch-gel electrophoresis has been elaborated. This method is based on the Smithies method and the modification of Poulik and Jones. Starch gel made from the commercial potato starch „Superior” with the addition of 6 M urea was used as the carrier.

Proteins were separated in the apparatus of our construction cooled by the running water.

The acetic buffer pH 3,5 (1 n CH_3COOH + 6 M urea) was used (decrease of potentials 22 V/cm during 14 hours).

Electrophoregrams were stained using 0,025% nigroline solution in the mixture of 96% ethanol, acetic acid and water in the ratio 5:1:5 (v/v) during 17 hours. An excess of dye was removed by solution of 7% acetic acid in the temperature 4°C.

Five fractions of glutelin and 8 fractions of zein has been obtained.

LITERATURA

- Bloemendal H., 1960, J. Chromat. 3: 509.
Coulson C. B., Sim A. K., 1964, Nature 202: 1305.
Elton G. A. H., Ewart J. A. D., 1962, J. Sci. Fd. Agric. 13: 62.
Elton G. A. H., Ewart J. A. D., 1964, J. Sci. Fd. Agric. 15: 119.
Jones R. W., Babcock G. E., Taylor N. W., Dimler R. J., 1963, Cereal Chem. 40: 409.
Kleczkowska D., 1967, Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol. 15: 201.
Kohn A., 1958, Nature 181: 839.
Masłowski P., 1962, Genet. Polon. 3: 275.
Masłowski P., Smoczyńska K., Masłowska H., 1968, Acta Soc. Bot. Polon. 37: 493.
Poulik M. D., Smithies O., 1958, Biochem. J. 68: 636.
Poulik M. D., 1960, Biochim. Biophys. Acta 44: 390.
Smithies O., 1955, Biochem. J. 61: 629.