

Elektroforetická analýza isoenzymů v potravinářství

I. Konstrukce aparatury pro plošnou elektroforézu

V. ŠICHO, B. RUTOVÁ

Významnou oblastí enzymové analýzy, která skýtá rozsáhlé možnosti v potravinářské analytice, je oblast analýzy isoenzymů. V potravinářství se jí zatím jen zcela nepatrně využívá. Biosyntéza isoenzymů je geneticky regulována a je tedy možno podle výskytu určitých isoenzymů posuzovat i jednotlivé odrůdy potravinových surovin. Vzhledem k tomu, že jednotlivé isoenzymy vykazují i různou stabilitu, je možno podle postupného vymizení jednotlivých isoenzymů soudit i na stav příslušné tkáně.

V následující práci byla navržena aparatura pro elektroforetické dělení isoenzymů na polyakrylamidovém gelu, umožňující současně dělení většího počtu vzorků a jejich fotometrické vyhodnocení.

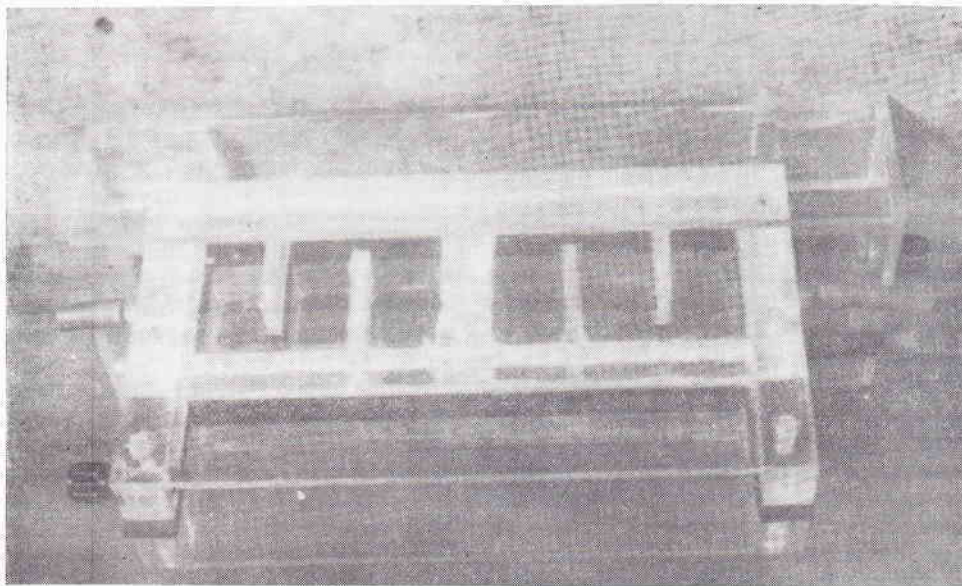
Dosud publikované aparatury pro elektroforézu na polyakrylamidovém gelu byly zkonstruovány buď pro diskovou elektroforézu, nebo elektroforézu plošnou, a to vertikální nebo horizontální. (1—4). Pro naši práci jsme použili systém plošné elektroforézy vertikální a navrhli aparaturu, při jejíž konstrukci jsme se soustředili na tyto základní prvky a požadavky:

1. Polymerace i elektroforéza probíhá ve stejném přístroji.
2. Gel je v průběhu elektroforézy účinně chlazen.
3. Je možno měnit sílu gelu.
4. Montáž i demontáž aparatury je jednoduchá.
5. Je možno současně analyzovat více vzorků.

Navržená aparatura umožňuje současnou analýzu 6—10 vzorků nebo při aplikaci jednoho vzorku na celou plochu gelu jeho různou detekci, případně jiné zpracování. Při současné analýze většího počtu vzorků jsou zajištěny stejné podmínky v každém proužku gelu. Proužky gelu nepředstavují zcela samostatnou jednotku a je zajištěna stejná pohyblivost identických zón. Výhodou plošné elektroforézy je možnost kvantitativního vyhodnocení elektroforeogramů na běžných densitometrech, zatímco pro kvantitativní vyhodnocení diskových elektroforeogramů je třeba speciálního densitometru.

Popis aparatury

Aparatura se skládá ze dvou symetrických dílů vyrobených z plexiskla, na styčných plochách vylepených těsnicí gumou. Mezi obě poloviny se vloží 4 kusy skla o rozměru 9,5 cm X 11,5 cm a síle 5 mm. Vzdálenost paralelně položených skel vymezují přepážky z plexiskla nebo obdobného materiálu, vložené mezi skla a určující zároveň sílu gelu. Takto připravené součásti se utáhnou osmi šrouby. Oba díly vytvoří po sešroubování v horní části nádobu na horní pufr, dvě paralelně umístěné dvojice skel s přepážkami vytvoří prostor pro tuhnutí gelu. Z druhé strany tvoří skla spolu s oběma základními díly komory pro průchod chladicí vody. Kompletní aparatura se vloží do nádoby se spodním pufrům. Široká základna zaručuje dostatečnou stabilitu aparatury a není tedy třeba žádného dalšího upevnění.



Obr. 1. Aparatura pro plošnou polyakrylamidovou elektroforézu.

Příprava gelů

Pro elektroforetickou analýzu používáme Davisova „třígelového“ způsobu přípravy gelů, při němž zaostření vzorku je založeno na principu změny iontů (5).

První gel ve směru pohybu iontů je t. zv. „sample gel“ nebo též zvaný vzorkový gel. Účelem tohoto gelu je fixovat analyzovaný vzorek tak, aby nedocházelo k premísení vzorku s horním elektrodovým pufrům (s nosným aniontem, v našem případě glycin⁻), a tedy k rozmazání zón.

„Sample gel“ je řidší gel s velkými póry. U vzorků, jejichž některé složky působí inhibičně na polymeraci, je možno „sample gel“ vynechat, ale je pak nutno věnovat větší pozornost aplikaci vzorku, resp. jeho převrstvení horním elektrodovým pufrům.

Dalším gelem je gel zaostřovací, t. zv. „spacer gel“. V tomto gelu s velkými póry nedochází k dělení, ale slouží jako fixační činidlo pro „čelní“ aniont (v našem případě Cl^-) a dochází v něm k zaostření na principu změny iontů.

Vlastní dělení pak probíhá ve třetím gelu, t. zv. gelu dělicím („small pore gel“), kde se látky dělí na principu různé pohyblivosti v elektrickém poli a síťového efektu.

Roztoky pro přípravu gelů

Tab. 1. Složení roztoků pro přípravu gelů

roztok	složení	pH	množství jednotlivých složek na 100 ml
A	1N HCl Tris* TEMED**	8,9	48,00 ml 36,6 g 0,23 ml
B	1N HCl Tris* TEMED**	6,7	48,00 ml 5,98 g 0,46 ml
C	akrylamid N, N'-metylen-bis-akrylamid		20,0 g 0,735 g
D	akrylamid N, N'-metylen-bis-akrylamid		10,0 g 2,5 g
E	riboflavin		0,004 g
F	sacharosa		40,0 g
G	persíran amonný		0,14 g
elektrodový pufr***	Tris glycin	8,3	6,0 g 0,14 g

* Tris = trishydroxymethyl-aminomethan

** TEMED = N, N, N', N'- tetramethylethyldiamin

*** takto připravený zásobní roztok se před použitím zředí destilovanou vodou 10 ×

Všechny zásobní roztoky pro přípravu gelů je nutno uchovávat v temnu a chladu. Roztoky E a G je nutno připravovat každý týden čerstvé, ostatní roztoky jsou stále jeden měsíc.

Polymerace

Aparaturu je nutno před sešroubováním umýt detergenčním prostředkem. Suchá aparatura se sešroubuje, spodní část se utěsní parafinem, pryží nebo plastelínou, či jinou hmotou, kterou je možno po zpolymerování gelu snadno odstranit. Před přípravou gelů je nutno aparaturu umístit do vodorovné polohy.

Polymerace dělicího gelu

Roztoky pro přípravu dělicího gelu se těsně před počátkem práce smísí v potřebném množství v následujícím poměru:

- 1 díl roztoku A
- 2 díly roztoku C
- 1 díl destilované vody
- 4 díly roztoku G

Po překontrolování pH (má být 8,9) se směs roztoků napipetuje do prostoru pro gel. Pak se opatrně převrství destilovanou vodou, čímž se zaručí rovný povrch gelu. Polymerace je při laboratorní teplotě skončena za 1 hodinu. Po dobu polymerace nesmí být s aparaturou hýbáno. Po skončené polymeraci se voda odsaje filtračním papírem.

Polymerace zaostřovacího gelu

Roztoky pro přípravu gelu se před použitím smísí v následujícím poměru:

- 1 díl roztoku B
- 2 díly roztoku D
- 1 díl roztoku E
- 4 díly roztoku F

Po smísení roztoků se překontroluje jejich pH (má být 6,7). Roztoky B, D, E lze uchovávat smísené v tmavé láhvi v lednici a před prací smísit s roztokem F. Směs se napipetuje na zpolymerovaný dělicí gel a opět převrství opatrně vodou. Polymerace je katalysována UV zářičem a je skončena asi za 30 minut. Zpolymerovaný zaostřovací gel opaleskuje. Po skončené polymeraci se voda opět odsaje filtračním papírem.

Polymerace vzorkového gelu

Vzorkový gel se připraví smísením roztoků B, D, E v následujícím poměru:

- 1 díl roztoku B
- 2 díly roztoku D
- 1 díl roztoku E
- 4 díly analyzovaného vzorku

Polymerace probíhá stejně jako u zaostřovacího gelu.

Vlastní elektroforéza

Po přípravě gelů se odstraní parafin či plastelína a aparatura se postaví do spodní nádoby s elektrodovým puřem. Vzorkový gel se převrství elektrodovým puřem, do kterého se přidá několik kapek 1% roztoku bromfenolové modři k viditelnému označení čela dělicích se látek. Spustí se chlazení a zapojí proud. Pro první hodinu se nastaví potenciální spád 12,5 V/cm, pro další hodiny se zvýší na 25 V/cm. Po skončení elektroforézy se vypne proud, odpojí chlazení a přístroj se rozebere. Plátky gelu se vyjmou k dalšímu zpracování.

Detekce bílkovin

Velkou výhodou polyakrylamidového gelu je jeho průzračnost, čírost a snadnost, s jakou se vybarvují části obsahující bílkoviny nebo jiné dělené látky. Protože polyakrylamidový gel neobsahuje reaktivní skupiny, je možno pro detekci analyzovaných látek použít široké palety barvicích metod. Obecně uznávaným činidlem pro detekci bílkovin v polyakrylamidovém gelu je amidočern ve vodném roztoku kyseliny octové (6,7). Amidočern se fysikálně váže na bílkoviny a tvoří modré zóny.

Námi používaný roztok pro detekci bílkovin má následující složení: 0,5 g amidočerni 10 B se rozpustí ve 100 ml 7% kyseliny octové a přefiltruje. Proužek gelu se vloží do detekčního roztoku na 1 hodinu, poté je nutno odbarvit pozadí vypíráním gelu v 7% kyselině octové. Odbarvování trvá u 1 mm silných plátek gelu přibližně 24 hodin. Během této doby je nutno roztok 7% kyseliny octové několikrát vyměnit.

Pro detekci enzymů v polyakrylamidovém gelu je možno použít barevných reakcí většiny kolorimetrických metod, které jsou používány pro určení aktivity příslušného enzymu.

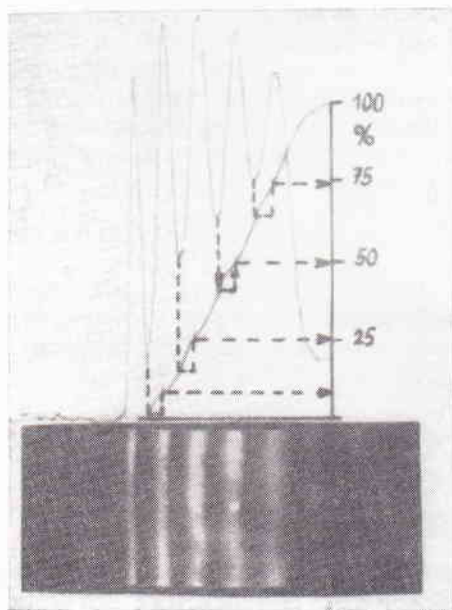
Sušení a skladování gelů

Po vybarvení gelů amidočerní či jinými detekčními činidly je možno gel skladovat v 7% kyselině octové nebo je možno gel sušit (8, 9, 10). Při sušení bez jakékoliv fixace dojde ke smrštění gelu, gel je křehký, praská a před dalším vyhodnocováním je nutno ho opět nabobtnat v 7% kyselině octové. Tento způsob uchovávání, v literatuře často uváděný jako vhodný, se nám neosvědčil. Nejlepší výsledky při sušení gelu jsme dosáhli jeho umístěním a fixací na pevné podložce tak, že měnil pouze svoji sílu, zatímco jeho podélné rozměry zůstaly zachovány.

Gel, u něhož byla provedena detekce, byl umístěn na dobře odmaštěné sklíčko a fixován převrstvením uniformní vrstvou 2,5% roztoku rozvařeného Difco agaru. Po ztuhnutí agaru byla sklíčka s gelem vložena do termostatu a sušena 2 hodiny při teplotě 40 °C. Dosoušení bylo prováděno při laboratorní teplotě. Takto usušený gel je možno neomezeně skladovat a je okamžitě použitelný jak k vizuálnímu, tak k densitometrickému vyhodnocení.

Densitometrické vyhodnocení gelů

Usušený gel, fixovaný na skle, se proměřuje na densitometru ERI-65 (Carl Zeiss, Jena). Přístroj nám současně zaznamenává integrační křivku, takže změřením její výšky nad základní osou v místech odpovídajících jednotlivým vrcholům je možno změřit údaj, odpovídající ploše vrcholu. Vezmeme-li celou výšku integrační křivky srovnávacího vzorku za 100 %, můžeme vypočítat % aktivity, odpovídající jednotlivým zónám nejen na stejném záznamu, ale i na záznamech dalších.



Obr. 2. Densitometrický záznam měření a způsob vyhodnocení elektroforeogramu

Souhrn

Byla zkonstruována aparatura pro plošnou elektroforézu a vypracována metodika elektroforetického dělení isoenzymů na polyakrylamidovém nosiči. Byla vypracována technika konečné úpravy vybarvených elektroforeogramů, umožňující přímé fotometrické kvantitativní vyhodnocení densitometrem seriové výroby ERI-65 (Carl Zeiss, Jena).

Literatúra

1. Raymond R.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 (1964) 350.
2. Lorber A.: J. Lab. Clin. Med. 64 (1964) 133.
3. Ritchie R. F., Harter J. G., Bayles T. B.: J. Lab. Clin. Med. 68 (1966) 842.
4. Akroyd P.: Anal. Biochem. 19 (1967) 399.
5. Davis B. J.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 (1964) 404.

6. Gordon H. A.: Biochem. J. 82 (1962) 531.
7. Reisfeld R. A., Lewis V. J., Williams D. E.: Nature 195 (1962) 281—293.
8. Assmat L.: Le Lait 467 (1967) 393.
9. Herrick E. H., Lawrence J. M.: Anal. Biochem. 12 (1965) 400.
10. Reid M. S., Bielecki R. L.: Anal. Biochem. 22 (1968) 374.

Электрофоретический анализ изоэнзимов в пищевой промышленности.

1. Конструкция аппаратуры для плоскового электрофореза в полиакриламидном геле.

Выводы

Была сделана конструкция прибора для плоскового электрофореза и разработан метод электрофоретической сепарации изоэнзимов в полиакриламидном геле. Была разработана техника окончательной обработки электрофореограмм, которая позволяет количественное перемеривание денситометром ЕРП-65. Метод является большой помощью для анализа пищевого материала.

Electrophoretic separation of isoenzymes in food

I. An apparatus for vertical flat-sheet electrophoresis

Summary

An apparatus is described which allows acrylamide gel electrophoresis to be carried out on a thin flat gel sheet in a vertical position. The apparatus is simple and easy to use. A technique for the electrophoretic separation of isoenzymes is proposed. It is outlined a procedure for drying of the gel sheet which is suitable for densitometric evaluation.