



УДК 547.962.7 : 543.544.2

СЕЛЕКТИВНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ω -ГЛИАДИНОВ ПШЕНИЦЫ
МЕТОДОМ КОВАЛЕНТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Егоров Ц. А., Одинцова Т. И., Созинов А. А.

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Академии наук СССР, Москва

Описан метод селективного выделения ω -глиадинов из сложной смеси спирторастворимых белков эндосперма пшеницы с помощью ковалентной хроматографии, основанный на отсутствии у ω -глиадинов остатков цистеина и (или) цистина. Белки спирторастворимого экстракта после восстановления и обессоливания с помощью обращенно-фазовой хроматографии иммобилизуют на тиопропил-сефарозе 6В при рН 4—6 в присутствии 6 М гуанидинийхлорида. В этих условиях все цистеинсодержащие белки ковалентно связываются с носителем, тогда как не содержащие цистеин ω -глиадины остаются в растворе и могут быть непосредственно проанализированы ВЭЖХ или электрофорезом. Метод пригоден для выделения и анализа этой группы белков, исходя из одной зерновки.

Запасные белки злаков представляют собой важную группу растительных белков, отличающихся значительной гетерогенностью и большим генетически детерминированным полиморфизмом. В зерновке пшеницы методами электрофореза обнаружено несколько десятков запасных белков [1], которые в прорастающем семени служат источником аминокислот и аминного азота. В мировом производстве растительных белков белки пшеницы составляют $\sim 70\%$. Детальный биохимический анализ запасных белков пшеницы, ведущей сельскохозяйственной культуры, имеет важное значение для селекции, решения многих теоретических проблем эволюции и генетики растений, а также для совершенствования технологии хлебопечения и производства макаронных изделий. Полиморфизм глиадинов уже сейчас успешно используется в селекционной практике для идентификации сортов, маркирования отдельных хромосом, в том числе кодирующих хозяйственно ценные признаки, и в систематике для выяснения эволюционных связей между видами.

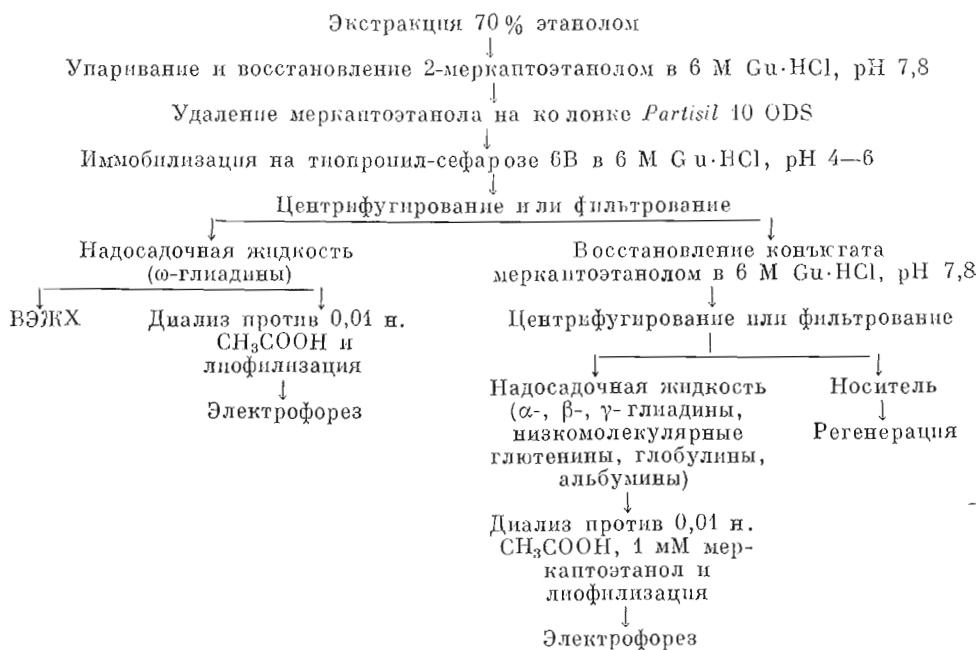
С химической точки зрения запасные белки представляют собой особый класс белков. Они богаты глутамином, пролином, гидрофобными аминокислотами, но содержат мало основных аминокислот. Поэтому они нерастворимы в воде или водных солевых буферах, но растворимы в средах, содержащих спирты, кислоты и щелочи. Их растворимость возрастает при добавлении детергентов, денатурирующих или восстанавливающих агентов. Запасные белки эндосперма пшеницы подразделяются на два типа: растворимые в водных растворах спиртов глиадины и нерастворимые глютенины; молекулярные массы входящих в эти группы полипептидов составляют 20—73 и 12—134 кДа соответственно [2]. Показано, что субъединицы глютенина полимеризуются друг с другом за счет образования дисульфидных мостиков, образуя гигантские молекулы с молекулярной массой 220 мДа [3]. Напротив, глиадины, которые по электрофоретической подвижности подразделяются на α , β , γ и ω -глиадины, не способны к такой полимеризации и, за исключением ω -глиадинов, имеют только внутримолекулярные дисульфидные связи.

В настоящее время генетика основных запасных белков пшеницы достаточно хорошо изучена. Было показано, что гены, контролирующие син-

Сокращения: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, EDTA-Na_2 — динатриевая соль диаминтетрауксусной кислоты, TFA — трифторуксусная кислота, ПААГ — полиакриламидный гель, SDS — додецилсульфат натрия, $\text{Gu} \cdot \text{HCl}$ — гуанидинийхлорид.

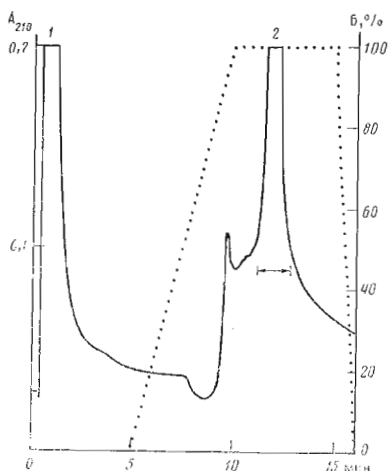
тез ω -, γ - и частично β -глиадинов, расположены на коротком плече хромосом 1А, 1В и 1D, где локализованы также гены, ответственные за синтез низкомолекулярных субъединиц глютеинов [4, 5]. В связи с этим важно сравнить между собой белки группы глиадинов, для того чтобы понять сложный механизм их наследования на уровне конечных продуктов экспрессии генов. Кроме того, ω -глиадины представляют самостоятельный интерес, так как в отличие от других запасных белков они не содержат остатков цистеина и (или) цистина и вносят определенный вклад в вязкостные свойства клейковины [6].

Целью настоящей работы явилась разработка эффективного метода выделения ω -глиадинов из смеси спирторастворимых белков эндосперма пшеницы сорта Безостая-1. Обычно для выделения ω -глиадинов используют методы гель-фильтрации и ионообменной хроматографии [7]. При этом для окончательного заключения о принадлежности выделенных фракций к ω -глиадинам требуется дополнительный анализ на предмет наличия в их составе остатков цистеина и (или) цистина, так как классификация запасных белков злаков, в том числе ω -глиадинов пшеницы, по данным электрофореза, достаточно условна. Чтобы исключить эти трудности, мы решили для выделения и идентификации ω -глиадинов применить ковалентную хроматографию, которая первоначально была предложена для очистки тиолзависимых ферментов [8]. В основе этого метода лежит реакция тиол-дисульфидного обмена, в результате которой цистеинсодержащие белки ковалентно связываются с носителем. Эти белки могут быть сняты с носителя путем восстановления дисульфидных связей. ω -Глиадины выделяли по следующей схеме:



В качестве носителя использовали тиопропил-сефарозу 6В, которая имеет емкость ~ 20 мкмоль/мл набухшего геля. Спиртовой экстракт после упаривания восстанавливали 5% раствором меркаптоэтанола в денатурирующих условиях. Перед иммобилизацией меркаптоэтанол и соли удаляли с помощью хроматографии на колонках с обращенной фазой Partisil 10-ODS ($3,2 \times 40$ мм), которая в ВЭЖХ обычно используется в качестве предколонки. После отмывания меркаптоэтанола (контроль по поглощению) восстановленные белки элюировали в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% ТФА (рис. 1). Восстановленные белки также могут быть элюированы с колонки 80% раствором ацетонитрила в 0,1% ТФА. Естественно, что удаление меркаптоэтанола и обессоливание после стадии восстановления может быть выполнено с помощью гель-фильтрации

Рис. 1. Обессоливание восстановленных глиадинов пшеницы сорта Безостая-1 на колонке (3,2 × 40 мм) с Partisil 10-ODS в градиенте ацетонитрила. 1 — меркаптоэтанол, соли; 2 — суммарный белок. Условия разделения — см. «Экспер. часть»



или обращенно-фазовой хроматографии на более крупнозернистом носителе (30 мкм и более) на обычном хроматографическом оборудовании, однако следует иметь в виду, что при анализе малых количеств белка эти методы мало пригодны. Предлагаемая же нами методика пригодна для очень малых количеств белка. Так, на рис. 1 показана кривая обессоливания восстановленных белков, экстрагированных из одного зерна пшеницы сорта Безостая-1. Для их выделения потребовалось немногим более 15 мин, а объем фракции белка составил ~2 мл. Используемый нами прием оказался настолько удобным и простым, что его можно рекомендовать для других белков.

Следующий этап выделения ω -глиадинов заключается в иммобилизации восстановленных белков на тиопротил-сефарозе 6 В. Хорошо известно, что реакция тиол-дисульфидного обмена происходит в широком интервале значений pH, быстро в щелочной среде и гораздо медленнее в кислой, однако в кислой среде вероятность протекания нежелательных побочных реакций гораздо меньше. Поэтому при иммобилизации мы поддерживали pH среды 4—6, но не ниже, так как при этом иммобилизация происходит не полностью. Электрофоретический анализ показал, что кроме ω -глиадинов все спирторастворимые белки, включая альбумины и глобулины, связываются с носителем (рис. 2). Подвижность α -, β -, γ -глиадинов при pH 3,1 после восстановления дисульфидных связей незначительно меняется вследствие изменения заряда, подвижность ω -глиадинов остается неизменной.

Для анализа ω -глиадинов мы использовали также ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой, которая успешно используется для анализа глиадинов [9]. Разделение осуществляли на колонке SynChropak RP-P, заполненной широкопористым силикагелем (300 Å) с привитой алкильной фазой C_{18} и размером частиц 6,5 мкм (рис. 3). Сравнение хроматограмм полученных до и после иммобилизации белков показывает, что ω -глиадины менее гидрофобны, чем α -, β - и γ -глиадины, которые элюируются при более высокой концентрации ацетонитрила, и в выбранных нами условиях выходят практически одним пиком, который может быть также расфракционирован при изменении формы градиента. Один из пиков, который находится в зоне ω -глиадинов и исчезает после иммобилизации, возможно, относится к альбуминам (рис. 3). Всего у пшеницы сорта Безостая-1 с помощью ВЭЖХ обнаруживается до 13 пиков, тогда как двумерным электрофорезом удается выявить ~8 пятен (рис. 2). В подобранных экспериментальных условиях время анализа ω -глиадинов из одной зерновки не превышает 30 мин. Другое преимущество предлагаемого метода заключается в том, что интересные белки могут быть легко выделены для последующего изучения. При этом для белков достаточно большой молекулярной массы (M_r ω -глиадинов пшеницы Безостая-1 составляет 52—67 кДа) достигается хорошее разделение.

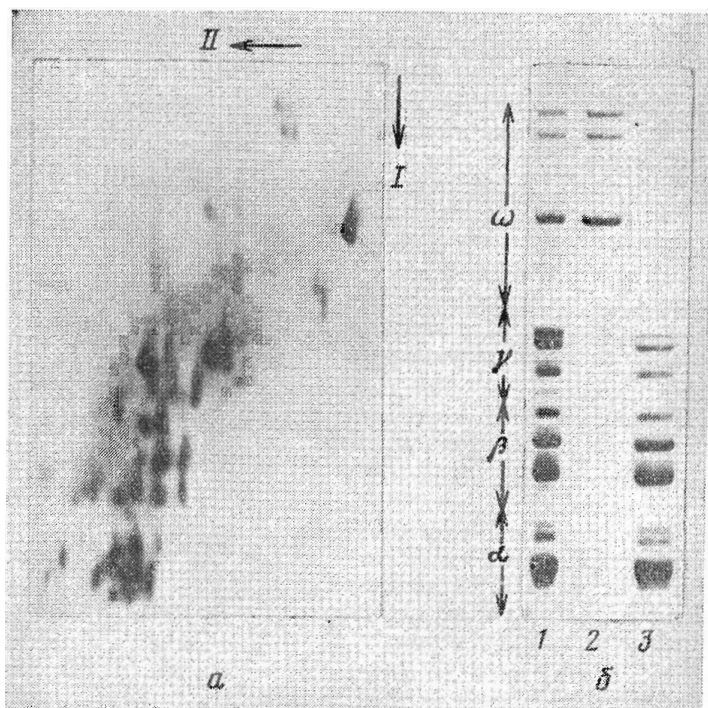


Рис. 2. Электрофореграммы спирторастворимых глиадинов пшеницы сорта Безостая-1. *a* — двумерный электрофорез; направление I — электрофорез в ПААГ при pH 3,4; направление II — электрофорез в ПААГ в присутствии SDS; *б* — одномерный электрофорез: 1 — суммарная фракция глиадинов, 2 — ω -глиадины, 3 — цистинсодержащие глиадины

Таким образом, разработанная нами методика позволяет решать ряд задач биохимии и генетического анализа ω -глиадинов пшеницы и других злаков. Пользуясь ею, можно достаточно быстро определить, какие из запасных белков имеют остатки цистеина и (или) цистина в своем составе, изучить гетерогенность ω -глиадинов и их генетически детерминированный полиморфизм. Методика рассчитана на выполнение массовых анализов и сравнительного изучения ω -глиадинов у различных растений, причем для анализа достаточно материала из одной зерновки.

Экспериментальная часть

В настоящей работе были использованы следующие реагенты и материалы: тиопропил-сефароза 6В и высокомолекулярная калибровочная смесь белков (Pharmacia, Швеция), трифторуксусная кислота и гуанидий-хлорид (Pierce Chem. Co., США), бикарбонат аммония и EDTA-Na₂ (Sigma, США); ацетонитрил марки «для хроматографии» (Merck, ФРГ); 2-меркаптоэтанол перегоняли в токе аргона; воду для ВЭЖХ очищали с помощью системы Milli Q (Millipore, США).

Для ВЭЖХ использовали хроматограф модели 322 МР (Altex, США), снабженный насосами модели 100 А и детектором с переменной длиной волны модели 40—155. Буферы дегазировали с помощью газообразного гелия.

Глиадины выделяли из мягкой пшеницы сорта Безостая-1. К 100 мг муки добавляли 0,5 мл 70% этанола и инкубировали при перемешивании в 1,5-мл пробирке для микроцентрифуг 60 мин при 18° С или 30 мин при 37° С. Смесь центрифугировали 5 мин при 6000 *g*. Полученный супернатант использовали для хроматографического и электрофоретического анализов и выделения ω -глиадинов.

Выделение ω -глиадинов. Для выделения ω -глиадинов спиртовой экстракт упаривали практически досуха на роторном испарителе. Остаток

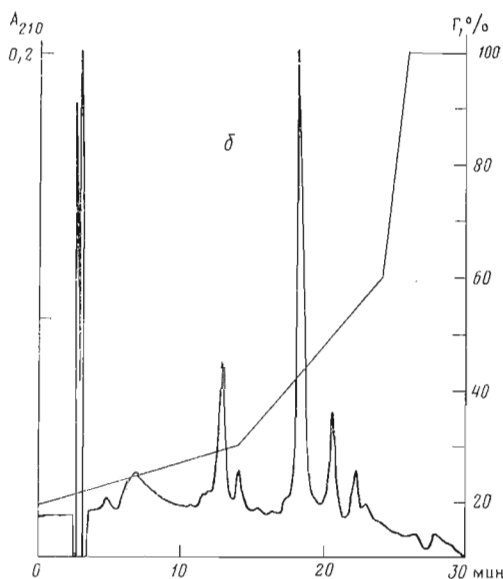
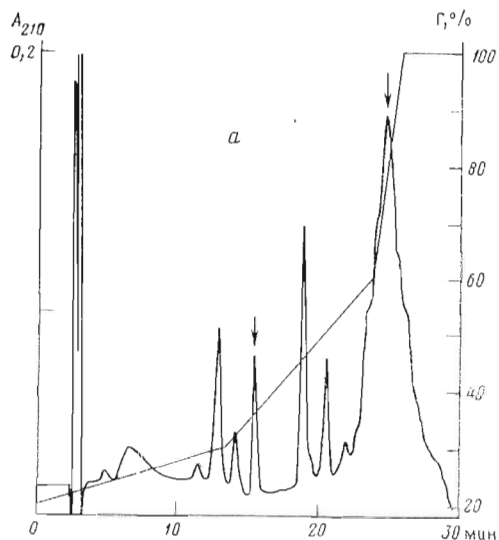
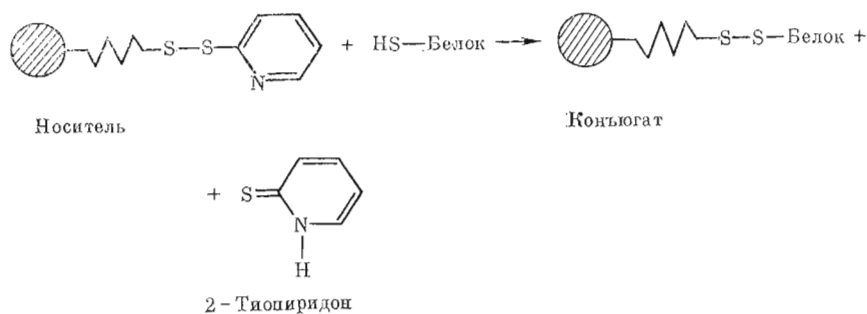


Рис. 3. Деление глиадинов пшеницы сорта Безостая-1 на колонке SynChromak RP-P: *a* — суммарная фракция глиадинов спиртового экстракта (стрелками отмечены пики, не относящиеся к ω -глиадинам); *б* — ω -глиадины, выделенные после иммобилизации белков спиртового экстракта на тиопропила-сефарозе 6 В. Условия разделения — см. «Экспер. часть»

растворяли в 250 мкл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, рН 7,8, содержащего 6 М $\text{Gu} \cdot \text{HCl}$ и 1 мМ EDTA-Na_2 , и добавляли 25 мкл 2-меркаптоэтанола. Смесь инкубировали 4 ч в атмосфере азота при 37° С. После центрифугирования отбирали ~220 мкл супернатанта, который наносили на колонку (3,2 × 40 мм) с Partisil 10 ODS (Alltech, США), предварительно уравновешенную буфером А. Разделение вели в следующем режиме: буфер А — 5 мин, линейный градиент (0—100%) буфера В в буфере А — 5 мин, буфер В — 5 мин, линейный градиент (0—100%) буфера А в буфере В — 1 мин, далее колонку уравновешивали буфером А — 3 мин. Скорость элюции 1 мл/мин, 18° С. Детекцию осуществляли при 210 и 254 нм. Буфер А — 0,1% водная ТФА, буфер В — 80% ацетонитрил в 0,1% водной ТФА.

Фракции, содержащие белок, нейтрализовали разбавленным аммиаком до рН 3—4 и упаривали на роторном испарителе практически досуха.

Остаток немедленно растворяли в 500 мкл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, содержащего 6 М $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$ и 1 мМ $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$, pH среды при необходимости доводили до 4—5. Смесь инкубировали с ~ 200 мкл тиопропилсефарозы 6 В, предварительно уравновешенной тем же буфером, в атмосфере азота при мягком перемешивании на ротамиксере или встряхивателе в течение 15 ч при 18° С. По окончании иммобилизации надосадочную жидкость отбирали пастеровской пипеткой, в кончик которой помещали вату или стекловату. Таким путем удается собрать 410—430 мкл раствора, который после центрифугирования использовали для анализа ВЭЖХ. Для анализа электрофорезом часть раствора диализовали против 0,1 н. уксусной кислоты и лиофилизовали.



Тиопропилсефарозу 6В тщательно промывали примерно 20 объемами 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, содержащего 6 М $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$ путем «обратного» фильтрования с помощью капилляра с впаянным пористым фильтром. Затем добавляли 500 мкл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, содержащего 6 М $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$ и 1 мМ $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$, 50 мкл 2-меркаптоэтанола и инкубировали в атмосфере азота при 18° С и перемешивании в течение 30 мин. По окончании реакции надосадочную жидкость отбирали как описано выше, диализовали против 0,1 н. уксусной кислоты, содержащей 1 мМ 2-меркаптоэтанол, лиофилизовали и использовали для электрофоретического анализа.

Разделение ω -глиадинов осуществляли на колонке SynChropak RP-P (SynChrom, США) размером 4,1 \times 250 мм.

Предколонку (4,6 \times 40 мм) заполняли сухим способом, используя носитель RSC этой же фирмы. Белки разделяли в градиенте концентрации буфера Г (80% ацетонитрил в 0,1% водной TFA) в буфере В (15% ацетонитрил в 0,1% водной TFA), концентрацию буфера Г меняли следующим образом: 0—20% буфера Г — 1 мин, 20—30% — 13 мин, 30—60% — 10 мин, 60—100% — 2 мин, буфер Г — 4 мин. Далее элюировали линейным градиентом буфера В в буфере Г (0—100%) — 1 мин и уравнивали колонку буфером В—8—10 мин. Скорость элюции 1 мл/мин, детектировали при 210 нм.

Одномерный электрофорез глиадинов выполняли как описано в работе [10] при pH 3,1, но с использованием 6% геля толщиной 1,5 мм в вертикальной камере (ЛКВ, Швеция) с размером пластин 18 \times 16 см при 580 В в течение 90 мин. Гели окрашивали 0,1% раствором кумасси R-250 в 15% трихлоруксусной кислоте. Двумерный электрофорез выполняли по модифицированной методике, приведенной в работе [11]. Электрофорез в первом направлении выполняли как описано выше. Затем вырезали полоску неокрашенного геля, промывали водой и уравнивали 2 ч в 0,0625 М трис-HCl-буфере, содержащем 5% 2-меркаптоэтанол, 10% сахарозу и 2% SDS, pH 6,8. Далее полоску геля насаивали на 10% полиакриламидный гель с SDS. Электрофорез во втором направлении вели при 150 В в течение 4 ч.

Молекулярные массы ω -глиадинов определяли электрофорезом в полиакриламидном геле с SDS.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jackson E. A., Holt L. M., Payne P. J. Theor. Appl. Gen., 1983, v. 66, № 1, p. 29—37.
2. Payne P. J., Rhodes A. P. In: Nucleic acid and proteins in plants. I. Structure, biochemistry and physiology of proteins/Eds Boulter D., Parthier R. Berlin — Heidelberg: Springer-Verlag, 1982, p. 346—365.
3. Wall J. S. In: Recent advances in the biochemistry of cereals/Eds Laidman D. L., Jones R. C. N. Y.: Acad. Press, 1979, p. 275—311.
4. Созинов А. А., Поперева Ф. А. Вестн. с.-х. науки, 1979, № 10, с. 21—34.
5. Payne P. J., Jackson E. A., Holt L. M., Law C. N. Theor. Appl. Gen., 1983, v. 67, № 2/3, p. 235—243.
6. Shewry P. R., Tatham A. S., Forde J., Mifflin B. J., Kasarda D. D. In: Gluten proteins/Eds Graveland A., Moonen J. H. E. Wageningen (Netherlands): TNO, 1984, p. 51—58.
7. Charbonnier L. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 359, № 1, p. 142—151.
8. Brocklehurst K., Carlsson J., Kierstan M. P. J., Crook E. M. Biochem. J., 1973, v. 133, № 3, p. 573—584.
9. Bietz J. A. J. Chromatogr., 1983, v. 255, p. 219—238.
10. Tkachuk R., Metlish V. J. Ann. Technol. Agric., 1980, v. 29, p. 207—212.
11. Новосельская А. Ю., Метакровский Е. В., Созинов А. А. Цитология и генетика, 1983, т. 17, № 5, с. 45—49.

Поступила в редакцию
28.V.1985
После доработки
9.X.1985

SELECTIVE ISOLATION OF WHEAT ω -GLIADINS BY COVALENT CHROMATOGRAPHY

EGOROV Ts. A., ODINTSOVA T. I., SOZINOV A. A.

*N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A covalent chromatography method for selective isolation of ω -gliadins from a complex mixture of alcohol-soluble proteins of wheat endosperm is described. The method capitalizes on the absence of cysteine and/or cystine residues in ω -gliadins. After reduction and desalting by reverse-phase chromatography, the alcohol-soluble proteins are immobilized on Thiopropyl-Sepharose 6B at pH 4—6 in the presence of 6 M guanidinium chloride. All cysteine-containing proteins under such condition are covalently bound to the support, while cysteine-lacking ω -gliadins remain in solution and can be directly analyzed by HPLC or electrophoresis. The method is suitable for isolation and analysis of such a group of proteins from a single kernel.