

Zakład Chemii Fizjologicznej, Instytut Chemii Podstawowych,
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Tomasz Borkowski

Maria SANECKA-OBACZ, Marek SACHARUK,
Piotr RADWAN

Prosta metoda wykrywania fosfoseryny i fosfotreoniny w białkach

Простой метод обнаружения фосфосерина и фосфотреонина в белках

A Simple Method for Detecting Phosphoserine and Phosphothreonine in Proteins

W poprzednich pracach stwierdzono obecność fosforu, a także intensywne wiązanie ^{32}P do różnych frakcji histonowych (7) oraz do zasadowych białek rybosomalnych (5). Możliwość zanieczyszczenia analizowanych białek fosforem pochodzenia nukleotyduowego, fosfolipidowego czy fosforanem nieorganicznym została wykluczona. Jednakże ostatecznym dowodem istnienia frakcji fosfoproteidowych w tych białkach byłoby stwierdzenie obecności fosfoseryny i fosfotreoniny.

Opisane w literaturze metody wykrywania fosfoseryny i fosfotreoniny były zbyt pracochłonne i nie dawały zadowalających wyników (2, 3, 9). Dlatego też postanowiono:

1. Opracować możliwie prostą technikę wykrywania fosfoseryny i fosfotreoniny w hydrolizatach białkowych.
2. Przeprowadzić próby wykrycia tych estrów w histonach i w zasadowych białkach rybosomalnych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły wzorcowe preparaty fosfoseryny (P-Ser) i fosfotreoniny (P-Thr), otrzymane preparatywnie w Zakładzie (10), kazeina produkcji BDH — Anglia oraz histony i zasadowe białka rybosomalne otrzymywane odpowiednio z jąder (8) i rybosomów (6) izolowanych z mózgu i wątroby 14-dniowych zarodków kurzych.

Do rozdzielania fosfoseryny i fosfotreoniny zastosowano elektroforezę na bibule Whatman nr 3. W celu ustalenia optymalnych warunków rozdzielania przeprowadzono badania porównawcze stosując jako bufony: 0,4 N HCOOH, pH 2,2, 3,2 N HCOOH,

pH 1,5 oraz 2,5% HCOOH i 7,8% CH₃COOH v/v *pH* 2,2. Z każdym buforem przeprowadzano elektroforezę zmieniając czas w zakresie 1–6 godz., gradient napięcia 8–20 V/cm oraz miejsce naniesienia próbki. Do wywoływania stosowano uniwersalny test ninhydrinowy (0,2% roztwór w acetonie) oraz test molibdenianowy w modyfikacji Saito i Akashi (4) o następującym składzie: 2 ml 70% HClO₄, 5 ml 8,3% molibdenianu amonu, 2 ml stęż. HCl, 40 ml CHCl₃, 20 ml eteru, 20 ml CH₃OH i 25 ml C₂H₅OH.

Każdy elektroforegram przecinano na dwa paski, z których jeden wywoływano ninhydriną i pozostawiano do wysuszenia w temperaturze pokojowej. Fioletoworóżowe plamy P-Ser i P-Thr pojawiały się zwykle po upływie 2–5 min. Drugi pasek zarzucało się w odczynniku molibdenianowym, suszono przez 3 min. w termostacie o temp. 50°C i naświetlano promieniami ultrafioletowymi (U.V. Lamp — Hanovia, Anglia) aż do momentu ukazania się niebieskich plam, świadczących o obecności fosforanów.

Warunki hydrolizy ustalano również eksperymentalnie. Próbki białka (1–4 mg) zatapiano w fiolkach szklanych z 3 N lub 6 N kwasem solnym i umieszczano w termostacie o temp. 100°C na 2 lub 4 godz.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przeprowadzone badania porównawcze wykazały, że najlepszy rozdział P-Ser od P-Thr jak również obu tych estrów od pozostałych składników hydrolizatu białkowego uzyskiwano w buforze mrówczanowo-octanowym, *pH* 2,2 w czasie 1 godz., przy napięciu 20 V/cm i natężeniu 1,25 mA/cm. Rozdzielane preparaty наносzono w linii środkowej elektroforegramu.

W tych warunkach estry fosforanowe seryny i treoniny oraz fosforan nieorganiczny migrowały do anody, natomiast wszystkie inne aminokwasy przesuwały się w kierunku katody. Typowe elektroforegramy przedstawia ryc. 1.

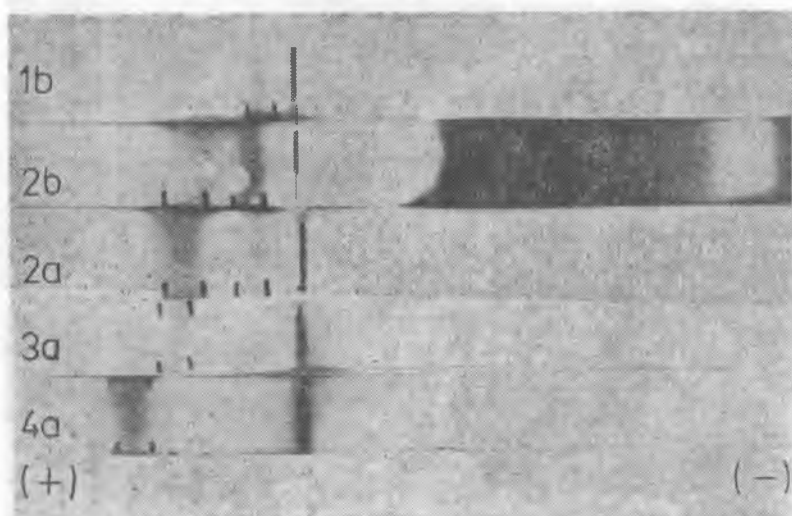
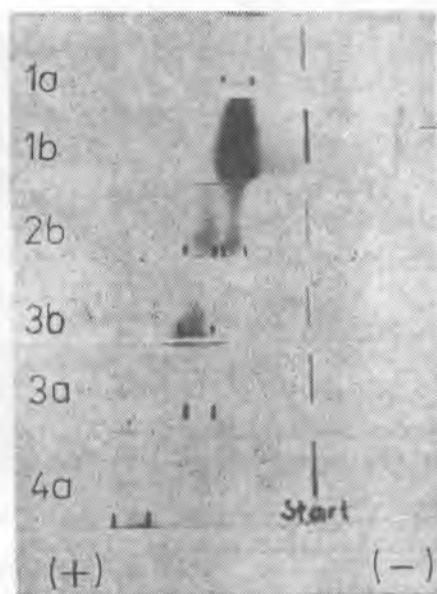
Paski „a” wywołano odczynnikiem molibdenianowym, paski „b” ninhydriną. Najmniejszą ruchliwość elektroforetyczną posiadała fosfotreonina, szybciej migrowała fosfoseryna, a najszybciej fosforan nieorganiczny. Dawało to w efekcie zadowalający rozdział tych związków.

Z przebadanych różnych wariantów hydrolizy, najkorzystniejsza okazała się hydroliza 4-godzinna z 3 N HCl. Przedłużenie czasu hydrolizy lub zwiększenie stężenia kwasu solnego powodowało częściowe rozłożenie estrów, co wyrażało się pojawieniem trzeciego prążka, odpowiadającego położeniu fosforanowi nieorganicznemu. Oczywiście prążki P-Ser i P-Thr były wówczas odpowiednio słabsze, a niekiedy zniknęły całkowicie. Natomiast skrócenie czasu lub obniżenie stężenia HCl dawało hydrolizę niepełną i wówczas nie wykrywano żadnych prążków.

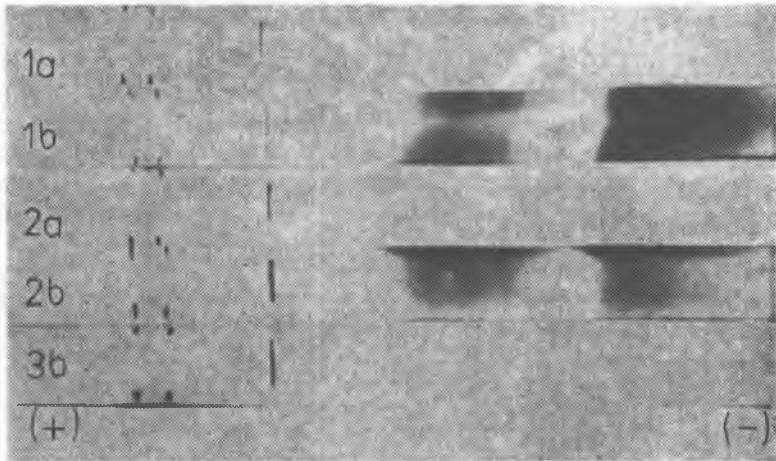
W optymalnych warunkach w hydrolizacie kazeiny wykrywano po stronie anodowej elektroforegramu dwa prążki odpowiadające fosfoserynie i fosfotreoninie (ryc. 2).

Ryc. 1. Elektroforegram preparatów wzorcowych; 1 (ab) — P-Thr, 2 (b) — P-thr i P-Ser, 3 (ab) — P-Ser, 4 (a) — P (fosforan nieorganiczny); wywoływane: a — odczynnikiem molibdenianowym, b — ninhydryną

Electrophoregram of standards; 1 (ab) — P-Thr, 2 (b) — P-Thr+P-Ser, 3 (ab) — P-Ser, 4 (a) — P (inorganic phosphate); stained with: a — molybdate reagent, b — ninhydrin

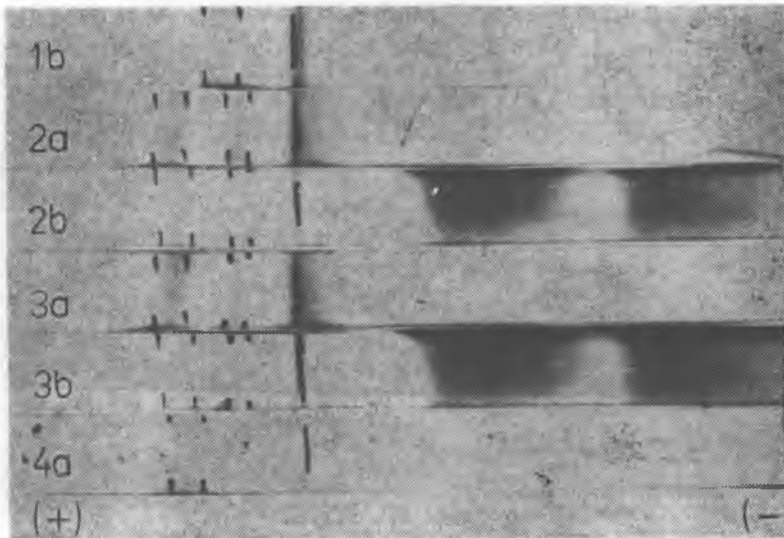


Ryc. 2. Elektroforegram hydrolizatu kazeiny; 1 (b) — P-Thr (standard), 2 (ab) — hydrolizat kazeiny, 3 (a) — P-Ser (standard), 4 (a) — P; a i b jak na ryc. 1
Paper electrophoresis of casein hydrolysate; 1 (b) — P-Thr (standard), 2 (ab) — casein hydrolysate, 3 (a) — P-Ser, 4 (a) — P; a and b as described in the legend to Fig. 1



Ryc. 3. Elektroforegram hydrolizatu histonów mózgowych i wątrobowych; 1 (ab) — hydrolizat histonów mózgowych, 2 (ab) — hydrolizat histonów wątrobowych, 3 (b) — P-Ser (standard); a i b jak na ryc. 1

Paper electrophoresis of brain and liver histones hydrolysate; 1 (ab) — brain histones hydrolysate, 2 (ab) — liver histones hydrolysate, 3 (b) — P-Ser; a and b as described in the legend to Fig. 1



Ryc. 4. Elektroforegram hydrolizatu zasadowych białek rybosomów mózgowych i wątrobowych; 1 (b) — P-Thr (standard), 2 (ab) — hydrolizat białek rybosomów mózgowych, 3 (ab) — hydrolizat białek rybosomów wątrobowych, 4 (a) — P-Ser (standard); a i b jak na ryc. 1

Paper electrophoresis of brain and liver ribosomal proteins hydrolysate; 1 (b) — P-Thr, 2 (ab) — brain ribosomal proteins hydrolysate, 3 (ab) — liver ribosomal proteins hydrolysate, 4 (a) — P-Ser; a and b as described in the legend to Fig. 1

Podkreślić należy, że P-Ser i P-Thr wykrywało w kazeinie wielu autorów (1, 9). W niniejszych badaniach zastosowano ją jako modelowy fosfoproteid do opracowania optymalnych warunków hydrolizy i sprawdzenia przydatności proponowanej metody rozdzielania fosfoseryny i fosfotreoniny do wykrywania ich w białkach.

Ryciny 3 i 4 przedstawiają kolejno elektroforegramy hydrolizatów histonów mózgowych i wątrobowych oraz zasadowych białek rybosomów mózgu i wątroby. Na elektroforegramach, wywoływanych zarówno ninhydryną, jak i odczynnikiem molibdenianowym, w analizowanych histonach wykrywano jeden prążek odpowiadający fosfoserynie, natomiast w zasadowych białkach rybosomalnych wykrywano dwa prążki odpowiadające fosfoserynie i fosfotreoninie. Tożsamość obu prążków potwierdzono przy pomocy markerów — wzorcowych preparatów P-Ser i P-Thr.

Brak prążka fosfotreoniny na elektroforegramach histonów nie wyklucza możliwości występowania tego estru w analizowanych białkach. Wiadomo bowiem, że częstość występowania reszt fosfotreoninowych jest mniejsza niż fosfoserynowych. Można jednak przypuszczać, że połączenie opracowanej przez nas metody z techniką izotopową (autoradiografią) pozwoli na wykrycie znikomych ilości fosfotreoniny, których nie udaje się stwierdzić testem ninhydrynowym i molibdenianowym.

Wnioski

1. Zastosowana technika elektroforezy średnionapięciowej do rozdzielania P-Ser i P-Thr jest znacznie mniej pracochłonna i czasochłonna niż metody opisane w literaturze.
2. Metoda ta może być stosowana do wykrywania P-Ser i P-Thr w hydrolizatach białkowych.
3. Wykazano obecność P-Ser w histonach oraz P-Ser i P-Thr w zasadowych białkach rybosomalnych mózgu i wątroby 14-dniowych zarodków kurzych.

PIŚMIENNICTWO

1. Agren G., Verdier C. H., Glomset J.: Acta Chem. Scand. 5, 324—325, 1951.
2. Kliensmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 1182—1189, 1966.
3. Murray K., Milstein C.: Biochem. J. 105, 491—495, 1967.
4. Saito K., Akashi S.: J. Biochem. (Japan) 44, 511—524, 1957.
5. Sanecka-Obacz M., Borkowski T.: VIII Zjazd PTBioch., 1970. Streszczenia D30, str. 79.

6. Sanecka-Obacz M., Borkowski T.: Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol. **21**, 709—712, 1973.
7. Stryjecka M., Borkowski T.: Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol. **19**, 173—178, 1971.
8. Stryjecka M.: Acta Biochim. Polon. **18**, 237—241, 1971.
9. Verdier C. H.: Acta Chem. Scand. **7**, 196—200, 1953.
10. Zając J.: Chem. Anal. **7**, 995—1006, 1962.

Otrzymano 24 VII 1978.

РЕЗЮМЕ

Разработан простой метод обнаружения фосфосерина и фосфотреонина в белках. Белки гидролизуют и распределено методом средневольтного электрофореза. В оптимальных, экспериментально установленных условиях, фосфосерин и фосфотреонин идентифицированы как отдельные фракции в анодной подвижности, в то же время остальные аминокислоты мигрировали к катоду.

При помощи этого метода установлено выступление фосфосерина в гистонах, а также фосфосерина и фосфотреонина в рибосомальных белках мозга и печени 14-дневных куриных эмбрионов.

SUMMARY

A simple method for the detection of phosphoserine and phosphothreonine in phosphoproteins has been elaborated. The samples of protein were gently hydrolyzed and then the electrophoresis was carried out. Under optimal conditions phosphoserine and phosphothreonine were identified as separate strips in the anodic part of the electropherogram, while the other amino acids moved to the cathode.

Thanks to this method it was possible to confirm the presence of phosphoprotein fractions in the histones and in the ribosomal basic proteins from the brain and liver of 14 days old chick embryos.