

Über den Einfluß des Redoxzustandes der löslichen Proteine von *Hordeum vulgare* auf deren elektrophoretische Trennung in Acrylamid-Gel

Studies in Separation of Soluble Protein from *Hordeum vulgare* in Acrylamide Gel
Columns under the Influence of a Varied Redox State

CONRAD POLTER und W. R. MÜLLER-STOLL

Institut für Kulturpflanzenforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Abt. Ökologische Pflanzenphysiologie, Potsdam

(Z. Naturforsch. **25 b**, 695—699 [1970]; eingegangen am 4. Dezember 1969)

The influence of some reducing agents and SH-reagents on the quality of the electrophoretic separation of soluble proteins from barley seedlings in acrylamide-gel was investigated. Admixture of 2-mercaptoethanol or 2,3-dimercaptopropanol produces sharp bands but splits disulfide bonds of the proteins. To avoid this, ascorbic acid together with cysteine can be used as antioxidants. Sulphite or pyrosulphite is unsuitable to protect barley seedling proteins against oxidation. Weakly active oxidizing agents for thiols like arsenite hardly influence the quality of protein separation. Stronger agents, however, for instance H_2O_2 , disturb band formation in the gel columns. Low concentrations of alkylating and mercaptide-forming agents promote the sharpness of the bands. With higher concentrations of SH-reagents derivatives from proteins and arise impede good protein separation in gel columns.

Änderungen des Redoxzustandes von Proteinen während einer Isolierung und elektrophoretischen Trennung beeinflussen das Ergebnis der Protein-Trennung. Deshalb wurden einige Stoffe, mit deren Hilfe bei bestimmten Objekten lösliche Pflanzenproteine bereits ohne nennenswerte Veränderung ihres natürlichen Redoxzustandes isoliert worden sind, auf ihre Anwendbarkeit bei der Trennung der Proteine von Wintergerste erprobt. Bei der Gewinnung von Protein-Extrakten zur Gelelektrophorese sind bisher vorwiegend folgende Antioxydantien verwendet worden: a) Gemische von Sulfit und Pyrosulfit¹, b) Cystein, Ascorbinsäure und Gemische von beiden Stoffen oder Gemische von Ascorbinsäure und Diäthyl-dithiocarbamat¹⁻⁷, c) Mercaptoäthanol, allein oder mit anderen Substanzen zusammen^{5, 6, 8-10}. Im folgenden werden Probleme besprochen, die sich mit diesen und weiteren Substanzen bei der Extraktion und Trennung von Proteinen aus Gerstenkeimlingen ergeben haben.

Material und Methode

Keimlinge der Wintergerste „Dominator“ wurden in Petrischalen unter Leuchtstoffröhren (Weißlicht, 8 : 16 Stdn., 65 cm Abstand, 18 °C) kultiviert. Dunkelkeimlinge wurden unter vergleichbaren Bedingungen angezogen. Aus Wurzeln, Koleoptilen und Blättern der Pflanzen wurden Proteine extrahiert. Die Extraktion und nachfolgende Trennung erfolgten, wie früher beschrieben¹¹ (Trennröhre 80 mm Länge, 5 mm lichte Weite). Abweichend von der früher verwendeten Technik wurden die Proteine in Sephadex G 200 auf die Trennsäule gegeben. Die Extrakte konnten danach ohne Dialyse und Konzentrierung getrennt werden. Spezifische Reagenzien wurden in abgestuften Konzentrationen dem Puffer vor der Protein-Extraktion zugesetzt (siehe Tabn. 1 u. 2). Der pH-Wert der Puffer wurde nach dem Auflösen der Reagenzien, soweit nötig, durch Tris-Lösung oder HCl auf pH 8,3 eingestellt.

Ergebnisse

1. Trennung von Proteinen in Gegenwart von reduzierenden Stoffen

Die verwendeten Reduktionsmittel (Tab. 1) erwiesen sich als unterschiedlich geeignet zum Schutz der

¹ V. LOESCHKE u. H. STEGEMANN, Z. Naturforsch. **21 b**, 879 [1966].

² R. C. STAPLES u. M. A. STAHMANN, Phytopathology **54**, 760 [1964].

³ M. A. STAHMANN, B. J. CLARE u. W. WOODBURY, Plant Physiol. **41**, 1505 [1966].

⁴ V. HADAČOVA u. J. SAHULKA, Biol. Plantarum [Prag] **9**, 396 [1967].

⁵ L. C. VAN LOON u. A. VAN KAMMEN, Phytochemistry **7**, 1727 [1968].

⁶ J. R. STAVELY u. E. W. HANSON, Phytopathology **57**, 482 [1967].

⁷ V. J. SAFONOV u. M. P. SAFONOVA, Fisiol. Rastenij (Moskau) **16**, 161 [1969].

⁸ J. BESEMER u. H. CLAUS, Z. Naturforsch. **23 b**, 707 [1968].

⁹ A. VAN KAMMEN, Arch. Biochem. Biophysics **118**, 517 [1967].

¹⁰ C. R. BHATIA, M. BUIATTI u. H. H. SMITH, Amer. J. Bot. **54**, 1237 [1967].

¹¹ C. POLTER, Z. Naturforsch. **22 b**, 340 [1967].

Proteine aus Gerstenkeimlingen gegen Oxydation. Gemische von Sulfit und Pyrosulfit, die Kartoffel-Protein zuverlässig vor Oxydation schützen¹ oder diese Verbindungen einzeln, sind als Oxydationsschutz der löslichen Proteine von Gerstenkeimlingen nicht geeignet (Abb. 1 a). Mit keiner Konzentration dieser Verbindungen wird die Schärfe der Protein-Banden verbessert oder die Intensität der Anfärbung der Säulenabschnitte zwischen den Banden verringert. Lösungen mit mehr als 2 mMol/l verringern sogar die Schärfe der Banden; bei den höchsten Konzentrationen (Tab. 1) werden einzelne Banden aufgelöst.

Verbindungen	Konzentrationsbereich mMol/l	Ergebnisse siehe Abb.
Sulfit	0,1 bis 50	1a
Pyrosulfit	0,1 bis 50	1a
Sulfit + Pyrosulfit	0,1 + 0,05 bis 20 + 10	1a
Cysteinhydrochlorid	1,3 bis 32	1b
Ascorbinsäure	1,1 bis 28	1b
Cysteinhydrochlorid + Ascorbinsäure	1,3 + 1,1 bis 32 + 28	1b
6.8-Thioctansäure	2,2 bis 22	1d
6.8-Thioctansäure + Ascorbinsäure	2,2 + 2,8 bis 22 + 28	1e
2.3-Dimercaptopropanol	0,5 bis 6	1c
2-Mercaptoäthanol	5 bis 500	2a, b

Tab. 1. Antioxydantien, angewendet bei der Isolierung und Trennung von Proteinen aus Gerstenkeimlingen.

Ascorbinsäure ist, besonders zusammen mit Cysteinhydrochlorid, als Oxydationsschutz für Gersten-

Proteine gut geeignet (Abb. 1 b). Mit steigender Konzentration des Reduktionsmittels werden die Banden schärfer. Durch 17 mM Ascorbinsäure + 19 mM Cys-HCl wird auch die Anfärbung der Gelsäulen zwischen den Banden vermindert. Als unerwünschte Nebenerscheinung vermindern diese Konzentrationen des Reduktionsmittels die Laufgeschwindigkeit der Banden. Das Protein-Spektrum bleibt hinsichtlich der Zahl der Banden und ihrer Anfärbbarkeit unverändert.

Durch Thioctansäure (TOS) werden die Protein-Banden ebenfalls schärfer; die Anfärbung der Säulen zwischen den Banden wird jedoch nur durch fast gesättigte Lösungen von TOS verringert (Abb. 1 d, e). In der katodischen Säulenhälfte werden optimale Trennbedingungen erreicht, in der anodischen tritt der TOS-Einfluß auf die Trennqualität weniger deutlich hervor. Bei Einwirkung von mehr als 17 mMol TOS/l zusammen mit mehr als 23 mMol Ascorbinsäure/l treten bei der Trennung der Gersteneiweißpräparate im katodischen Säulendrittel zwei neue, sehr schmale Banden auf, die durch andere Reduktionsmittel nicht erhalten werden konnten. Gleichzeitig verstärkt sich die Intensität einer Bande, die auch im nicht beeinflussten Spektrum vorhanden ist.

Mercaptoäthanol (MCÄ) verändert bei Proteinen aus Gerstenkeimlingen die Intensität bestimmter Banden geringer Mobilität und führt im katodischen Säulenbereich zur Ausbildung neuer Banden.

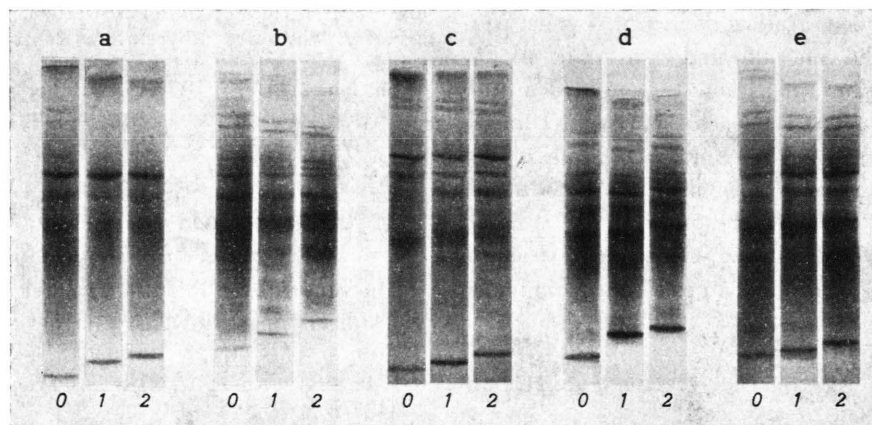


Abb. 1. Einfluß von Reduktionsmitteln in verschiedener Konzentration auf die elektrophoretische Trennung von Proteinen von Gerstenkeimlingen in Acrylamidgel (5-proz.). Die Säule 0 jeder Gruppe in Abb. 1-3 gibt eine Trennung von Protein wieder, welches ohne Zusatz eines Reagens isoliert wurde; von Säule 1 an erhöht sich die Konzentration der jeweiligen reduzierenden Substanz. — a) 1-2=8+4 bzw. 20+10 mMol Sulfit+Pyrosulfit pro l; b) 1-2=5,6+6,4 bzw. 28+32 mMol Ascorbinsäure+Cysteinhydrochlorid pro l, jeweils unter Zusatz von 20% Saccharose; c) 1-2=2,4 bzw. 4,8 mMol 2.3-Dimercaptopropanol; d) 1-2=11 bzw. 22 mMol 6.8-Thioctansäure; e) 1-2=4,4 bzw. 22 mMol 6.8-Thioctansäure unter Zusatz von 5,6 bzw. 28 mMol Ascorbinsäure/l.

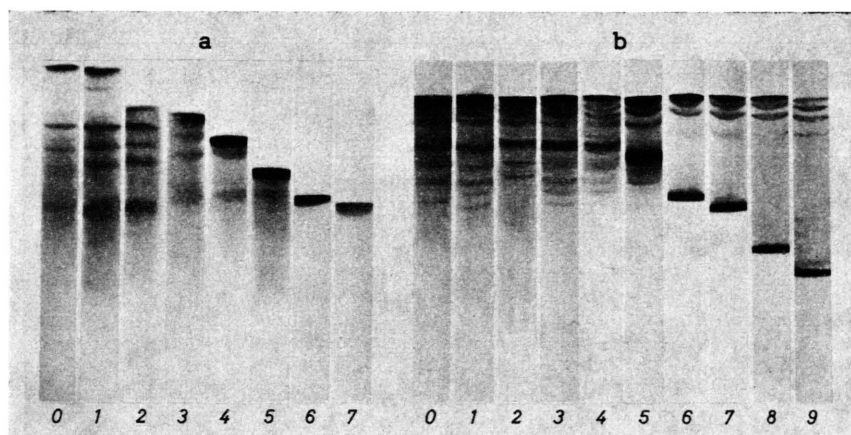


Abb. 2. Einfluß von 2-Mercaptoäthanol auf die elektrophoretische Trennung von Proteinen aus Gerstenkeimlingen in 5 (a) bzw. 10-proz. Acrylamidgel (b). Weitere Erklärungen siehe Abb. 1. — a) 1–7 = 50, 150, 175, 200, 300, 400 und 500 mMol; b) 1–9 = 5, 10, 20, 40, 100, 125, 200, 300 und 500 mMol Mercaptoäthanol/l.

Veränderungen dieser Art bewirkte MCÄ in den Protein-Spektren aller untersuchten Entwicklungsstadien von Gerstenkeimlingen. MCÄ verändert die Protein-Spektren von Licht- und Dunkelkeimlingen in etwas unterschiedlichem Maße. Mit steigender MCÄ-Konzentration werden die Spektren zunehmend stärker verändert. 5 mMol/l rufen gegenüber der Kontrolle bereits visuell feststellbare Änderungen hervor. Zunächst treten 1 bis 2 neue Banden auf; dann nimmt die Bandenzahl immer mehr ab. Nach Einwirkung von 100 bis 300 mM erscheint in 5-proz. Gel nur noch eine Bande, in der sich das Protein gesammelt hat. Auch in 10-proz. Gel lassen sich nur wenige Banden geringer Mobilität aus dieser Sammelbande abtrennen (Abb. 2 b). Die Veränderungen, die weniger als 10 mMol/l MCÄ hervorrufen, erkennt man in einer abgestuften Konzentrationsreihe leichter als bei Untersuchung der Ergebnisse einzelner Trennungen. Die Schärfe der Protein-Banden wird durch MCÄ deutlich verbessert und die Stärke der Anfärbung der Säulenabschnitte zwischen den Banden verringert.

In Anwesenheit von 2,3-Dimercaptopropanol (BAL) erhält man Protein-Spektren mit Banden gleich guter Schärfe wie durch MCÄ (Abb. 1 c). Die Intensität der Färbung der Säulenabschnitte zwischen den Banden wird durch BAL wenig beeinflusst. BAL verändert das Banden-Spektrum wie MCÄ. Es wirkt allerdings auf andere Protein-Banden ein als MCÄ. Intensitätsänderungen von Banden nach BAL-Einwirkung wurden hauptsächlich im mittleren Teil der Protein-Spektren beobachtet.

2. Trennung von Proteinen nach Extraktion durch Puffer mit SH-Reagenzien

Durch die folgenden Versuche wurde geprüft, wie Stoffe (Tab. 2), die SH-Gruppen oxydieren oder mit ihnen sonstwie reagieren, die Spektren von Gersten-Proteinen bei elektrophoretischer Trennung verändern. Durch schwache Oxydationsmittel, wie Arsenit (Abb. 3 a), wurde das Spektrum der Protein-Banden nicht verändert. Bandenzahl, Bandenschärfe und Intensität der Anfärbung der Abschnitte zwischen den Banden blieben unbeeinflusst. Mehr als 10 mMol Arsenit/l verminderten die Laufgeschwindigkeit der Proteine.

Verbindung	Konzentrationsbereich mMol/l	Ergebnisse siehe Abb.
Arsenit	0,1 bis 100	3a
Wasserstoffperoxyd	1,5 bis 150	3b
p-Chlormercuribenzoesäure	0,025 bis 4,7	3c
Monojodessigsäure	5 bis 500	3d

Tab. 2. SH-Reagenzien, angewendet bei der Isolierung und Trennung von Proteinen aus Gerstenkeimlingen.

Durch Einwirkung stärkerer Oxydationsmittel, wie H_2O_2 , wurden die Banden unscharf, verloren an Anfärbbarkeit, verlagerten sich und es fielen jeweils mehrere Banden zusammen (Abb. 3 b). 12 mM H_2O_2 führten zu gerade eben feststellbaren Veränderungen des Banden-Spektrums im katodischen Bereich. 90 mMol/l veränderten das gesamte Spektrum des katodischen Säulendrittels in der angegebenen Weise. Bei 120 mM H_2O_2 wurden Banden unscharf,

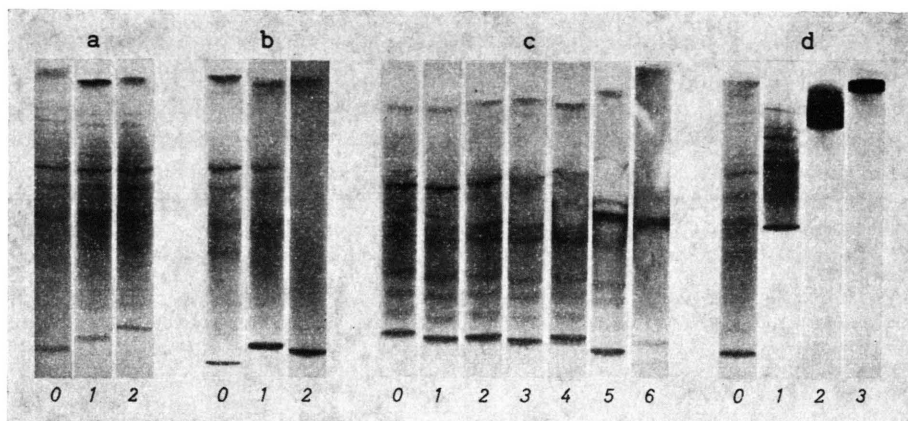


Abb. 3. Einfluß verschiedener SH-Gruppen-Reagenzien auf die elektrophoretische Trennung von Proteinen aus Gerstenkeimlingen. Weitere Erklärungen siehe Abb. 1. — a) 1–2 = 10 bzw. 100 mMol *Arsenit*; b) 1–2 = 120 bzw. 150 mMol *Wasserstoffperoxyd*; c) 1–6 = 0,2, 0,4, 0,6, 0,9, 1,9, 3,8 mMol *p*-Chlormercuribenzoessäure/l; d) 1–3 = 200, 300, 500 mMol *Monojodessigsäure*/l.

und im katodischen Säulendrittel fehlten sie. Bei 150 mM H_2O_2 war nur noch eine anodische Bande in den Säulen zu erkennen. An die Lage der übrigen Banden erinnerte nach Anfärbung der Säulen nur noch die unregelmäßige Farbstoffverteilung. Die wirksamen H_2O_2 -Konzentrationen lagen allerdings tiefer als angegeben, da die Extrakte Katalase- und Peroxydase-Aktivität aufwiesen.

Mercaptid-bildende Reagenzien, wie *p*-Chlormercuribenzoessäure (*p*-CMB) beeinflussten die elektrophoretische Trennung der Proteine deutlich, und zwar nachweisbar bereits ab 0,05 mMol/l (Abb. 3 c). In 0,4 mM *p*-CMB-Lösung waren im katodischen Säulendrittel alle Banden verformt und weniger anfärbbar. Mit steigender *p*-CMB-Konzentration verschwanden immer mehr Banden, zuerst im katodischen Säulendrittel. Bei einer Konzentration von 0,75 mM *p*-CMB wurden auch die Banden im mittleren Säulenbereich unscharf. Bei 2 mMol/l fanden sich nur im untersten Säulendrittel noch normale Banden, bei 2,5 mMol/l bildete sich eine Sammelbande aus, die alles Protein enthielt. Durch *p*-CMB-Konzentrationen bis 0,05 mMol/l wurden die Banden im anodischen Säulendrittel schärfer als bei den Kontrollen.

Alkylierung der Proteine, z. B. Carboxymethylierung durch Monojodessigsäure (MJE) führt ebenfalls zu starken Veränderungen der Protein-Spektren. 30 mM MJE verändern das Protein-Spektrum noch nicht qualitativ oder quantitativ. 40 mM verringern zunächst die Wanderungsgeschwindigkeit der Banden. Bei Einwirkung bis 100 mMol MJE/l nimmt

die Bandenschärfe im anodischen Säulendrittel zu, aber die Anfärbbarkeit der Banden im katodischen Säulenabschnitt bereits ab. Durch mehr als 100 mM MJE wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine stark verringert. Durch 200 mM wird sie sogar auf die Hälfte herabgesetzt. Nach Einwirkung von 300 mM dringt das Protein während einer für eine normale Trennung ausreichenden Zeit nur 6 bis 7 mm in das Gel ein. Bei 500 mM entsteht eine Sammelbande, die extrem langsam wandert.

Diskussion

Änderungen des Redoxzustandes treten bei löslichen Proteinen von Pflanzen während ihrer Isolierung und elektrophoretischen Trennung leicht auf. Hierfür sind hauptsächlich Sekundärstoffe und Oxydasen, die bei der Zerstörung der Zellkompartimente auf das Protein einwirken können, verantwortlich. Soll die oxydative Veränderung des Proteins während der Isolierung und während der Trennung durch Reduktionsmittel unterbunden werden, besteht die Gefahr reduktiver Spaltung von Disulfidbrücken. Unter den als Oxydationsschutz benutzten Reduktionsmitteln hat sich z. B. bei manchen pflanzlichen Objekten Mercaptoäthanol bewährt⁸. Für die Isolierung von Proteinen von Gerstenkeimlingen ist dieser Stoff als Antioxydans nicht geeignet, obwohl die Schärfe der Banden verbessert wird; denn bereits bei Puffern mit 5–10 mMol MCÄ/l traten neue Banden auf. Der Vergleich mit der Wirksamkeit höherer MCÄ-Konzentrationen zeigt, daß reduktive

Veränderung der Proteine sicher auch bereits bei niederen Konzentrationen die Ursache für das Auftreten neuer Banden ist. Auch 2,3-Dimercaptopropanol ist als Antioxydans nicht besser geeignet als MCÄ. Sulfit und Pyrosulfit, die sich bei Pflanzengewebe mit hohem Phenoloxydase-Gehalt bewährt haben¹, verbessern ebenfalls das Ergebnis von Trennungen von Gersten-Proteinen nicht. Von allen getesteten Stoffen hat sich als Antioxydans bei der Isolierung und Trennung von Gersten-Proteinen Ascorbinsäure zusammen mit Cysteinhydrochlorid am besten bewährt. Die von verschiedenen Autoren^{2, 4, 5, 7} verwendete Konzentration von 0,1% ist auch für Gersten-Proteine geeignet. Wesentlich ist, daß durch Ascorbinsäure keinerlei Veränderungen in den Protein-Spektren der verschiedenen Organe von Gerstenkeimlingen bewirkt wurden.

Da geringe Konzentrationen alkylierender und mercaptid-bildender Reagenzien durch Maskierung der SH-Gruppen ebenfalls die Schärfe eines Teiles der Protein-Banden verbessern, darf man als sicher

annehmen, daß die Qualität der elektrophoretischen Trennung von Pflanzen-Proteinen vor allem durch Veränderung ihres Redoxzustandes beeinflusst wird. Da schwache Oxydationsmittel die Schärfe der Banden von Gersten-Proteinen gegenüber den Kontrollen ohne Zusätze nicht nennenswert verschlechtern, stärker oxydierend wirkende Stoffe, wie H_2O_2 , aber die Bandenausbildung stark beeinträchtigen, werden Gersten-Proteine in gewissem Umfang wohl stets schon bei der Isolierung und Trennung ohne Oxydationsschutz oxydiert. Andererseits besteht jedoch keine Sicherheit, daß nach Benutzung von Antioxydantien bei der Extraktion das gewonnene Protein in einem annähernd natürlichen Redox-Zustand vorliegt.

Für sorgfältige technische Mitarbeit danken wir Frau GUNDULA KRETSCHMANN und Frl. BIRGIT WEISE, Frau CHRISTA POLTER für die Herstellung der photographischen Reproduktionen und die Montage der Abbildungsvorlagen.