

JACEK WAGA <sup>1</sup>  
JERZY ZIENTARSKI <sup>1</sup>  
MACIEJ SZALENIEC <sup>2</sup>  
ANDRZEJ SKOCZOWSKI <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB

<sup>2</sup> Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN

<sup>3</sup> Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN

## Efektywność wykorzystania kolumn chromatograficznych typu „Poroshell” w badaniach białek gliadynowych metodą RP-HPLC\*

### Efficiency of Poroshell type chromatographic columns for wheat gliadin separation using RP-HPLC

Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconej fazie (RP-HPLC) jest efektywną metodą analizy polimorficznych białek roślin uprawnych, w tym również białek zapasowych zbóż. Możliwość jej powszechnego wykorzystania w hodowli roślin ogranicza jednak znaczny koszt aparatury, wyposażenia i odczynników. W ostatnich latach opracowano nowy rodzaj kolumn chromatograficznych o złożach C18 osadzonych na powierzchniowo porowatej krzemionce (tzw. Fused-Core technology). Główną zaletą tych kolumn jest wysoki wzrost zdolności rozdzielczej (zwiększenie ilości tzw. pól teoretycznych), co daje możliwość znacznego skrócenia czasu, a tym samym obniżenia kosztów analizy. Celem badań było oszacowanie dokładności i efektywności rozdzielania polimorficznych białek gliadynowych metodą RP-HPLC przy użyciu kolumn typu Fused-Core w porównaniu do kolumn C18 o klasycznych parametrach ziaren krzemionki. Materiał roślinny stanowiły linie mieszańcowe pszenicy ozimej różniące się pod względem alleli kontrolujących syntezę gliadyn. Analizowano pary blisko spokrewnionych linii mieszańcowych, z których jedna zawierała null allel natomiast druga stanowiła genotyp kontrolny. Porównywano także rozdziały mieszańców z ich komponentami rodzicielskimi. Punktem odniesienia dla oceny obrazów chromatograficznych kolumny typu Fused-Core — 300SB-C18 Poroshell były rozdziały uzyskane na tradycyjnej kolumnie SB300 Zorbax C18. Wyniki badań potwierdziły, iż analiza chromatograficzna gliadyn na kolumnie Poroshell jest metodą szybką i ekonomiczną. Wysokiej jakości obrazy rozdzielonych białek uzyskiwano już w czasie 8 minut. Jednakże krótki czas rozdzielania obniżył ich rozdzielczość, jedną z najważniejszych zalet chromatografii RP-HPLC. Wyniki badań sugerują, iż kolumny typu Fused-Core mogą być przede wszystkim efektywnym narzędziem selekcji masowej natomiast tradycyjne kolumny, pozwalające

\* Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2010–2013 jako projekt badawczy Nr N N310 162238

identyfikować subtelne szczegóły obrazu chromatograficznego, mogą okazać się bardziej przydatne w badaniach genetycznych np. w analizie rozszczepienia genów kontrolujących syntezę białek prolaminowych.

**Słowa kluczowe:** białka gliadynowe pszenicy, RP-HPLC, Poroshell, Zorbax C18

RP-HPLC is an efficient tool for wheat storage proteins separation. Its extensive utilization in plant breeding is limited, however, by heavy expenses of apparatus, equipment and reagents. Recently a new type of chromatographic columns was introduced where stationary phase is based on the superficially porous silica (so called Fused-Core Particles). The main advantage of the Fused-Core stationary phase is a high increase of separation power (theoretical plates) which enables shortening of the separation time (up to few minutes) and consequently the reduction of the analysis costs. The aim of this study was a comparative evaluation of the accuracy and efficacy of the Fused-Core C18 column with a classic C18 column in the separation of wheat gliadins — one of the most complex and polymorphic plant proteins. Closely related winter wheat hybrid lines, differentiated in respect of gliadin controlling alleles, were analysed. Genotypes containing gliadin null alleles and corresponding control lines as well as parental forms and their progenies were compared using Fused-Core Poroshell 300SB-C18 and traditional Zorbax 300SB-C18 columns. The obtained results proved that RP-HPLC separation on the Poroshell column are indeed very fast and economical as the high quality chromatograms were obtained after 8 minutes of separation. However, their resolution was considerably lower as compared to the traditional column. In conclusion, the rapid RP-HPLC appears to be very well suited for mass selection of breeding materials, where large number of genotypes must be evaluated in a very short time period. However in a genetic research, where identification of discrete details of the chromatograms could be important for genotype classification, traditional columns seem to be more useful.

**Key words:** wheat gliadin proteins, RP-HPLC, Poroshell, Zorbax C18

## WSTĘP

Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconej fazie (RP-HPLC, ang. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) jest jedną z najbardziej efektywnych metod rozdziału aminokwasów, peptydów i białek. Wysoka czułość oznaczenia, powtarzalność wyników oraz pełna automatyzacja rozdziału pod kontrolą komputera to najczęściej wymieniane zalety RP-HPLC (Lookhart i in., 2003). W ostatnich latach podkreśla się także możliwość łączenia aparatury RP-HPLC ze spektrometrem mas, co pozwala realizować badania proteomiczne rozdzielanych frakcji białkowych (Dauly i in., 2006).

W pracach nad zróżnicowaniem białek zapasowych zbóż RP-HPLC jest metodą alternatywną do elektroforezy A-PAGE (ang. acid polyacrylamide gel electrophoresis) i SDS-PAGE, technik rozdziału powszechnie stosowanych w genetyce i hodowli roślin. Chromatografia jest bardziej czuła od elektroforezy, przykładowo, metodą RP-HPLC można rozdzielić kompleks monomerycznych gliadyn pszenicy na około 90 frakcji, a więc niemal trzykrotnie więcej niż metodą A-PAGE. Pozwala to zwiększyć dokładność identyfikacji odmian i rodów oraz precyzję oceny stopnia ich pokrewieństwa na podstawie dystansów genetycznych. Ponadto chromatografia umożliwia ilościowe porównanie zawartości białka w rozdzielanych frakcjach co może mieć istotne znaczenie np. w badaniach zależności między polimorfizmem gliadyn, a cechami technologicznymi odmian i rodów pszenicy.

RP-HPLC jest też uważana za metodą komplementarną w stosunku do A-PAGE, gdyż rozdział cząsteczek w trakcie analizy odbywa się według różnych kryteriów fizykochemicznych. W trakcie elektroforezy białka są rozdzielane zależnie od ich prędkości migracji w żelu, która to cecha jest wypadkową masy cząsteczkowej i ładunku elektrycznego. W metodzie RP-HPLC głównym kryterium rozdziału białek są właściwości hydrofobowe. Oddziaływania hydrofobowe stabilizują strukturę 2.- i 3.-rzędową gliadyn, zwiększają ich podatność do agregacji oraz kształtują właściwości wiskoelastyczne (Lookhart i in., 2003). Gliadyny są silnie zróżnicowane pod względem właściwości hydrofobowych (Popineau i in., 1994). Wolno migrujące w żelu elektroforetycznym frakcje z grupy  $\omega$ , zawierające znaczne ilości ujemnie naładowanych reszt glutaminy, są słabo hydrofobowe, natomiast frakcje  $\gamma$  o podwyższonej zawartości aminokwasów hydrofobowych: alaniny, waliny, a w szczególności metioniny są silnie hydrofobowe (Wieser, 1991). Konsekwencją jest zróżnicowanie siły wiązania poszczególnych frakcji w grupach  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\omega$ -5 i  $\omega$ -1.2 gliadyn z powierzchnią fazy stacjonarnej kolumny chromatograficznej. W trakcie analizy roztwór eluentu wypłukuje białka selektywnie, w zależności od siły ich związania z kolumną. Słabo hydrofobowe  $\omega$ -gliadyny wymywane są najwcześniej (ich czas retencji [RT] jest niski) natomiast silnie hydrofobowe  $\gamma$ -gliadyny — najpóźniej (wysoki czas retencji) (Becker i in., 2006). Możliwość powszechnego wykorzystania RP-HPLC w analizie białek zapasowych zbóż ogranicza znaczny koszt jednostkowy oznaczenia, na który składają się koszty aparatury, wyposażenia i odczynników. W ostatnich latach opracowano nowy rodzaj wypełniacza kolumn chromatograficznych w technologii Fused-Core (Kirkland i in., 2000). Istotą technologii Fused-Core jest osadzenie cienkiej porowatej warstwy krzemionki (promień 0,25  $\mu\text{m}$ ), w której zachodzi właściwy rozdział, na nieporowatym, sztywnym rdzeniu (średnica 4,5  $\mu\text{m}$ ). Dzięki temu zwiększa się pojemność sorpcyjna złoża, a także szybkość dyfuzji biomolekuł do wnętrza (w czasie osadzania białek) i na zewnątrz porów (w czasie wymywania białek) przy jednoczesnym zachowaniu niskich ciśnień przepływu charakterystycznych dla kolumn o klasycznych wypełnieniach (5  $\mu\text{m}$ ) (Cabrera, 2004). Przykładem kolumny wykonanej w technologii Fused-Core i przeznaczonej do rozdziału białek jest kolumna o nazwie handlowej „Poroshell SB300” firmy Agilent. Główną zaletą kolumn Poroshell jest możliwość skrócenia czasu analizy, a tym samym obniżenia kosztów i bardziej ekonomicznego wykorzystania aparatury. Większa moc rozdzielcza uzyskana dzięki innowacyjnej budowie złoża nie wymaga również stosowania ultra wysokich ciśnień jak to ma miejsce w przypadku kolumn o złożach sub-mikronowych, co pozwala na stosowanie tradycyjnych chromatografów HPLC. Wyniki badań dowodzą, iż kolumny Poroshell są znakomitym narzędziem analitycznym do rozdziału oraz identyfikacji białek gluteninowych o wysokiej masie cząsteczkowej (HMW GS, ang. high molecular weight glutenin subunits) (Naeem i Sapirstein, 2007). Analiza gliadyn przy użyciu kolumn Poroshell nie była dotychczas przedmiotem szczegółowych opracowań. Gliadyny, w porównaniu z HMW GS, są silniej polimorficzne stąd też uzyskanie dokładnego obrazu ich zróżnicowania stanowi większy problem z punktu widzenia metodyki rozdziału. Badania opisane w niniejszej pracy miały na celu oszacowanie dokładności i efektywności rozdziału

gliadyn przy użyciu metody RP-HPLC z wykorzystaniem kolumny Poroshell w porównaniu z tradycyjnie stosowaną w analizie chromatograficznej tej grupy białek kolumną typu Zorbax C18.

## MATERIAŁ I METODY

### **Materiał roślinny**

Materiał roślinny obejmował trzy grupy zróżnicowanych form pszenicy ozimej, były to:

- odmiany uprawne i linie mieszańcowe: Ostka strzelecka, Sukces, Korweta, linia 60A, Jawa, linia Nepal 1. Dwie ostatnie formy zostały użyte do optymalizacji warunków ekstrakcji białek natomiast pozostałe do analizy obrazów RP-HPLC, porównania liczby uzyskanych pików oraz jakości ich wizualizacji;
- pary blisko spokrewnionych linii mieszańcowych: D1N1 vs. D1K1 oraz B1N vs. B1K. Jedna z dwóch linii w obrębie każdej pary zawierała null allele (gen nieaktywny) w *locus Gli D1* (linie D1N1) lub *Gli B1* (linia B1N), natomiast druga stanowiła genotyp kontrolny, w którym wszystkie geny warunkujące syntezę gliadyn były aktywne (linie D1K1, B1K);
- blisko spokrewnione linie mieszańcowe (L20 oraz L30) oraz ich komponenty rodzicielskie (sptv3b i l16b). Linia l16b jest jednym z biotypów rodu CHD 225. Została wytworzona w Zakładzie Roślin Zbożowych IHAR-PIB (ZRZb IHAR-PIB) drogą selekcji pod względem białek gliadynowych z wykorzystaniem elektroforezy A-PAGE. Linia sptv3b została również wytworzona w ZRZb IHAR-PIB i jest mieszańcem uzyskanym z kombinacji Oberkummler Rotkorn (orkisz) x LAD 480 stanowiącym linię czystą pod względem *loci Gli 1* oraz *Gli 2*.

### **Ekstrakcja gliadyn i analiza chromatograficzna**

Celem ustalenia najbardziej optymalnych warunków przygotowania gliadyn do analizy RP-HPLC testowano dwie metody ekstrakcji białek: jednostopniową przy użyciu 50% propanolu lub 70% etanolu oraz dwustopniową, w której białka początkowo ekstrahowano 70% etanolem, a następnie rozpuszczano w mieszaninie acetonitrylu (ACN) i kwasu trifluoroctowego (TFA). Z uwagi na stwierdzoną (na etapie optymalizacji) wysoką skuteczność metody dwustopniowej w dalszych etapach badań wykorzystywano ją do analizy zróżnicowania gliadyn u wybranych genotypów pszenicy. Białka ekstrahowano z mąki 70% etanolem w stosunku 1:10 (v/w) przez 12 godzin w temperaturze pokojowej mieszając próbki na rotatorze firmy Grant-Bio, a następnie wirowano przez dwie minuty z prędkością 14000×g. Supernatanty przenoszono do nowych probówek i zagęszczano przez około 60 min. w zagęszczarce firmy Labconco celem odparowania alkoholu. Do zagęszczonych ekstraktów dodawano mieszaninę ACN/TFA w takiej ilości, aby końcowe stężenie roztworów w ekstrakcie do analizy wynosiło: 20% ACN i 0,1% TFA. Przygotowane ekstrakty przechowywano w lodówce, a następnego dnia wirowano przez 2 min. z prędkością 14000×g i wprowadzano do automatycznego podajnika próbek aparatury chromatograficznej. Z uwagi na niejednakową pojemność stosowanych kolumn chromatograficznych na kolumnę Poroshell nastrzykiwano 2 µl próbki, a na kolumnę

Zorbax 10 µl. Próbkę do analizy były termostatowane w 8°C w celu spowolnienia degradacji białek.

Analizę RP-HPLC prowadzono na chromatografie Agilent 1100 wyposażonym w termostatowany autosampler, piec do kolumn HPLC oraz detektor DAD. Wykorzystywano dwie kolumny firmy Agilent dedykowane do separacji białek: Zorbax 300SB-C18 (4,5 × 150 mm, 5µm) i Poroshell 300SB-C18 (2,1 × 75 mm, 5µm). Rozdziały prowadzono w temperaturze 70°C przy prędkości przepływu eluentu 1mL/min. Jako fazę mobilną stosowano mieszaninę acetonitrylu i wody z domieszką 0,1% kwasu trójfluorooctego. Rozdziały wykonywano w gradiencie 25%–50% ACN/0,1%TFA w czasie 8 i 60 min. odpowiednio dla kolumny Poroshell i Zorbax.

Fracje białkowe opuszczające kolumnę chromatograficzną były rejestrowane przez detektor UV (DAD) w paśmie ultrafioletu przy długościach fali 210, 254 i 280 nm. Uzyskane obrazy chromatograficzne porównywano pod względem czasów retencji (RT) pików chromatogramu (rozdzielonych frakcji białkowych) oraz wysokości pików wyrażonych jako jednostki absorbancji (mAU).

#### **Elektroforeza A-PAGE**

Białka gliadynowe ekstrahowane 70% etanolem z pojedynczych ziarniaków wybranych form pszenicy ozimej rozdzielano metodą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w środowisku kwasnym pH = 3,1 (A-PAGE). W badaniach wykorzystano standardową metodę rozdziału Bushuka i Zillmana dostosowaną do warunków laboratoryjnych ZRZb IHAR-PIB wg modyfikacji opisanej we wcześniejszych pracach (Bushuk i Zillman, 1978; Waga, 2010; Waga i in., 2006).

### OMÓWIENIE WYNIKÓW

#### **Optymalizacja rozdziałów RP-HPLC**

Rozdział białek gliadynowych na kolumnie typu Poroshell nie był dotychczas przedmiotem szczegółowych opracowań. Z tego względu wykonano podstawowe oznaczenia mające na celu zdefiniowanie optymalnych warunków analizy. Użyto ekstraktów gliadyn odmiany Jawa oraz linii Nepal 1. W pierwszej kolejności określono powtarzalność rozdziałów chromatograficznych wykonując po trzy nastrzyki z trzech niezależnych naważek mąki każdego genotypu. Obrazy chromatograficzne uzyskane w kolejnych powtórzeniach dla jednej odmiany były niemal identyczne co pozwala twierdzić, iż wyniki analizy przy użyciu kolumny Poroshell są wysoce powtarzalne.

Istotnym czynnikiem mającym wpływ na jakość rozdziału RP-HPLC jest rodzaj użytego roztworu ekstrakcyjnego. W badaniach gliadyny ekstrahowano alkoholem etylowym, propanolem oraz mieszaniną roztworów etanolu, TFA i ACN. Rozdziały uzyskane z ekstraktów alkoholowych (etanolu i propanolu) były zdecydowanie różne, a obserwowane różnice miały głównie charakter ilościowy. Porównanie obrazów dowodzi, że ekstrakcja etanolem zwiększa ilość białka przede wszystkim w strefie frakcji o niskiej i średniej hydrofobowości (a więc gliadyn z grupy  $\omega$  i  $\alpha$ ). Efekt ten stwierdzono dla obu badanych genotypów pszenicy. Obrazy białek nie wykazywały natomiast znaczących różnic jakościowych. Oba roztwory ekstrakcyjne pozwoliły wyodrębnić jednakową liczbę

frakcji (pików), które miały identyczny kształt i czas retencji. Dodatek mieszaniny TFA/ACN do ekstraktów etanolowych spowodował dalsze zwiększenie wysokości pików (a więc ilości białka w poszczególnych frakcjach) w stosunku do ekstraktów uzyskanych na bazie czystego etanolu i propanolu. Porównanie rozdziałów uzyskanych dla ekstraktów TFA/ACN/etanol z ekstraktami etanolu i propanolu wykazało największe różnice w strefie  $\omega$ -gliadyn zaś najmniejsze w strefie silnie hydrofobowych frakcji  $\gamma$  gliadyn.

Przechowywanie ekstraktów przez trzy dni w temperaturze 4°C miało także znaczący wpływ na jakość rozdziału chromatograficznego gliadyn. Zarówno w przypadku odmiany Jawa jak i linii z Nepalu obserwowano znaczący spadek wysokości wszystkich pików, jak też niewielkie zmiany jakościowe. Wśród białek odmiany Jawa stwierdzono powstanie dodatkowego pików o czasie retencji 4,6 min oraz zanik frakcji o czasie retencji 5,9 min. Jeszcze większe zmiany spowodowało przechowywanie ekstraktów linii Nepal 1. Znaczne różnice pojawiły się w strefie frakcji o niskiej hydrofobowości, w przedziale RT = 2,1–2,4 min oraz w przedziale RT = 3,0–3,1 min, natomiast w miejsce dwóch białek o RT = 5,2 i 5,3 min pojawiła się frakcja o RT = 5,3 min.

#### Porównanie obrazów chromatograficznych wybranych form pszenicy

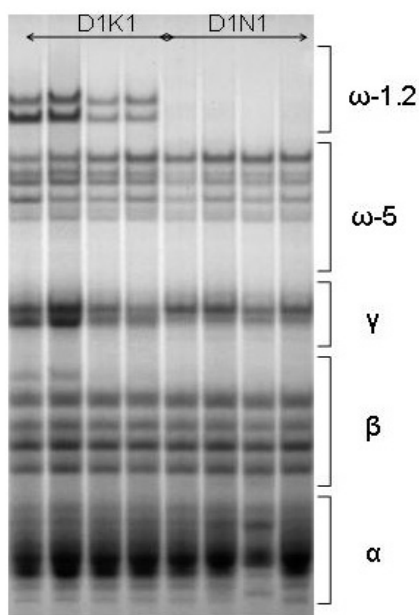
Obrazy RP-HPLC białek gliadynowych czterech genotypów pszenicy ozimej uzyskane na porównywanych kolumnach chromatograficznych różniły się głównie pod względem liczby pików, która była przeszło dwukrotnie większa w przypadku rozdziałów uzyskanych na kolumnie Zorbax C18 (około 90 pików) niż Poroshell (około 40 pików) (tab. 1). Jednak szczegółowa analiza w trzech przedziałach wysokości pików (niskich, średnich i wysokich) wskazuje, iż stwierdzone różnice ilościowe dotyczą przede wszystkim pików najniższych, których było 3–4 razy więcej dla kolumny Zorbax C18. Liczebność w średnich przedziałach wysokości była tylko nieznacznie większa dla kolumny Zorbax C18, natomiast liczebność pików wysokich (czyli frakcji o największej zawartości białka) była zbliżona dla obu typów kolumn. Uzyskane wyniki pozwalają twierdzić, iż zdolność rozdzielcza kolumny Poroshell w grupie pików wysokich jest porównywalna z tradycyjną kolumną Zorbax C18.

Tabela 1  
Liczebność pików białek gliadynowych czterech form pszenicy ozimej rozdzielonych metodą RP-HPLC na kolumnach Zorbax C18 i Poroshell, w trzech zakresach wysokości (niski, średni i wysoki)  
Number of RP-HPLC peaks isolated from gliadin extracts from flour of chosen winter wheat genotypes, estimated in three intervals of peak height

Genotypy Genotypes	Poroshell				Zorbax C18			
	< 30 mAU	30-100 mAU	> 100 mAU	łącznie total	< 100 mAU	100-300 mAU	> 300 mAU	łącznie total
Ostka Strzelecka	20	14	8	42	66	16	6	88
Sukces	15	17	7	39	60	20	6	86
Korweta	16	19	9	44	58	22	4	84
60A	14	13	11	38	59	16	9	84

### Porównanie efektów fenotypowych null alleli i genów kodujących białka gliadynowe

Obrazy elektroforetyczne A-PAGE linii mieszańcowej zawierającej null allel na chromosomie 1D (D1N1) porównywano z linią kontrolną (D1K1) zawierającą pełny zestaw białek gliadynowych specyficznych dla tego genotypu (rys. 1). Linia typu „null” w porównaniu do linii kontrolnej wykazywała charakterystyczny brak grupy prążków w strefie najwolniej migrujących frakcji  $\omega$ -1,2.

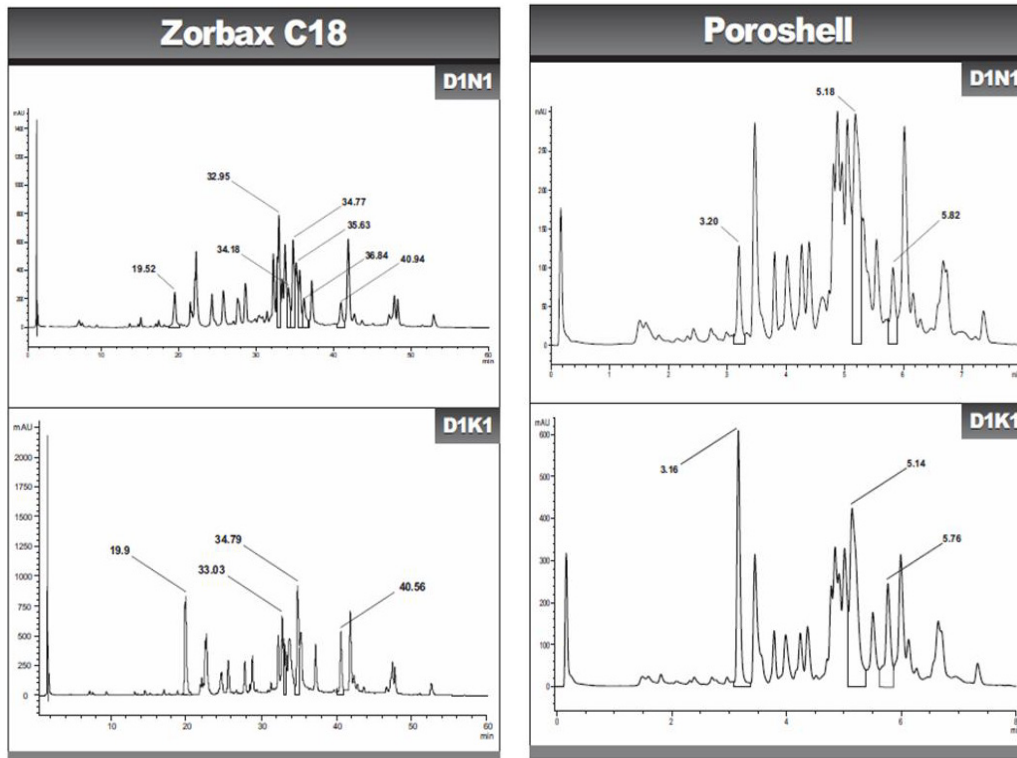


Rys. 1. Obrazy elektroforetyczne A-PAGE białek gliadynowych linii mieszańcowej D1N1 zawierającej null allel na chromosomie 1D z linią kontrolną

Fig. 1. A-PAGE electrophoregrams of gliadin proteins from two hybrid genotypes: D1N1 containing a null allele on the chromosome 1D and the D1K1 control line

Obrazy RP-HPLC linii „null” oraz linii kontrolnej zarówno na kolumnie Zorbax C18, jak i Poroshell wykazywały znaczące różnice jak chodzi o kształt oraz wysokość pików w różnych przedziałach czasów retencji (rys. 2). Obraz linii D1N1 w porównaniu z linią D1K1 uzyskany na kolumnie Zorbax C18 wykazuje znaczne obniżenie (o ponad 70%) wysokości piku o czasie retencji RT = 19,5 min. Jego lokalizacja w strefie białek o niskiej hydrofobowości pozwala z dużym prawdopodobieństwem przypuszczać, iż jest to frakcja  $\omega$ -gliadyn kontrolowana chromosomem 1D. Stwierdzono też znaczącą redukcję wysokości dla pików o RT = 34,7 min (ponad 30%) oraz RT = 40,5 min (ponad 60%). Jednocześnie na obrazie linii D1N1 obserwowano zwiększenie wysokości piku RT = 32,9 min (o około 40%) oraz powstanie nowych pików: RT = 34,1, 35,6 i 36,8, nie obserwowanych w linii D1K1.

Wykorzystanie kolumny Poroshell do rozdzielania gliadyn linii typu „D1 null” oraz linii kontrolnej pozwoliło w sposób jednoznaczny zidentyfikować charakterystyczny pik ω-gliadyn kontrolowany chromosomem 1D. Jego czas retencji wynosił 3,1 min. Podobnie jak w przypadku kolumny Zorbax C18 stwierdzono silną (o około 80%) redukcję wysokości tego piku w linii D1N1. Znaczną redukcję wysokości (o około 60%) obserwowano też dla pików RT = 5,1 min oraz RT = 5,7 min linii D1K1. Stosując kolumnę Poroshell nie obserwowano natomiast ani zwiększenia wysokości ani też powstania nowych pików w liniach typu „null”.



**Rys. 2 a.** Porównanie obrazów RP-HPLC białek gliadynowych linii mieszańcowej D1N1 (zawierającej null allele na chromosomie 1D) z linią kontrolną D1K1 uzyskanych przy użyciu kolumny Zorbax C18

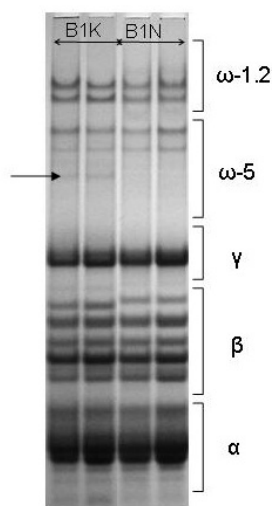
**Fig. 2 a.** RP-HPLC of gliadin proteins from two hybrid genotypes: D1N1 containing a null allele on the chromosome 1D and the D1K1 control line obtained using Zorbax C18 chromatographic column

**Rys. 2 b.** Porównanie obrazów RP-HPLC białek gliadynowych linii mieszańcowej D1N1 (zawierającej null allele na chromosomie 1D) z linią kontrolną D1K1 uzyskanych przy użyciu kolumny Poroshell

**Fig. 2 b.** RP-HPLC of gliadin proteins from two hybrid genotypes: D1N1 containing a null allele on the chromosome 1D and the D1K1 control line obtained using Poroshell chromatographic column



Na obrazie A-PAGE linii B1N, w której częściowo zablokowane zostały geny w *locus Gli B1*, obserwowano niewielką lecz łatwą do jednoznacznej identyfikacji zmianę fenotypową polegającą na osłabieniu intensywności prążka w strefie  $\omega$ -5 (rys. 3). Jednak analiza RP-HPLC linii B1N nie wykazała żadnych zmian ani pod względem kombinacji ani też czasów retencji pików w porównaniu z linią kontrolną B1K.



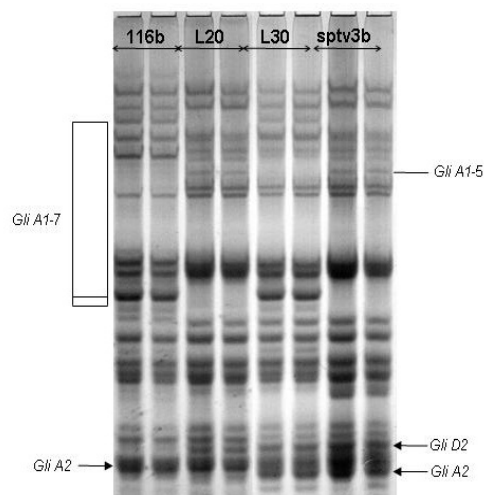
**Rys. 3. Obrazy elektroforetyczne A-PAGE białek gliadynowych linii mieszańcowej B1N zawierającej null allele na chromosomie 1B z linią kontrolną**  
**Fig. 3. A-PAGE electrophoregrams of gliadins from two hybrid genotypes: B1N containing a null allele on the chromosome 1B and the B1K control line**

#### Porównanie linii mieszańcowych i form rodzicielskich

Analiza składu białek zapasowych w formach rodzicielskich oraz ich liniach mieszańcowych jest jednym z ważniejszych zastosowań metod elektroforetycznych i chromatograficznych w genetyce i hodowli zbóż. Dwa blisko spokrewnione mieszańce — L20 i L30 - uzyskane z krzyżowania linii sptv3b i 116b różnią się trzema blokami gliadyn kontrolowanych chromosomami 1A, 6A i 6D (rys. 4). Na rozdzielaczach kolumn Zorbax C18 i Poroshell zidentyfikowano odpowiednio 31 oraz 17 pików linii rodzicielskich, których obecność stwierdzono także u jednego lub obu genotypów mieszańcowych (tab. 2 i 3). Ich czasy retencji pozwalają określić, które z wybranych pików są wspólne, a które specyficzne dla poszczególnych mieszańców oraz pozwalają wnioskować, który z rodziców był donorem określonej frakcji białkowej mieszańca. Biorąc pod uwagę wymienione kryteria oceny piki chromatograficzne czterech analizowanych genotypów podzielono na dziewięć klas:

- A — piki wspólne dla obu mieszańców, pochodzące od obu rodziców,
- A1 — piki wspólne dla obu mieszańców, pochodzące od sptv3b,
- A2 — piki wspólne dla obu mieszańców, pochodzące od 116b,

- B1 — piki specyficzne dla L20 pochodzące od sptv3b,
- B2 — piki specyficzne dla L20 pochodzące od 116b,
- B3 — piki specyficzne dla L20 pochodzące od obu rodziców,
- C1 — piki specyficzne dla L30 pochodzące od sptv3b,
- C2 — piki specyficzne dla L30 pochodzące od 116b,
- C3 — piki specyficzne dla L30 pochodzące od obu rodziców.



**Rys. 4. Obrazy elektroforetyczne A-PAGE komponentów rodzicielskich (sptv 3b i 116b) oraz ich potomstwa F<sub>6</sub> (linie L20 i L30). Prążki różnicujące formy rodzicielskie oraz chromosomy kontrolujące ich syntezę zaznaczono z lewej i prawej strony obrazu**

**Fig. 4. A-PAGE electrophoregrams of gliadin proteins from parental forms (sptv3b and 116b) and their progeny (lines L20 and L30). Protein bands differentiated parental genotypes and chromosomes controlling their synthesis are marked on the left and right hand side of the electrophoregrams**

Tabela 2

**Charakterystyka wybranych pików obserwowanych u form rodzicielskich (sptv 3b i 116b) oraz linii mieszańcowych (L20 i L30) na podstawie czasów retencji (kolumna Zorbax C18)**  
**Retention times of chosen RP-HPLC gliadin peaks observed in parental (sptv3b and 116b) and hybrid (L20 and L30) winter wheat genotypes (Zorbax C18 column)**

Lp. No	sptv 3b	L20	L30	116B	Klasy pików Classes of peaks
	Czasy retencji (min) — Retention times				
1	2	3	4	5	6
1	20,1	20,1	20,1	20,2	A
2	22,8	22,9	22,7	22,8	A
3	24,4	24,5	24,5	24,6	A
4	25,7	25,9	25,9	25,9	A
5	27,9	28,0	27,9		A1
6	28,9	29,0	28,9	28,0	A
7	32,5		32,4		C1
8		32,4		32,5	B2
9	32,9		32,9		C1

c. d. Tabela 2

1	2	3	4	5	6
10		33,0		33,1	B2
11	33,2		33,1		C1
12	33,9		33,9		C1
13		34,0		34,1	B2
14	35,0		34,1		C1
15		34,4		34,4	B2
16		35,0		35,0	B2
17	35,4		35,4		C1
18		35,4		35,4	B2
19		35,8		35,9	B2
20		36,2		36,3	B2
21	37,3	37,4	37,3	37,4	A
22	40,6	40,7	40,6		A1
23	41,1	41,1	41,0		A1
24	42,0	42,0	42,0		A1
25	42,4	42,4	42,3		A1
26	46,8	46,6			B1
27	47,5	47,5			B1
28	47,9	47,8			B1
29			50,3	50,5	C2
30			52,6	52,6	C2
31	52,8	52,6		52,6	B3

Tabela 3

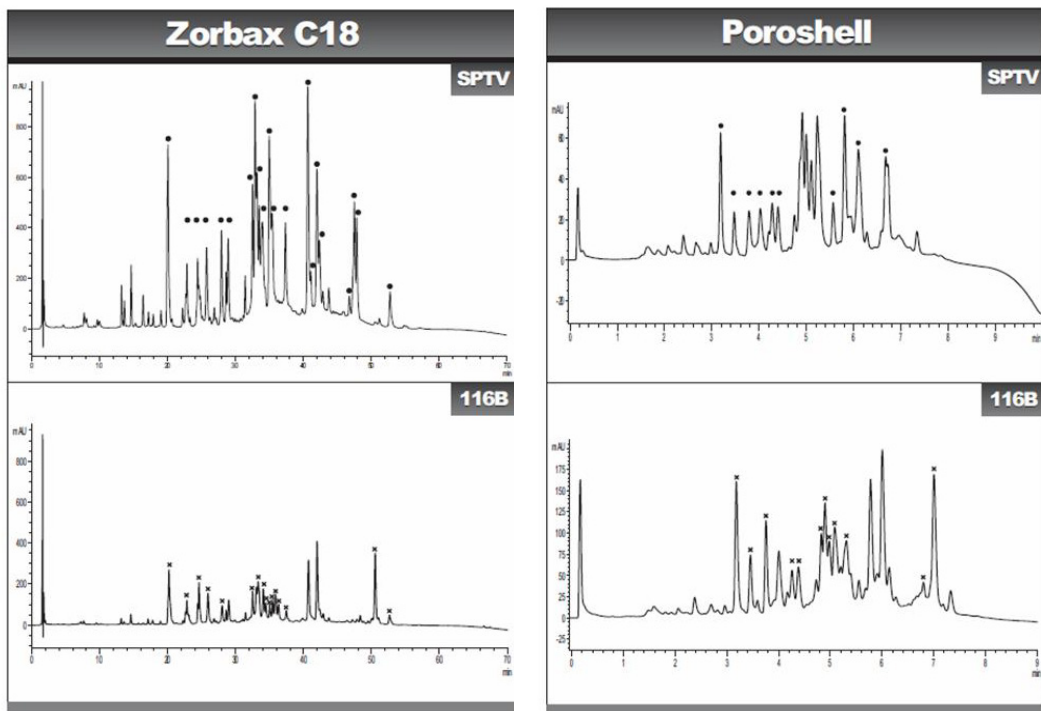
**Charakterystyka wybranych pików chromatograficznych gliadyn obserwowanych u form rodzicielskich (sptv 3b i 116b) oraz linii mieszańcowych (L20 i L30) pszenicy ozimej na podstawie czasów retencji (kolumna Poroshell)**  
**Retention times of chosen RP-HPLC gliadin peaks observed in parental (sptv3b and 116b) and hybrid (L20 and L30) winter wheat genotypes (Poroshell column)**

Lp. No	sptv 3b	L20	L30	116B	Klasy pików Classes of peaks
	czas retencji (min) — retention time (min)				
1	2	3	4	5	6
1	3,2	3,1	3,1	3,2	A
2	3,5	3,4	3,4	3,5	A
3	3,8	3,7	3,7	3,8	A
4	4,0	4,0	4,0		A1
5	4,3	4,2	4,2	4,3	A
6	4,4	4,4	4,4	4,4	A
7		4,8	4,8	4,8	A2
8		4,9	4,8	4,9	A2
9		4,9	4,9	5,0	A2
10		5,0	5,0	5,1	A2
11		5,3	5,1	5,3	A2
12	5,6	5,5	5,5		A1
13	5,8	5,7	5,7		A1
14	6,1	6,0	6,0		A1
15	6,7	6,6			B1
16			6,8	6,8	C2
17			6,9	7,0	C2

Spośród 31 pików wybranych dla kolumny Zorbax C18 jednaście (35%) było wspólnych, zaś 20 (65%) specyficznych dla poszczególnych mieszańców (tab. 2). W grupie pików

wspólnych sześć pochodziło od obu rodziców natomiast pięć od sptv3b. Spośród dwunastu pików specyficznych dla linii L20 trzy pochodziły od sptv 3b, osiem od 116b, a jeden od obu rodziców natomiast spośród pików specyficznych dla linii L30 sześć pochodziło od sptv 3b, a dwa od 116b.

Spośród 17 pików wybranych dla kolumny Poroshell czternaście (82%) było wspólnych dla obu mieszańców natomiast trzy (18%) były specyficzne dla poszczególnych mieszańców (tab. 3). W grupie pików wspólnych pięć pochodziło od obu rodziców, cztery od sptv3b, a pięć od 116b. Jeden pik specyficzny dla linii L20 pochodził od sptv3b natomiast dwa pików specyficzne dla L30 pochodziły od 116b.



**Rys. 5 a.** Obrazy RP-HPLC komponentów rodzicielskich sptv 3b i 116b uzyskane przy użyciu kolumny Zorbax C18. Czarnymi kółkami zaznaczono pików charakterystyczne dla linii sptv3b natomiast krzyżykami – pików linii 116b

**Fig. 5 a.** RP-HPLC of gliadin proteins from parental forms (sptv3b and 116b) and their progeny (lines L20 and L30) obtained using Zorbax C18

chromatographic column. Peaks characteristic for sptv3b and 116b are indicated with black circles and crossbars respectively

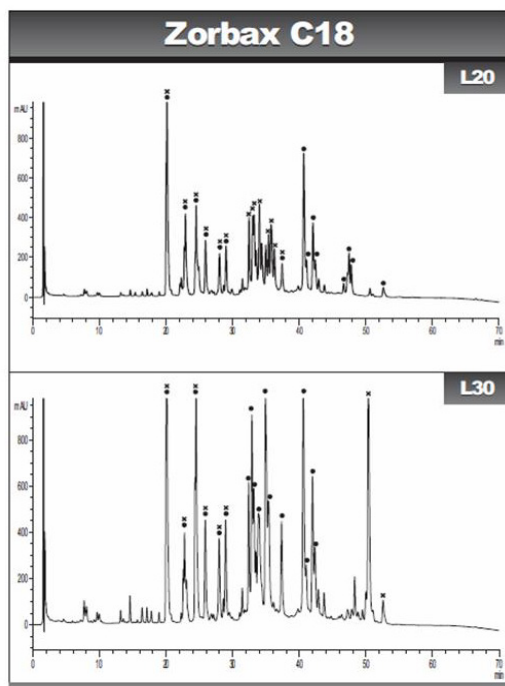
**Rys. 5 b.** Obrazy RP-HPLC komponentów rodzicielskich sptv 3b i 116b uzyskane przy użyciu kolumny Poroshell. Czarnymi kółkami zaznaczono pików charakterystyczne dla linii sptv3b natomiast krzyżykami – pików linii 116b

**Fig. 5 b.** RP-HPLC of gliadin proteins from parental forms (sptv3b and 116b) and their progeny (lines L20 and L30) obtained using Poroshell

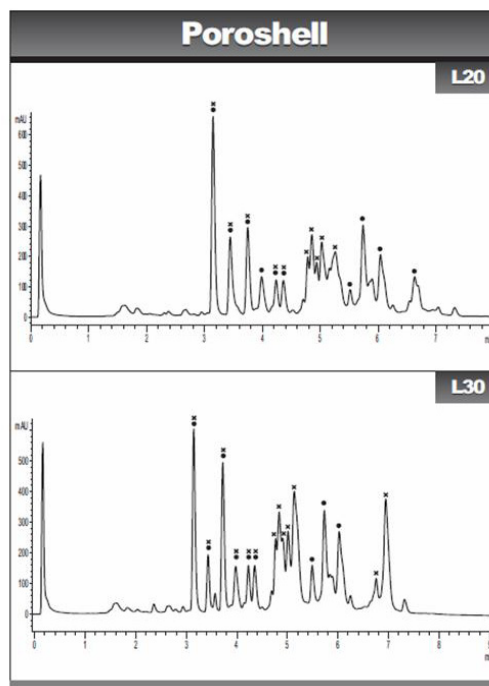
chromatographic column. Peaks characteristic for sptv3b and 116b are indicated with black circles and crossbars respectively

Wybrane piki form rodzicielskich oraz linii mieszańcowych zilustrowano na rysunkach 5a i 5b.

Opisane wyniki przemawiają za większą dokładnością analizy mieszańców przy użyciu kolumny Zorbax C18 niż Poroshell. Dowodzi tego większy odsetek pików specyficznych, a mniejszy pików wspólnych obserwowanych na obrazach linii mieszańcowych uzyskanych z kolumny Zorbax C18.



**Rys. 6 a.** Obrazy RP-HPLC linii mieszańcowych L20 i L30 (pokolenie F6) z kombinacji sptv3b x 116b uzyskanych przy użyciu kolumny Zorbax C18. Czarnymi kółkami zaznaczono piki charakterystyczne dla linii sptv3b natomiast krzyżykami – piki linii 116b  
**Fig. 6 a.** RP-HPLC of gliadin proteins from hybrid genotypes L20 and L30 (F6 generation) from the cross combination sptv3b x 116b obtained obtained using Zorbax C18 chromatographic column. Peaks characteristic for sptv3b and 116b are indicated with black circles and crossbars respectively



**Rys. 6 b.** Obrazy RP-HPLC linii mieszańcowych L20 i L30 (pokolenie F6) z kombinacji sptv3b x 116b uzyskanych przy użyciu kolumny Poroshell. Czarnymi kółkami zaznaczono piki charakterystyczne dla linii sptv3b natomiast krzyżykami – piki linii 116b  
**Fig. 6 b.** RP-HPLC of gliadin proteins from hybrid genotypes L20 and L30 (F6 generation) from the cross combination sptv3b x 116b obtained obtained using Poroshell chromatographic column. Peaks characteristic for sptv3b and 116b are indicated with black circles and crossbars respectively

## DYSKUSJA

Przedstawione badania miały na celu określenie efektywności i przydatności wykorzystania kolumny chromatograficznej typu Fused-Core Poroshell C18, w analizie białek gliadynowych pszenicy. Punktem odniesienia dla oceny obrazów chromatograficznych kolumny Poroshell były rozdziały uzyskane na tradycyjnej kolumnie Zorbax C18, często używanej przez autorów prac nad zróżnicowaniem białek zapasowych zbóż badanych metodą RP-HPLC. Materiał roślinny stanowiły odmiany i linie mieszańcowe pszenicy ozimej różniące się pod względem alleli kontrolujących syntezę gliadyn. Uzyskane wyniki dowodzą, iż analiza gliadyn na kolumnie Poroshell jest przede wszystkim metodą szybką i ekonomiczną. Wysokiej jakości obrazy rozdzielonych białek uzyskano w czasie 8 minut. W porównaniu z rozdziałami na kolumnach tradycyjnych (takich, jak np. Zorbax C18) jest to czas niemal ośmiokrotnie krótszy (Bietz, 2002). W tak krótkim czasie białka gliadynowe rozdzielono na około 40 frakcji co stanowi liczbę porównywalną z liczbą prążków elektroforezy A-PAGE. Jednocześnie jest to liczba o połowę mniejsza w porównaniu z liczbą pików uzyskanych na kolumnie wypełnionej tradycyjnym nośnikiem (Bietz, 1983). Krótki czas rozdziału został więc osiągnięty kosztem obniżenia rozdzielczości, która stanowi jedną z najważniejszych zalet klasycznej chromatografii RP-HPLC. Jednak szczegółowa analiza liczebności pików w grupach zróżnicowanych pod względem wysokości (parametru powiązanego z zawartością białka w rozdzielonych frakcjach) wykazała, iż największe różnice pojawiały się wśród pików niskich, natomiast zróżnicowanie liczebności pików wysokich dla obu kolumn było niewielkie. Nasuwa się wniosek, iż zdolność rozdzielcza kolumny Poroshell w grupie frakcji odgrywających prawdopodobnie istotną rolę z punktu widzenia funkcji gliadyn, jest porównywalna z kolumną Zorbax C18.

Gdy jednak celem badań chromatograficznych jest ocena czystości genetycznej, stopnia wyrównania materiału, identyfikacja odmian i rodów czy też analiza rozszczepienia genów wysoka rozdzielczość obrazu RP-HPLC może mieć decydujące znaczenie dla poprawnej klasyfikacji genotypu. W takich przypadkach zastosowanie kolumn tradycyjnych wydaje się bardziej uzasadnione. Dowodzą tego wyniki analizy blisko spokrewnionych linii zawierających null allele genów białek gliadynowych. W linii D1N1 został zablokowany *locus* na chromosomie 1D. Charakterystycznym efektem genotypowym tej mutacji było drastyczne obniżenie wysokości charakterystycznego piku o RT = 19,59 min. (kolumna Zorbax C18) i RT = 3,16 min. (kolumna Poroshell). Porównanie RP-HPLC z A-PAGE pozwala stwierdzić, iż oba piki odpowiadają jednej z frakcji gliadyn  $\omega$ -1.2 kontrolowanych chromosomem 1D. Rozdziały dowodzą, iż oba typy kolumn chromatograficznych pozwalają obserwować silny efekt zmniejszenia zawartości białka w grupie gliadyn  $\omega$ -1.2. Teoretycznie efekt obniżenia wysokości określonych pików może być jednak powiązany ze zwiększeniem wysokości lub powstaniem nowych pików, nie obserwowanych w liniach kontrolnych. Jak wynika z badań innych autorów genotyp pszenicy, w którym *locus* kontrolujący syntezę gliadyn ulega zablokowaniu, wykazuje nadekspresję pozostałych *loci* białek glutenowych (gliadyn i HMW GS) lub nie-glutenowych (albumin i globulin) (Wieser i in., 2006). Ich zwiększona aktywność stanowi naturalną reakcję organizmu

rośliny, który dąży do utrzymania zawartości białka na właściwym dla danego genotypu poziomie. Utrata jednej frakcji białkowej jest rekompensowana wzmocnieniem ekspresji genów kontrolujących syntezę pozostałych frakcji (Alvarez i in., 2000). Istotne różnice między porównywanymi kolumnami chromatograficznymi polegały na tym, iż nadekspresja została jednoznacznie stwierdzona na obrazach kolumny Zorbax C18, natomiast efektów takich nie obserwowano w przypadku rozdzielców kolumny Poroshell.

Za większą przydatnością kolumn tradycyjnych w badaniach genetycznych przemawiają także wyniki analizy blisko spokrewnionych linii mieszańcowych (L20 i L30) oraz ich form rodzicielskich (sptv3b i 116b). Wysoki udział pików wspólnych, obserwowanych u obu form mieszańcowych dla kolumny Poroshell świadczy o nakładaniu białek pochodzących od obu rodziców, co można interpretować jako efekt słabszej zdolności rozdzielczej. Procent pików wspólnych na obrazach kolumny Poroshell był przeszło dwukrotnie większy (82%) niż w przypadku kolumny Zorbax C18 (35%) dla której, z kolei, obserwowano więcej pików specyficznych (65% vs. 18%).

#### WNIOSKI

1. Kolumny typu Poroshell mogą być efektywnie wykorzystywane w selekcji znacznych ilości materiałów hodowlanych, co w przypadku kolumn tradycyjnych, np. typu Zorbax C18, ograniczają przede wszystkim długi czas rozdzielania, wyższy koszt eksploatacji aparatury i jej wyposażenia oraz większe zużycie odczynników (głównie ACN). Możliwość analizy ponad dwustu prób na dobę, jaką daje kolumna Poroshell, pozwala na wykonanie selekcji masowej w dowolnym pokoleniu mieszańcowym i na każdym etapie procesu hodowlanego.
2. Rozdzielacze uzyskane na kolumnie tradycyjnej typu Zorbax C18 umożliwiają identyfikację ważnych szczegółów obrazu chromatograficznego mających istotne znaczenie np. w analizie rozszczepienia genów kontrolujących syntezę analizowanych białek.
3. Przedstawione wyniki dowodzą, iż wybór rodzaju kolumny chromatograficznej do analizy białek gliadynowych metodą RP-HPLC zależy od przyjętego kierunku badań. Oba typy porównywanych kolumn wzajemnie się uzupełniają co może przyczynić się do zwiększenia zakresu wykorzystania RP-HPLC w genetyce i hodowli roślin zbożowych.

#### LITERATURA

- Alvarez M. L., Guelman S., Halford N. G., Lustig S., Reggiardo M. I., Ryabushkina N., Shewry P., Stein J., Vallejos R. H. 2000. Silencing of HMW glutenins in transgenic wheat expressing extra HMW subunits. *Theor. Appl. Genet.* 100: 319 — 327.
- Bietz J. A. 1983. Separation of cereal proteins by reversed - phase high - performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 255: 219.
- Bietz J. A. 2002. HPLC of cereal endosperm storage proteins. In: Gooding K. M. and Regnier F. E. (Eds.), *HPLC of Biological Macromolecules*, 2<sup>nd</sup> ed., revised and expanded. Marcel Dekker, Inc., New York: 547 — 587.

- Becker D., Folck A., Knies P., Lörz H., Wieser H. 2006. Silencing the  $\alpha$  - gliadins in hexaploid bread wheat. In: Lookhart G.L., Ng P. K.W. (Eds.), *Gluten Proteins*. AACC, St Paul, MN: 86 — 89.
- Bushuk W., Zillman R. R. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Can J. Plant Sci.* 58: 505 — 515.
- Cabrera K. 2004. Applications of silica - based monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science*. 27: 843 — 852.
- Dauly C., Perlman D. H., Costello C. E., McComb M. E. 2006. Protein separation and characterization by up-RP-HPLC followed by intact MALDI-TOF mass spectrometry and peptide mass mapping analyses. *J. Proteome Res.* 5 (7): 1688 — 1700.
- Kirkland J. J., Truszkowski F. A., Dilks Jr C. H., Engel G. S. 2000. Superficially porous silica microspheres for fast high -performance liquid chromatography of macromolecules. *Journal of Chromatography. A* 890: 3 — 13.
- Lookhart G.L., Bean S.R., Bietz J.A. 2003. HPLC of gluten monomeric proteins. In: Shewry P. R., Lookhart G. L. (Eds.). *Wheat Gluten Protein Analysis*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA: 91 — 111.
- Nacem H. A., Sapirstein H. D. 2007. Ultra-fast separation of wheat glutenin subunits by reversed - phase HPLC using a superficially porous silica - based column. *J. Cereal Sci.* 47: 157 — 168.
- Popineau Y., Cornec M., Lefebvre J., Marchylo B. 1994. Evaluation of hydrophobicity of wheat proteins and peptides by HIC and RP-HPLC. *J. Cereal Sci.* 19: 231.
- Waga J. 2010. Charakterystyka oraz dziedziczenie białek gliadynowych pszenicy ozimej pochodzących z Nepalu. *Biul. IHAR* 256: 15 — 29.
- Waga J., Zientarski J., Obtułowicz K., Bilo B. 2006. Flour quality and binding of immunoglobulin E by gliadin proteins of two winter wheat genotypes. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 15/56: 305 — 310.
- Wieser H. 1991. Chemistry of gliadins. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* Vol.3 No. 2: 102 — 107.
- Wieser H. Kohler P., Folck A., Becker D. 2006. Characterization of wheat with strongly reduced  $\alpha$ -gliadin content. In: Lookhart G. L., Ng P.K.W. (Eds.), *Gluten Proteins*. AACC, St Paul, MN: 13 — 16.