

WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI**JERZY LEWOSZ****KRZYSZTOF TREDER****AGNIESZKA BARNYK****TOMASZ PILECKI**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii

Zakładu Nasiennictwa i Ochrony Ziemiaka w Boninie

Identyfikacja odmian ziemniaka metodą elektroforetyczną

Identification of potato cultivars with an electrophoretic method

Identyfikację 92 odmian ziemniaka przeprowadzono z wykorzystaniem elektroforetycznej analizy składu białkowych inhibitorów proteaz wyizolowanych z bulw ziemniaka. Inhibitory proteaz stanowią grupę białek o specyficznym odmianowo składzie i mogą służyć jako biochemiczne markery odmian ziemniaka. Analizę elektroforetyczną tych białek wykonywano po ich oddzieleniu od pozostałych białek metodą chromatografii powinowactwa. W tym celu sporządzono kolumny chromatograficzne z trypsyną immobilizowaną na nośniku Sepharose. Sok bulw nanoszono na kolumny celem związania inhibitorów proteaz z immobilizowaną trypsyną w obojętnym pH, a po wymyciu niewiążących się białek, eluowano z kolumny białka inhibitorowe przez przemywanie kolumny roztworem buforu o pH 1,8. Roztwory tych białek po neutralizacji poddawano analizie elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym uzyskując rozdział poszczególnych form inhibitorów na pasma zależnie od wielkości, ładunku i kształtu cząstek. Układ tych pasm pozwala na odróżnienie odmian ziemniaka od siebie. Jako wewnętrznego markera ułatwiającego rozpoznawanie poszczególnych pasm i korygowania różnic między poszczególnymi żelami użyto inhibitorów proteaz wyizolowanych z odmiany Baszta.

Słowa kluczowe: analiza elektroforetyczna, identyfikacja odmianowa, inhibitory trypsyny, markery biochemiczne, ziemniak

Identification of 92 potato cultivars based on the electrophoretic pattern of protease inhibitors isolated from potato tubers has been done. Protease inhibitors are proteins that display composition specific for each potato cultivar and therefore can be used as biochemical markers for potato cultivars. Electrophoretic analysis of the proteins was carried out using a fraction of inhibitors separated from other proteins by affinity chromatography. Affinity columns based on Sepharose matrix were prepared by immobilization of trypsin. For binding of protease inhibitors to immobilized trypsin, samples of potato juice were poured on the column at neutral pH. After washing out the unbound proteins, the trypsin inhibitors were eluted from the column with buffer pH 1.8. The protein solutions were neutralized and then resolved on polyacrylamide gel. Different electrophoretic bands of inhibitors, depending on the size, charge and molecular properties of particular proteins were obtained.

Electrophoretic patterns obtained in the work allow identifying all of the tested potato cultivars. Protease inhibitors isolated from cv. Baszta were used as the internal control for easier identification of electrophoretic bands as well as to portray gel to gel discrepancies.

Key words: biochemical markers, electrophoretic analysis, potato, trypsin inhibitors, cultivars identification

WSTĘP

Identyfikacja odmian ziemniaka jest stosunkowo trudna ze względu na niewielkie zróżnicowanie cech morfologicznych bulw ziemniaka, przejawianie się niektórych cech dopiero w późniejszych stadiach rozwojowych (kiełkowanie), stosunkowo krótki czas ich występowania oraz zmienność cech morfologicznych pod wpływem czynników środowiskowych. Wskutek tego może dochodzić do pomyłek przy skupie, transporcie, czy sadzeniu, jak również rozmyślnego oszustwa dla osiągnięcia większego zysku ze sprzedaży bulw odmian mniej wartościowych. Szczególnie, więc ważne dla nasiennictwa i obrotu handlowego jest posługiwanie się prostą i skuteczną metodą identyfikacji odmian ziemniaka na podstawie cech biochemicznych.

Dla zwiększenia ilości kryteriów rozpoznawczych, skrócenia czasu analizy i uniknięcia wpływu zmienności środowiskowej na ekspresję cech morfologicznych, do identyfikacji odmian ziemniaka wprowadzono stosunkowo proste, szybkie i niedrogie metody wykorzystujące markery biochemiczne i molekularne, takie jak: powtarzalne sekwencje DNA, izoenzymy, białka zapasowe i białkowe inhibitory proteaz (Pilecka i Lewosz, 1999). Te ostatnie charakteryzują się wysokim polimorfizmem, stabilnością, dają się łatwo wykrywać na podstawie swych właściwości biologicznych, prezentują odmianowo specyficzny skład elektroforetycznych frakcji.

Białkowe inhibitory proteaz bulw ziemniaka wraz z grupą innych białek zapasowych — patatyn, stanowią dużą część rozpuszczalnych białek obecnych w dojrzałych bulwach (Ryan 1990; Houl i in., 2002). Możliwość wykorzystania inhibitorów proteaz do celów taksonomicznych wykazali Kaiser i wsp. (1974). Podstawą identyfikacji odmian był specyficzny odmianowo skład izo-inhibitorów trypsyny i chymotrypsyny po elektroogniskowaniu białek soku bulw w żelu poliakrylamidowym. Izoformy inhibitorów lokalizowano w żelu poliakrylamidowym po użyciu syntetycznych chromogennych substratów proteaz (Lam i in., 2000).

Innym sposobem wykrywania inhibitorów proteaz po elektroforetycznym rozdziale białek soku bulw była technika wytrawiania żelatynowej warstwy papieru fotograficznego i uzyskiwanie repliki obrazu elektroforetycznego (Reda i in., 1981).

W obu przedstawionych sposobach obraz elektroforetyczny był pośrednim odbiciem aktywności inhibitorów wobec poszczególnych proteaz, a nie bezpośrednim obrazem ilości białek inhibitorowych w poszczególnych frakcjach elektroforetycznych. W pracy tej obiektem oceny są białka inhibitorowe, czyli produkty genów, a nie aktywność biologiczna tych białek.

Do analiz wybrano liczną i obficie występującą grupę białek inhibitorowych należących do rodziny inhibitorów trypsyny Kunitza. Są to peptydy o masie od 20 do 24 kD (Macedo i in.,

2000; Datta i in., 2001). Około 18 polipeptydów należących do tej rodziny dzieli się na trzy grupy: A, B i C o zróżnicowanej wzajemnej homologii i różnym powinowactwie do trypsyny, chymotrypsyny, subtylizyny i katepsyny D (Ishikowa i in., 1994).

MATERIAŁY I METODY

Odczynniki

Tris (tris[hydroksymetylo]aminometan); β -merkaptoetanol; amid kwasu akrylowego, N,N'-metyleno-bis-akrylamid, TEMED otrzymano z Serva (Niemcy). Pozostałe odczynniki pochodziły z POCh Gliwice.

Sorbent i odczynniki do izolowania inhibitorów

Inhibitory trypsyny izolowano metodą chromatografii powinowactwa na kolumnie wypełnionej nośnikiem Sepharose 4B (Pharmacia) z unieruchomioną trypsyną z trzustki wołowej (Sigma). Sorbent sporządzono przez immobilizację enzymu na nośniku aktywowanym bromocyjanem, wg metody Lewosza i wsp. (1981). Inhibitory wiązano z unieruchomioną trypsyną w środowisku neutralnym lub lekko alkalicznym, a desorbowano w środowisku kwaśnym. Przy izolowaniu inhibitorów posługiwano się następującymi roztworami:

- bufor 1 (0.01 M cytrynian pH 3,5);
- bufor 2 (0.05 M boran + 0.01 M CaCl₂ pH 8,6);
- roztwór elucyjny 1: 0,3 M NaCl + 0,01 M CaCl₂;
- roztwór elucyjny 2: 0,05 M HCl + 0,001 M CaCl₂

Odmiany

Do izolowania inhibitorów trypsyny wzięto bulwy 92 odmian ziemniaka w stanie spoczynku (tab. 1).

Tabela 1

Odmiany ziemniaka, z których izolowano inhibitory trypsyny
Potato cultivars used for isolation of trypsin inhibitors

1 — Aksamitka	20 — Irys	39 — Lawina	58 — Orlik	77 — Frezja
2 — Aster	21 — Jagoda	40 — Fresco	59 — Rywal	78 — Nimfy
3 — Ania	22 — Omulew	41 — Oda	60 — Malwa	79 — Skawa
4 — Denar	23 — Sumak	42 — Kolia	61 — Gloria	80 — Salto
5 — Beata	24 — Meduza	43 — Panda	62 — Jaśmin	81 — Hinga
6 — Ekra	25 — Sante	44 — Lord	63 — Fala	82 — Ikar
7 — Grot	26 — Ruta	45 — Koga	64 — Ina	83 — Felsina
8 — Drop	27 — Mila	46 — Atol	65 — Danusia	84 — Balbina
9 — Cedron	28 — Cykada	47 — Muza	66 — Ceza	85 — Vistula
10 — Irga	29 — Bekas	48 — Stobrawa	67 — Alicja	86 — Bila
11 — Triada	30 — Tokaj	49 — Accent	68 — Bard	87 — Mors
12 — Wigry	31 — Vineta	50 — Glada	69 — Fregata	88 — Signal
13 — Kos	32 — Wolfram	51 — Albina	70 — Bzura	89 — Vital
14 — Maryna	33 — Jasia	52 — Harpun	71 — Arkadia	90 — Wiking
15 — Rybitwa	34 — Koral	53 — Karlana	72 — Lena	91 — Tara
16 — Jantar	35 — Ibis	54 — Latona	73 — Orłan	B — Baszta
17 — Jagna	36 — Barycz	55 — Łucja	74 — Bryza	
18 — Wawrzyn	37 — Anielka	56 — Perkoz	75 — Cara	
19 — Klepa	38 — Dunajec	57 — Lotos	76 — Timate	

Ekstrakcja soku z bulw

Na plastikowej tarce ucierano ok. 150 g tkanki bulw dodając 100 μ l 5% wodnego roztworu β -merkaptoetanolu w dwu porcjach: pierwsze 50 μ l mieszano z pulpą, a drugie 50 μ l dodawano do soku wyciśniętego przez nylonową tkaninę. Sok dializowano przez około 16 godzin w lodówce wobec kilkakrotnie zmienianego buforu 1 (pH = 3,5). Po odwirowaniu wytrąconych przy pH 3,5 białek, doprowadzono dializat 1M Trisem do wartości pH = 8,8 i ponownie wirowano po ok. 10 minutach.

Izolowanie inhibitorów

Kolumnę równoważono przemywając buforem 2 aż do ustalenia się pH 8,6 w wypływie. Następnie wprowadzono na kolumnę odwirowany dializowany sok i wymywano frakcję nieadsorbujących się białek buforem 2 aż do spadku A_{280} w wypływie do wartości poniżej 0,05. Przemywano kolumnę roztworem 1 do uzyskania w wypływie pH = 7,0. Frakcję inhibitorów z kolumny wymywano roztworem 2 zbierając frakcje objętości 2ml o ekstynkcjach E_{280nm} nie niższych niż 1,5. Zebrane frakcje natychmiast neutralizowano 1M roztworem Tris i mierzono stężenie białka metodą mikrobiuretową (Kłyszajko-Stefanowicz, 2003). Do 0,1 ml roztworu inhibitorów dodawano 1 ml 10% TCA i odwirowano. Otrzymany osad rozpuszczono w 2 ml 3% NaOH i dodano 0,1 ml odczynnika Benedicta i po 10 min. mierzono absorbancję przy 330 nm. Zawartość białka obliczano stosując jako standardy roztwory albuminy wołowej krystalicznej (POCh) o stężeniach 100, 200, 300, 400 μ g/ml.

Kolumny regenerowano do następnego użycia przez przemywanie buforem 2.

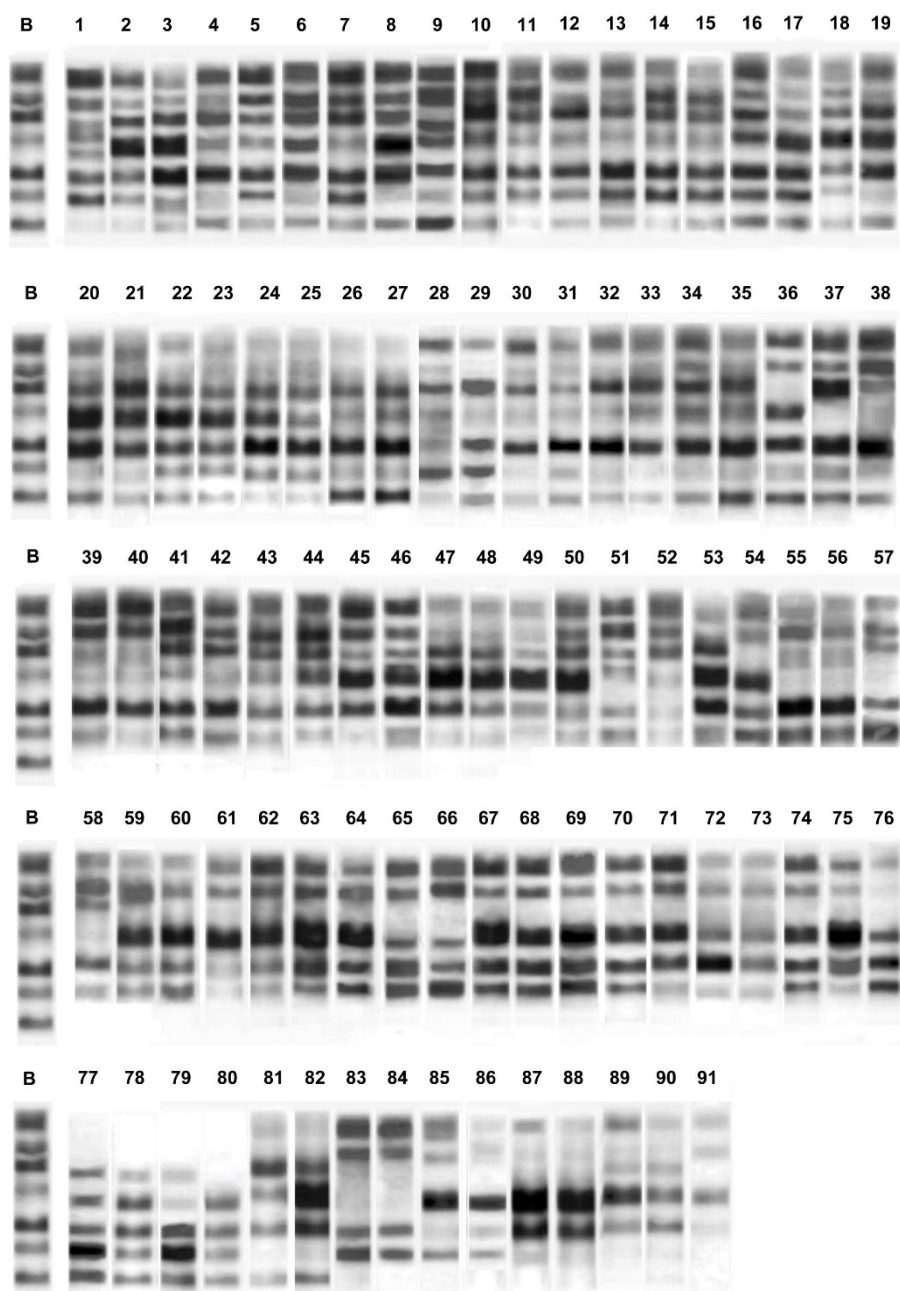
Elektroforeza białkowych inhibitorów proteaz

Białka inhibitorowe o stężeniu około 1,2 mg/ml łączono w stosunku 1:1 z buforem zawierającym 20% glicerol i błękit bromofenolowy i nakładano do kieszonek w ilości po 30 μ l. Elektroforezę prowadzono w komorze V20-CB firmy Consort o układzie pionowym 7% żelu poliakrylamidowego wymiarach 165/160 mm i grubości 1 mm, stosując w komorach bufor Tris-glicynowy pH 8,6. Elektroforezę przeprowadzano przy pomocy zasilacza typu E-833 firmy Consort przy napięciu: 300V (100V do czasu wejścia prób w żel rozdzielający).

Po skończonej elektroforezie utrwalano białka w 7,5% roztworze kwasu trójchlorooctowego przez 20 min i barwiono 0,05% roztworem Coomassie Brilliant Blue w metanolu:kwasie octowym:wodzie (50:10:40 obj/obj/obj). Nadmiar barwnika odmywano roztworem metanolu — kwasu octowego — wody (5:7:88).

WYNIKI I DYSKUSJA

Obrazy elektroforetyczne inhibitorów trypsyny wyizolowanych z bulw 92 odmian ziemniaka przedstawiono na rysunku 1. Ogółem wyróżniono kilkanaście pasm białek inhibitorowych. Poszczególne pasma białek inhibitorowych występują z różną częstotliwością i intensywnością u różnych odmian i nie stwierdzono dwóch takich samych obrazów elektroforetycznych inhibitorów trypsyny u różnych odmian.



Rys. 1. Elektroferogramy inhibitorów trypsyny badanych odmian ziemniaka. B — wzorzec (odmiana Baszta)

Fig. 1. Electropherograms of trypsin inhibitors for tested potato cultivars. B — standard (cv. Baszta)

Obecność merkaptoetanolu i dializa przy niskim pH chroniła ekstrakty przed ciemnieniem powodowanym przez utlenianie związków fenolowych, a zarazem powodowała wytrącenie blisko 50% białek, pozostawiając jednak całość białek inhibitorowych w roztworze. Usprawniło to proces izolowania inhibitorów skracając czas elucji i przemywania kolumny. Wydzielanie inhibitorów trypsyny można przeprowadzić w ciągu 30–40 minut biorąc 2–3 ml soku i kilkumililitrowej objętości kolumny chromatograficznej. Ilość uzyskiwanych białek inhibitorowych jest całkowicie wystarczająca do analizy elektroforetycznej. Użycie mini-komór elektroforetycznych pozwala na wykonanie analizy elektroforetycznej w ciągu jednego dnia roboczego. Preparaty białek inhibitorowych wyizolowane wyżej opisaną metodą chromatografii powinowactwa mogą być przechowywane przez kilka miesięcy w buforze o pH 3,0–3,5 bez zmiany ich właściwości. Można zatem stosować je jako próby porównawcze przy identyfikacji nieznannej odmiany ziemniaka bez potrzeby każdorazowego izolowania nowych wzorców. Korzystne jest posługiwanie się standardem wewnętrznym (w tej pracy stosowano preparat inhibitorów odmiany Baszta) ze względu na niewielkie różnice, jakie mogą pojawić się w przebiegu elektroforezy i wyglądzie obrazów elektroforetycznych. Identyfikacja odmian ziemniaka na podstawie składu inhibitorów bulw w stanie spoczynku jest szczególnie przydatna, ponieważ w tym okresie nie można wykorzystywać innych wskaźników morfologicznych, takich jak: pokrój krzaka, kształt liści, barwa kielków, kwiatów itp.

PODSUMOWANIE

Opracowana procedura elektroforetycznej analizy inhibitorów proteaz izolowanych z bulw ziemniaka metodą chromatografii powinowactwa może znaleźć zastosowanie jako metoda szybkiej identyfikacji odmian ziemniaka. Sposób wydaje się szczególnie użyteczny w okresie spoczynku bulw, gdy można posługiwać się tylko ograniczoną ilością innych cech morfologicznych.

LITERATURA

- Datta K., Usha R., Dutta S. K., Singh M. 2001. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 949 — 959.
- Hou1 W. C., Huang D. J., Lin Y. H. 2002. An aspartic type protease degrades trypsin inhibitors, the major root storage proteins of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Tainong 57). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 271 — 276.
- Ishikowa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nahanura K. 1994. A family of potato genes that encode Kunitz-type proteinase inhibitors: structural comparisons and differential expression. *Plant Cell Physiol.* 35 (2): 303 — 312.
- Kaiser K. P., Bruhn L. C., Belitz H. D. 1974. Proteinase inhibitors in potatoes. Protein, trypsin and hymotrypsin inhibitor patterns by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. A rapid method for identification of potato varieties. *Z. Lobensum. Kuters. Forsch.* 154: 339.
- Kłyszewko-Stefanowicz L. 2003. Ilościowe oznaczanie białka metodą mikrobiuretową. *Ćwiczenia z biochemii*, PWN, Warszawa: 248.
- Lam W., Coast G. M., Rayne R. C. 2000. Characterization of multiple trypsin from the midgut of *Locusta migratori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 85 — 94.

- Lewosz J., Ryś D., Reda S. 1981. Electrophoretic method for determination of molecular forms of trypsin inhibitors of potato tubers. *Analytical Biochemistry* 115: 27 — 29.
- Macedo M. L. R., de Matos D. G. G., Machado O. L. T., Marangoni., Novello J. C. 2000. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry* 54: 553 — 558.
- Pilecka A., Lewosz J. 1999. Zastosowanie technik molekularnych do oceny jednorodności odmianowej ziemniaka. W: *Ochrona ziemniaka. Konferencja. Kołobrzeg, 21–22.04.1999. IHAR Oddz. Bonin: 92 — 95.*
- Reda S., Lewosz J., Hołubowska M., Budnik H. 1981. Identyfikacja odmian ziemniaka na podstawie elektroforetycznego obrazu inhibitorów trypsyny i białek bulw. *Ziemniak* 1981: 27 — 35
- Ryan C. A. 1990. Protease inhibitor in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 425 — 449.