

## ELEKTROFORETYCZNA ANALIZA BIAŁEK W ZASTOSOWANIU DO TAKSONOMII PIERWOTNIAKÓW

EDWARD HADAŚ

Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej  
Instytutu Biostruktury AM, Poznań

Nowoczesna taksonomia w dużej mierze opiera się na danych eksperymentalnych. W zakres eksperymentalnej taksonomii wchodzi ustalenie występowania i charakteru takich różnic wewnątrz- i międzygatunkowych, których nie da się wyjaśnić i określić za pomocą metod jakimi dysponuje morfologia i ekologia. Rozwój eksperymentalnej taksonomii jest ściśle uwarunkowany wprowadzeniem nowoczesnych technik analizowania cech. Z reguły techniki te nie są opracowywane przez systematyków, ale przez specjalistów z innych dziedzin — cytologów, genetyków, biochemików, chemików, matematyków.

Koncepcja stosowania analizy chemicznej w badaniach taksonomicznych nie jest nowa, jednak dopiero ostatnie lata przyniosły żywiłowy rozwój chemotaksonomii. Jej rozwój wiąże się z postępami w dziedzinie biochemii i chemii organicznej, a także z opracowaniem prostych metod analitycznych.

Początkowo zainteresowania systematyków koncentrowały się wokół związków niskocząsteczkowych, takich jak tłuszczowce (Halevy i Finkelstein, 1965), wolne aminokwasy (Albach i Shaffer, 1965; Friz 1969) lub aminokwasy białkowe (Friz, 1970). Jednakże stosowane metody biochemiczne oznaczania tych związków nie dawały pełnego obrazu, jednoznacznie określającego badany gatunek, a tylko jego bliższe lub dalsze pokrewieństwo z innymi.

Wśród podstawowych metod stosowanych obecnie w porównawczych badaniach białek można wyróżnić metody określające cechy strukturalne białka, metody charakteryzujące ich właściwości fizykochemiczne, biologiczne i immunologiczne oraz metody polegające na analizowaniu peptydów częściowo zhydrolizowanego białka i ustaleniu sekwencji aminokwasów. Należy również wymienić metody oznaczania ciężaru cząsteczkowego, analizę elektroforetyczną, chromatograficzną, serologiczną oraz

oznaczanie aktywności katalitycznej. Spośród wymienionych metod, najwięcej informacji o chemicznym pokrewieństwie białek dostarcza analiza sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym i analiza elektroforetyczna. Oznaczanie sekwencji aminokwasów jest kosztowne i pracochłonne, wymaga precyzyjnej aparatury i praktycznie nie jest wykonalne w odniesieniu do wszystkich typów białek. Natomiast charakterystyka białek przeprowadzona na podstawie ich ruchliwości elektroforetycznej jest metodą najszybszą i najprostszą.

Przedmiotem niniejszego artykułu jest uzasadnienie celowości stosowania analizy białek w badaniach taksonomicznych oraz scharakteryzowanie i krytyczne omówienie analizy elektroforetycznej jako metody eksperymentalnej taksonomii. Na szeregu przykładach zilustrowano dotychczasowe zastosowanie elektroforetycznej analizy białek w odniesieniu do taksonomii *Protozoa*.

Szerokie wykorzystanie charakterystyki kompleksów białkowych w badaniach taksonomicznych zyskało realne podstawy dopiero z chwilą opracowania odpowiednich wariantów analizy elektroforetycznej, a szczególnie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym. Przydatność elektroforezy białek do celów taksonomicznych była w ostatnich latach referowana w licznych artykułach, co świadczy o dużej aktualności tego tematu (np. Johnson, 1970; Corradetti i wsp., 1971; Friz i wsp., 1970; Ebert, 1973; 1974 a, b).

Zastosowanie żelu poliakrylamidowego jako nośnika przy elektroforetycznej analizie białek wprowadzili jako pierwsi Davis i Ornstein (1959) oraz Raymond i Wintraub (1959). Żel poliakrylamidowy wykazuje liczne zalety: jest termostabilny; odporny mechanicznie i stosunkowo odporny chemicznie; nie zawiera lub zawiera niewiele bocznych grup jonowych, które są odpowiedzialne za endosmotyczny przepływ, oraz pozwala uzyskiwać różny zakres wielkości porów, co daje efekt sita molekularnego. Dodatnią cechą jest również jego przezroczystość umożliwiająca densytometryczną rejestrację rozdzielonych frakcji białkowych. Przy zastosowaniu żelu poliakrylamidowego jako nośnika opracowano liczne warianty analizy elektroforetycznej białek (Gordon, 1969; Ostrowski, 1970). W badaniach taksonomicznych szerokie zastosowanie znalazła elektroforeza dyskowa opracowana przez Ornsteina i Davisa (1962). Szczegółowe dane dotyczące metodyki elektroforezy dyskowej można znaleźć w artykule Davisa (1964).

Technika elektroforezy dyskowej pozwala analizować próby białka rzędu 50-200  $\mu\text{g}$ . Elektroforeza dyskowa charakteryzuje się dużą siłą rozdzielczą. Szerokie jej zastosowanie tłumaczy się faktem, że jest prosta, nie wymaga skomplikowanej aparatury, a ponadto pozwala stosunkowo szybko wykonać dużą serię analiz porównawczych.

Metody analityczne stosowane w badaniach porównawczych powinny zapewnić dużą reproduktywność wyników. Jak stwierdzono w licznych laboratoriach, elektroforetyczne obrazy białkowe uzyskane techniką elektroforezy dyskowej są wysoce odtwarzalne w warunkach określonego toku postępowania analitycznego. Szczególnie ważne jest kontrolowanie takich czynników, jak pH buforu ekstrahującego białka i temperatura w jakiej przeprowadza się poszczególne etapy analizy. Porównywalność elektroforetycznych obrazów białkowych, podobnie jak ich reproduktywność jest oczywiście uwarunkowana ujednoczeniem stosowanych metod. W badaniach taksonomicznych analizuje się zarówno białko zapasowe, jak i enzymatyczne. Można nawet wyrazić przypuszczenie, że białka zapasowe stanowią cenny materiał do badań, gdyż w tej grupie białek organizm toleruje „akumulację” zmian mutacyjnych. Wydaje się, że również analiza izoenzymów w przyszłości będzie miała duże znaczenie w rozwiązywaniu problemów taksonomii (Bagster i Parr, 1973; Kilgour i Godfrey, 1973). Istnienie w obrębie gatunku izozymowych form enzymu tłumaczy się występowaniem w procesie ewolucyjnym mutacji prowadzących do zmian w strukturze białka enzymatycznego. Z ewolucyjnego punktu widzenia występowanie izozymów jest korzystną cechą organizmu, gdyż chroni go przed utratą funkcji w wyniku mutacji lub wpływu środowiska.

Elektroforetycznym, porównawczym badaniom białek towarzyszy równoległe analizowanie różnych frakcji białkowych oraz stosowanie różnych wariantów analizy, a szczególnie różnych układów buforujących. Należy zwrócić uwagę na prace Reisfelda i wsp. (1962) oraz Williamsa i Reisfelda (1964), którzy do metody Davisa wprowadzili kwaśny system buforujący umożliwiający lepszy rozdział białek zasadowych, oraz na pracę Hyden i Lange (1969) i Hyden i wsp. (1968), którzy opracowali metody mikroelektroforetycznej analizy, pozwalającej analizować próby białka rzędu 1-0,01  $\mu\text{g}$ . Poszerzona analiza elektroforetyczna dostarcza uzupełniających informacji o badanych jednostkach systematycznych i umożliwia bardziej wnikliwe ich różnicowanie. Bardzo pomocne przy ustaleniu homologii prążków białkowych jest równoczesne analizowanie porównywanych ekstraktów i ich mieszanin.

Na podstawie elektroforetycznych obrazów białkowych obliczać można procentowe podobieństwo między porównywanymi taksonami. Obliczenia według Whitneya i wsp. (1968) przeprowadza się w następujący sposób:

$$\frac{\text{liczba par prążków podobnych}}{\text{liczba różnych prążków} + \text{liczba par prążków podobnych}} \times 100.$$

Pozycja białka na elektroforogramach żelu poliakrylamidowego zależy od ładunku i kształtu cząsteczek białkowych. Wynika stąd, że różne

białka mogą wędrować z tą samą szybkością. Jest jednak wysoce prawdopodobne, że w przypadku blisko spokrewnionych jednostek systematycznych, prążki białkowe o tych samych wartościach  $R_p$  i tej samej morfologii reprezentują homologiczne białka. Prawdopodobieństwo ustalenia homologii frakcji białkowych zwiększone jest znacznie, gdy technikę elektroforezy na żelu poliakrylamidowym połączy się z techniką selektywnego wykrywania białek o podobnych właściwościach enzymatycznych (Corbett, 1970; Ebert, 1973; 1974 a, b).

W badaniach taksonomicznych analiza elektroforetyczna białek okazała się przydatna do charakteryzowania jednostek systematycznych na różnych poziomach taksonomicznych. Katès i Goldstein (1964), Friz i wsp. (1970), Kasprzak i wsp. (1973) oraz Visvesvara i Balamuth (1975) — porównując białka rozpuszczalne szeregu gatunków pełzaków — stwierdzili, że elektroforetyczne obrazy białkowe tego samego rodzaju są bardziej podobne niż gatunków reprezentujących odrębne rodzaje. Visvesvara i Balamuth (1975), prowadząc badania nad *Acanthamoeba castellanii* i *Acanthamoeba* sp. szczep Lilly (*A. culbertsoni*), wykazali charakterystyczne różnice w obrazie elektroforetycznym rozpuszczalnych białek tych dwóch gatunków. Hadaś i wsp. (1974) wykazali, że różne szczepy tego samego gatunku mają identyczne elektroforetyczne obrazy białkowe. Ebert (1973, 1974 a, b) wykazał, że istnieje pewna korelacja między zymogramami enzymatycznymi a obrazami białkowymi.

Istnieje pewna grupa pierwotniaków, która nie posiada względnie posiada niewiele wspólnych frakcji białkowych we wzorcach elektroforetycznych. Corbett (1970) badając za pomocą elektroforezy dyskowej szczepy *Tetrahymena pyriformis* i *Tetrahymena vorax* wykazał, że tylko dwa szczepy spośród dwunastu badanych wykazują zgodne wzorce elektroforetyczne białek i zymogramów enzymatycznych, natomiast pozostałe wykazują zupełnie odmienne wzorce. Należy przypuszczać, że zróżnicowanie białek u tego rodzaju uwarunkowane jest zmiennością orzęsków (Corbett i Sweeney, 1966).

Różnice w obrazie elektroforetycznym białek stwierdzono pomiędzy szczepami *Plasmodium berghei* — szczepem Istisan i szczepem Vincke 1967 (Corradetti i wsp., 1971); wartości prążków białkowych były różne co do pozycji i intensywności. Różnice w składzie białek tych dwóch szczepów mogły wynikać ze zmian mutacyjnych, bowiem szczepy te izolowano w odstępie kilku lat i hodowano na różnych gatunkach zwierząt doświadczalnych, jednakże nie stwierdzono wpływu żywiciela na białka pasożytów. Pomimo występowania niezgodności we wzorcach elektroforetycznych białek pewnych grup systematycznych, badania biochemiczne zdobyły duże znaczenie w taksonomii pierwotniaków. Niektóre grupy pasożytniczych pierwotniaków są wyjątkowo mało zróżnicowane,

a niektóre grupy cechuje duża polimorficzność. Elektroforetyczne badania białek okazały się przydatne do określania przynależności gatunkowej tych grup. Le Ray i wsp. (1971) badając grupę trypanosom wykazał odrębność gatunkową *Trypanosoma brucei brucei* i *Trypanosoma brucei gambiense*. Bice i Zeledon (1972) wykazali pokrewieństwo pomiędzy szczepami *Trypanosoma vespertilionis* i *Trypanosoma cruzi*. Reeves i wsp. (1967) oraz Montalvo i Reeves (1968), uwzględniając elektroforetyczne właściwości izomerazy glukozofosforanowej, stwierdzili wyraźne różnice pomiędzy szczepami typowymi i atypowymi *Entamoeba histolytica*.

Badania taksonomiczne stosujące elektroforezę dyskową białek prowadzone są zaledwie od kilku lat. W różnych czasopismach ukazują się stale prace dotyczące zastosowania tej metody. Mają one różną wartość i są często fragmentaryczne. Jednakże wyniki dotychczasowych badań wskazują, że elektroforeza dyskowa jest dobrą metodą badań taksonomicznych. Szczególnie przydatna jest w badaniach gatunków blisko spokrewnionych, mających podobne lub identyczne właściwości biologiczne i morfologiczne, ponieważ dostarcza dane trudne do uzyskania innymi metodami.

„Jeżeli prawdą jest, że znaczniejsze osiągnięcia naukowe mają miejsce w przypadkach uwarunkowanych stanem dyscyplin pomocniczych, wtedy z całą pewnością, i to w krótkim czasie, możemy oczekiwać znacznego postępu, ponieważ pole działania jest przygotowane” (Burns, 1974).

Otrzymano: 29 XII 1975

Adres autora:  
61-701 Poznań, Fredry 10

#### LITERATURA

1. Albach, R. A., Shaffer, J. G.: Free amino acids analysis of 4 strains of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens* in CLG medium. — *J. Protozool.*, 12, 659-665, 1965.
2. Bagster, L. A., Parr, C. W.: Trypanosome identification by electrophoresis of soluble enzymes. — *Nature*, 244, 364-366, 1973.
3. Bice, D. A., Zeledon, R.: Immunoelectrophoretic comparison of *Trypanosoma vespertilionis* and *Trypanosoma cruzi*. — *Rev. Biol. Prop.*, 19, 149-152, 1972.
4. Burns, T. K. R.: Protozoa and Parasitic Helminths. In C. A. Wright ed.: *Biochemical and Immunological Taxonomy of Animals*. — Academic Press, London—New York, 387-395, 1974.
5. Corbett, J. J., Sweeney, J.: Antigenic differences among some classical

- Tetrahymena pyriformis* and *T. vorax* strains. — *J. Protozool.*, 13, 359-366, 1966.
6. Corbett, J. J.: Biochemical comparison of some classical *Tetrahymena pyriformis* and *T. vorax* strains. — *J. Protozool.*, 17, 181-182, 1970.
  7. Corradetti, A., Verolini, F., Bucci, A., Pennacchio, A. E.: Disc electrophoresis of water-soluble plasmodial extracts of two strains of *Plasmodium berghei*. — *Parassitologia*, 13, 385-389, 1971.
  8. Davis, B. J., Ornstein, L.: A new high resolution electrophoresis method. — Delivered at the Society for the Study of Blood at New York Academy of Medicine, March 24, 1959.
  9. Davis, B. J.: Disc electrophoresis — II. Method and application to human serum proteins. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427, 1964.
  10. Ebert, F.: Characterization of *Leishmania donovani* strains by disc electrophoresis. — *Z. Tropenmed. Parasit.*, 24, 517-524, 1973.
  11. Ebert, F.: Electrophoretic studies on *Leishmania tropica* strains. — *Z. Tropenmed. Parasit.*, 25, 49-53, 1974 a.
  12. Ebert, F.: Comparative Electrophoretic Studies on Leishmanial Parasites of Cutaneous Leishmaniasis of the New World and their Relationships to *Leishmania donovani* and *L. tropica*. — *Tropenmed. Parasit.*, 25, 259-266, 1974 b.
  13. Friz, C. T.: The free amino acids levels of *Pelomyxa carolinensis*, *Amoeba dubia* and *Amoeba proteus*. — *J. Protozool.* 15, 149-152, 1969.
  14. Friz, C. T.: The amino acids composition of *Amoeba proteus*, *A. discoides*, *A. dubia* and *Pelomyxa carolinensis*. — *J. Protozool.*, 17, 235-239, 1970.
  15. Friz, C. T., Jansson, I., Magnusson, M. B.: A method for analysis protein in individual amoebae. — *J. Protozool.*, 17, 417-420, 1970.
  16. Gordon, A. H.: Electrophoresis of protein in polyacrylamide and starch gels. In T. S. Work, E. Work ed.: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. — North Holland Publ. Comp., Amsterdam, vol. 1, 1969.
  17. Hadaś, E., Kasprzak, W., Mazur, T.: Electrophoretic studies on strains of small free-living amoebae. — Third International Congress of Parasitology, Munich, 25-31 August, vol. 1, 5-6, 1974.
  18. Halevy, S., Finkelstein, S.: Lipid composition of soil amoebae. — *J. Protozool.*, 12, 250-252, 1965.
  19. Hyden, H., Bjurstram, K., McEwan, B.: Protein separation at the cellular level by micro disc electrophoresis. — *Anal. Biochem.*, 17, 1-15, 1968.
  20. Hyden, H., Lange, P. W.: Microelectrophoretic determination of protein and protein synthesis in the  $10^{-9}$  to  $10^{-7}$  gram range — *J. Chromatog.*, 35, 336-351, 1969.
  21. Johnson, B. L.: The protein electrophoresis to species relationships in wheat. In R. Bogart ed.: Genetic Lectures. — Oregon State University Press, Oregon, vol. 1, 19-44, 1970.
  22. Kasprzak, W., Hadaś, E., Mazur, T.: Elektroforetyczna analiza białek w zastosowaniu do taksonomii pełzaków wolnożyjących. — Materiały XI Zjazdu PTP., Poznań, 10-12 maj 1973.
  23. Kates, J. R., Goldstein, L.: A comparison of the protein composition of three species of amoebae. — *J. Protozool.*, 11, 30-35, 1964.
  24. Kilgour, V., Godfrey, D. G.: Species-characteristic izoenzymes of two

- aminotransferases in trypanosomes. — *Nature New Biol.*, 244, 69-70, 1973.
25. Le Ray, D., Afchain, D., Jadin, J., Fameree, L.: Immunotaxonomic interrelations between *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. — *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 46, 531-532, 1971.
  26. Montalvo, F., Reeves, R. E.: Electrophoretic characterization of amoebal phosphate isomerases. — *Exp. Parasitol.*, 22, 120-136, 1968.
  27. Ornstein, L., Davis, B. J.: Disc electrophoresis. — Preprint by Distillation Product Industries, Eastman Kodak Co., Rochester, N. Y., 1962.
  28. Ostrowski, W.: Elektroforeza w badaniach biochemicznych i klinicznych. — PWN, Warszawa 1970.
  29. Reisfeld, R. A., Lewis, U. J., Williams, D. A.: Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. — *Nature*, 195, 281-283, 1962.
  30. Raymond, S., Wintraub, L.: Acrylamide gel as supporting medium for zone electrophoresis. — *Science*, 130, 711, 1959.
  31. Reeves, R. E., Montalvo, F., Sillero, A.: Glucokinase from *Entamoeba histolytica* and related organism. — *Biochemistry*, 6, 1752-1767, 1967.
  32. Visvesvara, G. S., Balamuth, W.: Comparative studies on related free-living and pathogenic *Amoebae* with special reference to *Acanthamoeba*. — *J. Protozool.*, 22, 245-256, 1975.
  33. Whitney, P. J., Vaughan, J. G., Heale, J. B.: A disc electrophoretic study of the proteins of *Verticillium alboastrum*, *V. dhaliae* and *Fusarium oxysporium* with to their taxonomy. — *J. Exp. Botany*, 19, 415-426, 1968.
  34. Williams, D. E., Reisfeld, R. A.: Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: extension to new conditions of pH and buffer. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 373-381, 1964.

## ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF PROTEINS AS APPLIED TO THE TAXONOMY OF PROTOZOA

by

E. HADAS

This work has been done to justify the purposefulness of using the electrophoretic analysis of proteins as a good method of experimental taxonomy. Several examples are given on which there is critically discussed the hitherto application of the protein analysis method and, particularly, the disc electrophoresis, to the taxonomy of protozoa.