

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Biliński

Janusz KLIMEK, Irena BŁAZIAK, Marian JĘDRYCH
Sławomir WAWRZYCKI

**Ilościowe oznaczanie DNS-aminokwasów
techniką planimetrowania bibułowych elektroforogramów**

Количественное обозначение DNS-аминокислот планиметрической техникой
бумажных электрофорограмм

The Quantitative Determination of DNS-Amino Acids by the Planimetry Technique
of Paper Electrophoresis

Białko spełnia podstawową funkcję w każdym żywym organizmie i dlatego jest przedmiotem wszechstronnych badań. Ustaloną pozycję zajmują rozważania nad strukturą pierwszorzędową, oparte na metodach chemicznych (4, 5, 6). Szczególne znaczenie ze względu na wysoką czułość rzędu 10^{-9} M ma technika dansylacji (3, 7, 8, 10, 13, 15). W parze z postęпами, jakie uzyskano w zakresie analizy jakościowej DNS-aminokwasów, szły równoległe badania w kierunku ustalenia kryteriów ilościowych. Wszystkie rozwiązania oparto na pomiarze intensywności fluorescencji bezpośrednio na nośnikach bibułowych względnie żelowych lub też w wyciekach kolumny. W każdym z tych sposobów stosowano cenną i trudno dostępną aparaturę, której brak stał się przeszkodą w realizacji wspomnianych badań (1, 2, 16). Nasza praca jest próbą pokonania przedstawionych trudności przez zastosowanie planimetru do pomiaru powierzchni zajętej przez DNS-aminokwasy na bibułowych elektroforogramach.

MATERIAŁY I METODY

Metanol cz.d.a., wodorotlenek sodu cz.d.a., trzeciorzędowy ortofosforan sodu cz., roztwór buforowy pH 12,7 (0,1 M NaOH i 0,1 M Na_3PO_4 — w stosunku objętościowym 1:1), wzorce DNS-aminokwasów, bibuła Whatman Nr 1 — pochodziły z Centrali Chemicznej w Gliwicach.

Aparat do elektroforezy niskonapięciowej, wykonany przez Warsztaty Konstrukcyjno-Naprawcze AM w Lublinie, lampa rtęciowa HPW z filtrem Wooda-Philips umieszczona w statywie drewnianym pozwalającym na obrysowywanie konturów świecących plam DNS-aminokwasów na bibułowych elektroforogramach, planimetr typ „Reiss” (NRD).

W części statystycznej wyliczono współczynniki korelacji — r , określono proste regresji metodą najmniejszych kwadratów oraz sprawdzono hipotezę o istotności zależności liniowej za pomocą testu — t (6, 11).

Proponowana technika w najogólniejszych zarysach przedstawia się następująco: na bibułę chromatograficzną nanosi się metanolowe roztwory wzorcowych DNS-aminokwasów o wzrastającym gradiencie stężenia. Po elektroforezie niskonapięciowej paski bibuły suszy się na powietrzu w temperaturze pokojowej. Kontury świecących plam zakreśla się ołówkiem w świetle UV i planimetruje. W dalszej kolejności zestawia się powierzchnie ze stężeniami i określa rachunkowo równanie prostej regresji. Nieznana koncentrację uzyskuje się po wstawieniu do równania zmierzonej powierzchni.

BADANIA WŁASNE

Wzorcowe roztwory DNS-aminokwasów

Metanolowe roztwory DNS-aminokwasów przygotowywano w stężeniu 500×10^{-9} M/ml. Roztwory te rozcieńczano metanolem do koncentracji: $100 \times$, $200 \times$, $300 \times$, 400×10^{-9} M/ml. Czynność tę powtarzano kolejno dla osiemnastu DNS-aminokwasów. Wszystkie płyny sporządzano bezpośrednio przed elektroforezą bibułową.

Wykonanie elektroforezy bibułowej oraz określenie powierzchni fluoryzujących plam DNS-aminokwasów

Przygotowanie komory do pracy polegało na napełnieniu czterech naczyń buforem i wyrównaniu poziomu cieczy oraz zmostkowaniu przy pomocy bibuły nasyconej buforem (12). Następnie paski bibuły z zaznaczonymi miejscami nakroplenia DNS-aminokwasów wkładano do roztworu buforowego. Nadmiar buforu usuwano przy pomocy bibuły filtracyjnej. W dalszej kolejności umieszczano paski w komorze i наносzono przy pomocy mikropipety 0,01 ml wzorcowych DNS-aminokwasów w metanolu. Zabiegano o to, aby obydwa końce paska były jednakowo zanurzone od jednego do półtora centymetra. Elektroforeza trwała trzy godziny przy napięciu 300 V oraz natężeniu 12 mA. Po wysuszeniu elektroforogramy podświetlano lampą rtęciową z filtrem Wooda. Po ustaleniu zarysów świecących DNS-aminokwasów określano powierzchnię przy pomocy planimetru. Kontury pojedynczej plamy planimetrowano trzykrotnie, a otrzymany wynik dzielono przez trzy.

Ruchliwość elektroforetyczna DNS-aminokwasów

Ruchliwość elektroforetyczną ustalano na podstawie elektroforogramów oraz wzoru — 1.

$$U = \frac{S \cdot l}{E \cdot t} \dots \dots \dots 1$$

gdzie: U — ruchliwość elektroforetyczna w $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sek}^{-1}$, S — droga przebyta przez DNS-aminokwas w cm, l — długość paska bibuły w cm, E — napięcie w V, t — czas trwania elektroforezy w sek.

We wszystkich przypadkach przyjmowano: S — jako odległość w cm między startem oraz punktem znajdującym się w środku plamy, l — pełną długość paska w cm. Pozostałe dane odczytywano z mierników napięcia i czasu. W tab. 1 zebrano komplet badanych DNS-aminokwasów i ułożono według wzrastającej ruchliwości elektroforetycznej.

Tab. 1. Ruchliwość elektroforetyczna — U DNS-aminokwasów — DNS-AK
The electrophoresis mobility — U of DNS-amino acids — DNS-AK

DNS-AK	U
DNS-Ileu	2,07
DNS-Tre	2,59
DNS-Try	2,81
DNS-Cys-SH	2,90
DNS-Fen	2,90
DNS-Tyr	2,96
DNS-Pro-OH	3,11
DNS-Arg	3,25
DNS-Glu	3,29
DNS-Glu-NH ₂	3,40
DNS-Asp-NH ₂	3,60
DNS-Wal	3,62
DNS-Ser	3,65
DNS-Liz	3,92
DNS-Pro	3,92
DNS-Met	4,10
DNS-Ala	4,40
DNS-Asp	5,50

Wyznaczenie równań prostych regresji
jako funkcji logarytmicznej stężeń
do powierzchni plam DNS-aminokwasów

Otrzymane drogą planimetrowania powierzchnie plam odpowiadające użytym stężeniom wzorców były podstawą do określenia równań prostych regresji dla wszystkich badanych DNS-aminokwasów — wzór 2.

$$P = a + bx \dots \dots \dots 2$$

gdzie: $P_{(D,P)}$ — powierzchnie świecących plam w mm^2 , x — logarytm ze stężenia DNS-aminokwasów, a, b — współczynniki określone drogą rachunkową.

Współczynniki: a i b określono oddzielnie dla każdego z badanych DNS-aminokwasów. W ten sposób otrzymano osiemnaście równań prostych regresji. Tab. 2 przedstawia te równania dla wszystkich badanych substratów. Na podstawie tych wyrażeń wyznaczono teoretyczne powierzch-

Tab. 2. Równania prostych regresji DNS-AK
The regression equations of DNS-AK

Lp.	DNS-AK	$y=a+b \log c$
1	DNS-Ala	$y=-144,05+111,80 \cdot \lg c$
2	DNS-Arg	$y=-145,55+97,58 \cdot \lg c$
3	DNS-Asp	$y=-68,50+121,40 \cdot \lg c$
4	DNS-Asp-NH ₂	$y=-210,31+165,28 \cdot \lg c$
5	DNS-Cys-SH	$y=-125,69+147,88 \cdot \lg c$
6	DNS-Fen	$y=-162,61+166,64 \cdot \lg c$
7	DNS-Glu	$y=-260,12+185,97 \cdot \lg c$
8	DNS-Glu-NH ₂	$y=-271,06+185,46 \cdot \lg c$
9	DNS-Ileu	$y=-291,10+196,90 \cdot \lg c$
10	DNS-Liz	$y=-160,79+100,49 \cdot \lg c$
11	DNS-Met	$y=-29,10+100,45 \cdot \lg c$
12	DNS-Pro	$y=-108,50+94,46 \cdot \lg c$
13	DNS-Pro-OH	$y=-78,99+116,87 \cdot \lg c$
14	DNS-Ser	$y=-95,04+102,52 \cdot \lg c$
15	DNS-Tre	$y=-201,20+142,96 \cdot \lg c$
16	DNS-Try	$y=-290,59+179,90 \cdot \lg c$
17	DNS-Tyr	$y=-180,79+100,43 \cdot \lg c$
18	DNS-Wal	$y=-169,22+151,99 \cdot \lg c$

nie dla badanego zakresu stężeń. Tab. 3 ilustruje obliczone przy pomocy wzoru — 3 względne odchylenie — B między wyliczoną powierzchnią płamy — P_T a powierzchnią otrzymaną na drodze planimetrowania — P_D :

$$B = \frac{(P_D - P_T)}{P_D} \cdot 100 \quad \dots \dots \dots 3$$

Statystyczna ocena założeń metody

Zastosowano układ współrzędnych na płaszczyźnie do wstępnego ustalenia zależności liniowej pomiędzy powierzchnią doświadczalną — P_D a logarytmem stężenia — x . Dalszej oceny zależności dokonano opierając się na współczynnikach korelacji — r obliczonych na podstawie wzoru 4.

$$r = \frac{n \sum x P_D - \sum x \sum P_D}{\sqrt{\{n \sum x^2 - (\sum x)^2\} \{n \sum P_D^2 - (\sum P_D)^2\}}} \quad \dots \dots \dots 4$$

Istotność zależności sprawdzono wzorem — 5

$$t = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \sqrt{n-2} \quad \dots \dots \dots 5$$

Porównanie obliczonych wartości — t z wartościami odczytanymi przy czterech stopniach swobody i poziomach: $\alpha=0,05$ i $\alpha=0,01$ pozwoliło na uformowanie ostatecznych wniosków o istotności zależności — z (tab. 4).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Ustalono, że stężenie DNS-AK: $10\times$, $20\times$, $30\times$, $40\times$ i 50×10^{-9} M dają małe powierzchnie świecących plam na bibułowych elektroforogra-

Tab. 3. Powierzchnie doświadczalne — P_D i teoretyczne — P_T w mm^2 oraz ich odchylenia w procentach — B dla: 100X, 200X, 300X, 400X i 500X¹⁰⁻⁹ M DNS-AK (wg kolejności tab. 2)
 The experimental areas — P_D and theoretical ones — P_T in mm^2 and their deviations in percentages — B for: 100X, 200X, 300X, 400X and 500X¹⁰⁻⁹ M of DNS-AK (according to the succession Tab. 2)

Lp.	P_D	P_T	B	Lp.	P_D	P_T	B	Lp.	P_D	P_T	B
1	77,70	78,55	1,10	7	110,00	111,82	1,63	13	155,00	155,75	0,42
	110,00	113,20	1,12		167,79	167,79	0,46		189,92	189,92	0,49
	125,00	132,87	6,20		200,52	200,52	0,26		210,49	210,49	0,24
	145,00	146,85	1,20		223,77	223,77	1,24		225,10	225,10	0,05
155,00	157,69	1,08	240,00	241,81	0,75	237,00	236,24	0,32			
2	50,00	49,61	0,22	8	100,00	99,86	0,14	14	110,00	110,00	—
	78,00	78,98	1,25		155,00	155,68	0,46		140,85	140,85	0,60
	97,00	96,15	0,12		188,32	188,32	0,11		160,00	158,90	0,69
	108,00	108,35	0,35		210,00	211,50	0,71		173,30	171,71	0,92
118,00	117,81	0,15	230,00	229,49	0,78	180,00	181,66	0,08			
3	175,00	174,30	0,38	9	103,00	102,70	0,20	15	85,00	84,72	0,33
	210,00	210,84	0,40		160,00	161,80	1,16		127,00	127,75	0,59
	233,00	232,20	0,34		200,00	196,60	1,70		154,00	153,00	0,65
	247,00	247,38	0,16		220,00	221,20	0,56		170,00	170,78	0,46
260,00	259,15	0,32	240,00	240,10	0,10	185,00	184,64	0,19			
4	120,00	120,24	0,20	10	40,00	40,19	0,48	16	70,00	69,21	0,11
	170,00	169,99	0,60		70,00	70,43	0,70		123,00	123,35	0,29
	200,00	199,08	0,54		90,00	88,12	2,13		155,00	155,02	0,02
	220,00	219,74	0,11		100,00	100,68	0,68		177,00	177,50	0,29
235,00	235,77	0,44	110,00	110,43	0,39	196,00	194,96	1,05			
5	170,00	170,07	0,05	11	230,00	230,00	—	17	20,00	20,07	0,35
	215,00	214,06	0,26		260,00	260,25	0,10		50,00	50,39	0,78
	240,00	240,06	0,07		280,00	277,89	0,85		70,00	67,97	3,00
	260,00	259,09	0,65		290,00	290,47	0,17		80,00	80,53	0,66
273,00	273,43	0,16	300,00	300,21	0,07	90,00	90,27	0,30			
6	170,00	170,67	0,45	12	77,80	78,40	0,77	18	135,00	134,76	0,17
	220,00	220,83	0,38		106,70	106,55	0,24		180,00	180,50	0,25
	250,00	250,15	0,10		120,00	123,00	2,50		207,00	207,25	0,13
	270,00	270,98	0,38		130,00	134,70	3,49		228,00	226,25	0,72
290,00	287,15	0,99	145,00	143,70	0,90	240,00	241,00	0,42			

Tab. 4. Współczynniki korelacji — r, wartości — t oraz istotność zależności — z DNS-AK
 Correlation coefficients — r, values — t and the reality of dependence — z of
 DNS-AK

DNS-AK	r	t	z*
DNS-Ala	0,99	12,23	++
DNS-Arg	0,99	12,23	++
DNS-Asp	0,99	12,23	++
DNS-Asp-NH ₂	0,99	12,23	++
DNS-Cys-SH	0,99	12,23	++
DNS-Fen	0,98	8,48	++
DNS-Glu	0,99	12,23	++
DNS-Glu-NH ₂	0,99	12,23	++
DNS-Ileu	0,99	12,23	++
DNS-Liz	0,49	1,75	--
DNS-Met	0,99	12,23	++
DNS-Pro	0,99	12,23	++
DNS-Pro-OH	0,99	12,23	++
DNS-Ser	0,99	12,23	++
DNS-Tre	0,84	2,68	+—
DNS-Tru	0,99	12,23	++
DNS-Tyr	0,99	12,23	++
DNS-Wal	0,99	12,23	++

* ++ istnieje istotna zależność w populacji $\alpha=0,05$, $\alpha=0,01$, +— istnieje istotna zależność w populacji $\alpha=0,05$, -- nie stwierdzono zależności w populacji przy podanych poziomach istotności.

mach. Zwiększenie ilości nanoszonych próbek do $100\times$, $200\times$, $300\times$. $400\times$ i 500×10^{-9} M podnosi obszar fluorescencji, a tym samym pomiar staje się dokładniejszy (9). Koncentracja, objętość nanoszonych wzorcowych roztworów, bufor oraz wszystkie parametry doświadczenia odtwarzano starannie za każdym razem. Pozwalało to uzyskać prawidłowy wzrost powierzchni w odniesieniu do rosnącego gradientu stężenia DNS-AK. Obrysowywanie konturów fluoryzujących plam DNS-AK wzbudzonych techniką podświetlania na bibułowych elektroforogramach oraz trzykrotne planimetrowanie uzasadniało się względami praktycznymi.

Wyznaczone szybkości elektroforetyczne badanych DNS-AK wskazują na to, że w stosowanym układzie buforowym nie uzyskuje się pełnego rozdziału wspomnianych substratów. Nie znaczy to, że w niektórych przypadkach, gdy ruchliwości elektroforetyczne są zróżnicowane, nie można przeprowadzić rozdziału wybranych DNS-AK (tab. 1). Podstawowym założeniem opracowanej metody było twierdzenie, że pomiędzy logarytmem stężenia DNS-AK oraz powierzchnią istnieje liniowa zależność, której istotność potwierdzono rachunkiem statystycznym. W związku z tym wyliczono współczynniki a i b dla prostych regresji, otrzymując dla każdej substancji odpowiednie równanie (tab. 2). Na podstawie tych wyrażeń ustalono powierzchnie teoretyczne — P_T dla poszczególnych koncentracji oraz porównywano je z powierzchniami doświadczalnymi — P_D wyznaczonymi planimetrycznie. Rezultatem tego działania był względny błąd określony w procentach — B (tab. 3).

Potwierdzenie prawdziwości otrzymanych wyników uzyskano poprzez obliczenie współczynników korelacji — r i wartości — t , które porównywano z analogicznymi wartościami odczytanymi z tablic dla dwóch najczęściej przyjmowanych poziomów istotności: $\alpha=0,05$, $t_{\alpha}=2,35$, $\alpha=0,01$, $t_{\alpha}=4,54$. Badając za pomocą testu t — Studenta istotność tej zależności stwierdzono w szesnastu przypadkach wysoką istotność zależności przy $\alpha=0,01$. W jednym przypadku przy $\alpha=0,05$ nie potwierdzono tej istotności, co jeszcze nie znaczy, że nie będzie jej przy większej populacji (tab. 4). W ten sposób można założyć, że na podstawie otrzymanych równań istnieje możliwość wyznaczenia powierzchni przy podanym stężeniu, lub też odwrotnie — przy nieznanym stężeniu można je wyznaczać mając podaną powierzchnię plamy.

Sumując powyższe stwierdza się, że przedstawiona metoda jest użyteczna do ilościowego oznaczenia nieznannej ilości DNS-aminokwasów, jeśli naniesie się ją na ten sam pasek bibuły obok wzorców i rozwinie elektroforetycznie w opisanych warunkach. Przeprowadzone rozważania statystyczne wskazują na to, że proponowana metoda nie ustępuje innym technikom wymagającym kosztownych aparaturowych zestawów. Z tego więc wynika że, w aspekcie praktycznym jest ona prosta w wykonaniu, a do jej realizacji nie jest potrzebna działalność inwestycyjna.

PIŚMIENNICTWO

1. Bailey J.: *Techniques in Protein Chemistry*, 163—221, Elsevier Publishing Company, Amsterdam—London—New York 1967.
2. Blackburn S.: *Amino Acid Determination*, 151—179, Marcel Dekker, New York 1968.
3. Bulton A., Bush I.: *Biochem. J.*, **92**, 11P—12P, 1964.
4. Edman P.: *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283—293, 1950.
5. Edman P.: *Acta Chem. Scand.*, **4**, 277—282, 1950.
6. Elandt R.: *Statystyka matematyczna w zastosowaniu do doświadczeń rolniczego*, 335—460, PWN, Warszawa 1964.
7. Gray W., Hartley B.: *Biochem. J.*, **89**, 59P—59P, 1963.
8. Gray W., Hartley B.: *Biochem. J.*, **89**, 379—380, 1963.
9. Mierzejewski J.: *Chemia Anal.*, **17**, 297—305, 1972.
10. Needle D., Pollitt R.: *Biochem. J.*, **97**, 607—608, 1965.
11. Niewiarowicz A.: *Przemysł spożywczy*, **9**, 501—505, 1955.
12. Ostrowski W.: *Elektroforeza w badaniach biochemicznych i klinicznych*, 61—121, PWN, Warszawa 1970.
13. Percy M., Buchwald B.: *Anal. Biochem.*, **45**, 60—67, 1972.
14. Sanger F.: *Biochem. J.*, **39**, 507—515, 1945.
15. Seiler N., Wiechmann J.: *Exper.*, **20**, 559—560, 1964.
16. Worowski K.: *Wiadomości Chem.*, **27**, 789—811, 1973.

Otrzymano 7 IV 1975.

РЕЗЮМЕ

Представили логарифмическую зависимость между поверхностью пятна на бумажной электроферограмме и концентрацией DNS-аминокислот.

Доказали, что вышесказанная зависимость даёт возможность количественно обозначить DNS-аминокислоты в диапазоне 10^{-9} М с точностью до 1%.

SUMMARY

The logarithmic function between the area of the spot on paper electropherogram and the concentration of DNS-amino acids has been shown.

It has been proved that the above dependence allows for the quantitative determination of DNS-amino acids in the range of 10^{-9} M to a 1 percentage precision.