



## Glikocentra łańcucha peptydowego globulin bobiku jako źródła epitopów

Henryk Kostyra<sup>1</sup>, Elżbieta Kostyra<sup>2</sup>, Stanisław Krawczuk<sup>2</sup>,  
Beata Jarmołowska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polska Akademia Nauk,  
Olsztyn

<sup>2</sup>Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

### Glyco-centres of Faba bean globulins as a source of epitops

#### Summary

The reaction of non-enzymatic glycation of Faba bean globulins progressed effectively in weakly basic medium. The cross-linking of globulins was formed first of all in the results of Schiff's reaction between amine group of Lys and aldehyde group of glucose. The glycated globulins demonstrated higher immunogenic activity in comparison with the non-glycated ones. This means that non-enzymatic glycation of Faba bean globulins caused the formation of new epitops in the peptide chains. The results achieved prove that non-enzymatic glycation of Faba bean globulins changes their immunogenic properties.

#### Key words:

Faba bean globulins, non-enzymatic glycation, immunogenic properties.

## 1. Wprowadzenie

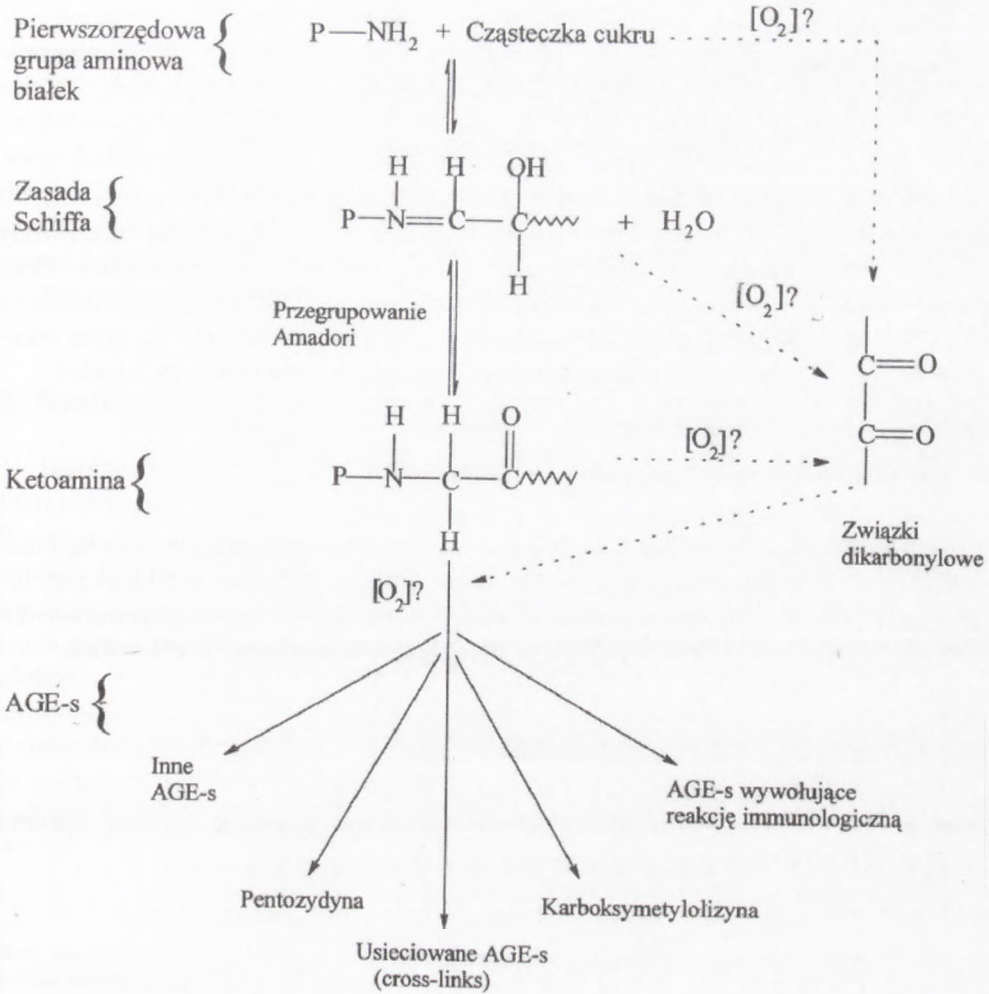
Bobik jest dobrze plonującą rośliną w polskich warunkach klimatycznych i glebowych. Nasiona bobiku wykorzystywane są głównie na cele paszowe, ze względu na wartościowe białka, które coraz częściej rozpatruje się jako potencjalne źródło białek żywności (1). Przeszkodą w ich wykorzystaniu na cele żywieniowe są towarzyszące im związki przeciwżywniowe. We wcześniejszych naszych badaniach dowiedliśmy, że ekstrakty globulin bobiku są nukleo-gliko-metalobiałkowym kompleksem (2). Oznacza to, że zarówno grupy aminowe białek jak i kwasów nukleino-

#### Adres do korespondencji

Henryk Kostyra,  
Instytut Rozrodu Zwierząt  
i Badań Żywności,  
Polska Akademia Nauk,  
Olsztyn.

#### biotechnologia

3 (54) 202-207 2001



Rys. 1. Mechanizm glikacji białek oraz powstawania produktów zaawansowanej glikacji AGE-s (*advanced glycation end products*) (6).

wych mogą wchodzić w reakcje nieenzymatycznej glikacji (rys. 1) (3). Produkty tej reakcji najprawdopodobniej mogą wykazywać immunogenne, a może i alergenne właściwości.

Celem pracy były badania wpływu nieenzymatycznej glikacji globulin bobiku na ich właściwości immunogenne.

## **2. Materiał i metody**

### **2.1. Ekstrakcja globulin**

Globuliny bobiku (odmiana „Dino”) ekstrahowano wg metody Schwenke i wsp. (4) z własną modyfikacją. Mączkę nasion bobiku (10 g) zalewano 7,5-krotną ilością wody doprowadzonej do pH 8,0 i wstrząsano 30 min w łaźni wodnej w temperaturze 25°C. nierozpuszczalne składniki usuwano za pomocą wirowania (3000 × g, 20 min). Globuliny oddzielano od supernatantu po doprowadzeniu roztworu do pH 4,2 przez wirowanie (3000 × g, 20 min). Osad liofilizowano i przechowywano do dalszych badań.

### **2.2. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym**

Żel poliakrylamidowy o stężeniu 100 g/kg przygotowywano według metody Ng i Busluk (5). Rozdziały globulin przeprowadzano w buforze tris-glicynowym o pH 8,3 i przy napięciu 40 V/cm żelu. Masę cząsteczkową frakcji białkowych po ich uwidocznieniu barwnikiem Comassie Brilliant Blue R-250 określano z krzywej wzorcowej ( $l \text{ gM} = f(R_f)$ ).

### **2.3. Oznaczanie N-końcowych aminokwasów**

N-końcowe aminokwasy ekstraktu globulin identyfikowano metodą opisaną w pracy Saul i Needleman (6).

### **2.4. Nieenzymatyczna glikacja globulin bobiku**

200 mg globulin bobiku i 150 mg glukozy rozpuszczono w 40 ml buforu fosforanowego o pH 8,0. Roztwór stabilizowano dodatkiem 0,5 ml 2% roztworu azydku sodu, po czym inkubowano go w temp. 37°C przez 48 h. Po inkubacji roztwór dializowano wobec wody dejonizowanej w temp. 5°C do momentu usunięcia glukozy, po czym liofilizowano.

### **2.5. Badania immunochemiczne**

Króliki immunizowano wstrzykując im podskórną 1 mg zglikolizowanych i niezglikolizowanych globulin zemulgowanych 0,2 ml adjuwantu Freuda. W pierwszym szczepieniu stosowano pełny adjuwant, w kolejnych czterech niepełny. Króliki skrwawiano po 6 tygodniach, surowicę oddzielano poprzez wirowanie (600 × g, 10 min).

Chromatografia powinowactwa: żel Sepharose 4B aktywowano roztworem CNBr wysyconym eterem etylowym. Przeciwciała wobec zglikolizowanych globulin w ilości 100 mg rozpuszczone w 10 ml buforu węglanowego o pH 8,3 immobilizowano na kolumnach (2,5 × 60 cm) wypełnionej zaktywowanym żelem. Na tak przygotowane kolumny nanoszono zglikolizowane i niezglikolizowane globuliny w ilości 50 mg rozpuszczone w 1 ml buforu fosforanowego o pH 6,86. Związane na kolumnie antygeny eluowano 0,1 M buforem glicyna-HCl o pH 2,8 w temp. ok. 2°C. Użyte frakcje natychmiast alkalizowano buforem fosforanowym.

Test podwójnej dyfuzji płytkowej wykonano według Ouchterlony (7).

### 3. Wyniki i dyskusja

Wyniki analizy elektroforetycznej przedstawiono w tabeli 1. Ekstrakt globulin bobiku rozdzielił się na 13 frakcji o masach cząsteczkowych w zakresie od 18-84 kDa. Podobne wyniki uzyskali inni badacze (8). W wyniku rozdziału ekstraktu zglikolizowanych globulin uzyskano 10 frakcji. Nie stwierdzono frakcji o masach cząsteczkowych 18, 23 i 50 kDa. Prawdopodobnie frakcje te utworzyły kompleksy z innymi frakcjami globulin za pomocą wiązań z udziałem grup aminowych białka i aldehydowej glukozy. W przeprowadzonej analizie zglikolizowanego ekstraktu globulin metodą chromatografii powinowactwa wykazano, że nieenzymatycznej glikacji uległy frakcje o masach cząsteczkowych 18, 23, 30, 32, 50, 55, 66, i 79 kDa. Wyniki te, jak się zdaje, potwierdzają przypuszczenie o tworzeniu się kompleksów nie tylko między jednorodnymi frakcjami, ale również pomiędzy różnymi frakcjami globulin (tab. 1).

Tabela 1

Masy cząsteczkowe niezglikolizowanych, zglikolizowanych i zglikolizowanych oczyszczonych frakcji globulin bobiku rozdzielonych metodą elektroforezy

Frakcja	Globuliny (Da)		
	niezglikolizowane	zglikolizowane	zglikolizowane oczyszczone
1	84 000	84 000	84 000
2	79 000	79 000	—
3	66 000	66 000	—
4	60 000	60 000	60 000
5	55 000	55 000	—
6	50 000	—	—
7	48 000	48 000	48 000
8	44 000	44 000	44 000
9	36 000	36 000	36 000
10	32 000	32 000	—
11	30 000	30 000	—
12	23 000	—	—
13	18 000	—	—

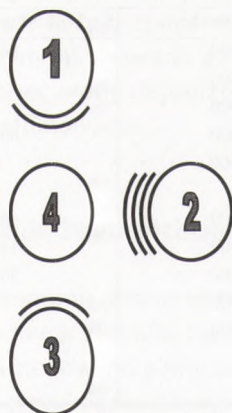
N-końcowymi aminokwasami stwierdzonymi w ekstrakcie globulin były: Lys, Leu, Thr, Tyr i Gly. W ekstrakcie zglikolizowanych globulin wykryto te same N-końcowe aminokwasy z wyjątkiem Lys. Można zatem przyjąć, że głównym aminokwasem łańcuchów peptydowych globulin wchodzącym w reakcje nieenzymatycznej glikacji była Lys. Wspomniano, że globuliny bobiku są powiązane z kwasami nukleinowymi, nie można również wykluczyć, że ich grupy aminowe brały także udział w reakcji nieenzymatycznej glikacji.

Tabela 2

N-końcowe aminokwasy zglikolizowanych i niezglikolizowanych globulin bobiku

Globuliny	N-końcowe aminokwasy
niezglikolizowane	Lys, Leu, Thr, Tyr, Gly
zglikolizowane	Leu, Thr, Tyr, Gly

W teście podwójnej dyfuzji płytkowej określono efekty precypitacyjne wywołane interakcjami przeciwciał uzyskanych w wyniku immunizacji królików zglikolizowanymi globulinami ze zglikolizowanymi, niezglikolizowanymi i oczyszczonymi zglikolizowanymi uzyskanymi z chromatografii powinowactwa globulinami (rys. 2). Dwie dodatkowe linie precypitacyjne stwierdzono tylko w przypadku zglikolizowanych globulin.



Rys. 2. Test podwójnej immunodyfuzji płytkowej: 1) niezglikolizowane globuliny; 2) zglikolizowane globuliny; 3) oczyszczone zglikolizowane globuliny; 4) przeciwciała wobec zglikolizowanych globulin.

#### 4. Podsumowanie

Reakcja nieenzymatycznej glikacji globulin bobiku przebiegała efektywnie w słabo zasadowym środowisku, głównie tworząc wiązania pomiędzy grupą aminową Lys i grupą aldehydową glukozy. W wyniku tej reakcji powstają nowe glikocentra w łańcuchach peptydowych frakcji globulin o właściwościach epitopów. Na podstawie uzyskanych wyników przypuszcza się, że nieenzymatyczna glikacja białek żywności może zmieniać ich właściwości immunogenne, a także produkować prekursorów biologicznie aktywnych peptydów, również o właściwościach alergennych.

#### Literatura

1. Schmandke H., (1988), *Die Ackerbohne (Vicia Faba) als Lebensmittelrohstoff*, Academic-Verlag, Berlin.
2. Kostyra H., Darewicz M., (1993), *Biul. Nauk. ART.*, Olsztyn, 2, 75-79.
3. Booth A. A., Khalifah R. G., Todd P., Hudson B. G., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 5430-5437.
4. Schwenke K. D., Robowsky K. D., Augustat D., (1978), *Nahrung*, 8 Mitt. 22, 425-437.
5. Ng P. K. W., Bushuk W., (1987), *Cereal Chem.*, 64, 324-327.
6. Saul B., Needleman B., (1970), *Protein sequence determination*, Springer-Verlag, Berlin.
7. Oucherlony O., (1964), *Immunological Methods*, Blackwell Scientific, Oxford.
8. Tucci M., Caparelli R., Costa A., Rao R., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 81, 50-58.