

Isoelectric Focusing of Highly Aggregative
Wheat (*Triticum durum* Desf.) Storage Proteins

by Marie-Hélène MOREL and Jean-Claude AUTRAN

Poster presented at the ICC '89 Symposium, 13-15 June 1989,
Lahti, Finland

Gliadins and low molecular weight glutenins (LMWG) are the major groups of wheat storage proteins. Although they have different densities of charges, gliadins and LMWG cannot be distinguished by conventional electrophoresis techniques. In the absence of a reducing agent, LMWG form high molecular weight aggregates that remain unresolved in native PAGE. On the other hand, LMWG are poorly resolved in standard isoelectric focusing (IEF), due to their strong basic nature and high sensitivity to oxydants.

In order to limit the cathodic drift of the pH gradient and to keep LMWG in a reduced form, a new IEF procedure was adapted from ALTLAND studies (1). Ultrathin (0.2 mm) polyacrylamide gels were polymerized in water, washed, dried, stored until use and rehydrated by a 4M or 8M urea solution containing 2 % (w/v) ampholytes (pH range 4-9) and dithioerythritol (DTE). Wheat proteins were solubilized by a water/acetonitril/mercapto-ethanol (40/50/10) solvent. The extract was loaded near the anode of a Multiphor 2117 LKB apparatus and focussed under 3900 V x h conditions.

It was shown that: 1) the presence of DTE in the rehydration medium was strictly necessary to enable the focusing of LMWG, in contrast to the other wheat proteins; 2) the IEF gels were stable for months if frozen and stored at -80°C; 3) they could be used as first dimension for two-dimensional runs (IEF x SDS-PAGE); 4) the equilibration time in Tris-Glycine/SDS buffer was critical: 1 min 15 was the optimum for getting a high resolution and limiting spots fading.

Amongst durum wheat varieties, which ranged in gluten viscoelasticity, two main types of LMWG patterns were observed: LMWG-1 type comprised a basic quadruplet band pattern, while LMWG-2 type comprised a basic triplet band pattern. These two types were respectively relevant for those involving gamma-gliadin 42 and gamma-gliadin 45, which have been associated to a low and a high gluten elastic recovery, respectively. By densitometric scanning of the IEF gels, the lower proportion of LMWG-1 was confirmed (22 % of total extracted proteins), compared to LMWG-2 (32 %). Two-dimensional analysis of LMWG-1 and LMWG-2 groups suggested that the most acidic components were homologous in isoelectric points and molecular weight, in contrast to the most basic one. Accordingly, it was assumed that a high elastic recovery of gluten could be essentially determined by the strongest and most basic component of the LMWG-2 group.

Presented at ICC '89, Lahti, Finland. 13-15 June 1989

ELECTROFOCALISATION DES PROTEINES DE RESERVE HAUTEMENT AGREGATIVES DU BLE

Marie-Hélène MOREL et Jean-Claude AUTRAN

Laboratoire de Technologie des Céréales
2 Place Viala. 34060 Montpellier Cedex

Gliadines et gluténines constituent les protéines de réserve du grain de blé (Triticum aestivum L.). Contrairement aux gliadines qui sont des protéines monomériques, les gluténines forment des agrégats de taille élevée (1 à plusieurs millions) et ne peuvent être résolues en PAGE natif. Après réduction, les fractions gluténines de haut poids moléculaire (HMW) peuvent être résolues en électrophorèse SDS-PAGE. Au contraire, les gluténines de faible poids moléculaire (LMW) ne peuvent être identifiées en SDS-PAGE car elles se superposent à d'autres protéines (gamma-gliadines). Gliadines et LMW-gluténines se distinguent cependant par leur pH isoélectrique. Mais la focalisation des LMW reste médiocre par les méthodes classiques en raison de leur caractère très basique (dérive du gradient) et de leur sensibilité aux oxydants (présence de persulfate d'ammonium). En effet, la destruction des agrégats de LMW est obtenue par une réduction des liaisons disulfures en milieu dénaturant (SDS ou urée), mais cette réduction préalable ne suffit pas à maintenir les polypeptides dans un état dissocié permettant leur focalisation sous forme de bandes homogènes. D'où la mise au point d'une méthode d'IEF dérivée de celle de Altland et Rossman (1985), et qui consiste en:

- la préparation d'un gel de polyacrylamide ultra-mince
- le lavage et le séchage du gel
- une réhydratation en présence d'Ampholines, d'urée et de doses variables de réducteur (DTE).

Dans ces conditions (présence de DTE dans le milieu de réhydratation), la focalisation des LMW est possible et la meilleure résolution est obtenue pour une dose de 50 mM.

La méthode a été utilisée pour la quantification des LMW chez Triticum durum Desf. Elle peut constituer une première étape pour l'établissement d'un diagramme bidimensionnel.

ELECTROFOCALISATION DES PROTEINES DE RESERVE HAUTEMENT AGREGATIVES DU BLE

(M.H MOREL et J.C. AUTRAN)

Laboratoire de Technologie des Céréales
INRA
2 place Viala 34060 Montpellier cedex 1

INTRODUCTION

Gliadines et gluténines constituent les protéines de réserve du grain de blé (*Triticum durum Desf.*). Contrairement aux gliadines qui sont des protéines monomériques, les gluténines forment des agrégats de tailles élevées qui ne peuvent être résolus en PAGE natif. Après réduction, les unités gluténines de haut poids moléculaire sont identifiées en PAGE-SDS, alors que les gluténines de faible poids moléculaire (LMWG) restent confondues avec les gliadines. Gliadines et gluténines de faible poids moléculaire se distinguent par leur pH isoélectrique. Cependant, la focalisation des LMWG par les méthodes classiques d'électrofocalisation horizontale reste médiocre en raison de leur caractère très basique et de leur grande sensibilité aux oxydants.

Pour limiter au mieux la dérive du gradient de pH et maintenir les LMWG à l'état réduit, nous avons adopté l'utilisation de gels d'acrylamide lavés, séchés puis réhydratés en présence d'un réducteur de thiols, d'urée et d'ampholytes selon une méthode dérivée de K. Altland (1).

MATERIELS ET METHODES

Les gels (23x12x0.02 cm), sont préparés par emprisonnement de la solution d'acrylamide (T=5%, C=3%) entre deux plaques de verre dont l'une supporte une feuille de polyester activé (Gel-Fix, SERVA). Après polymérisation, le gel est lavé 3 X 10 min dans un bain d'eau distillée puis 1 x 30 min dans une solution de glycérol 10% (W/V). Après une nuit de séchage, les gels sont réhydratés par 15 ml d'une solution d'urée 4M ou 8M, d'ampholytes 4-6.5 et 6.5-9 (Pharmalytes à 2% (W/V) final, Pharmacia) et de dithio-1,4-érythritol (DTE).

L'électrofocalisation est menée à 13°C à l'aide du Multiphor 2117, LKB. De l'acide glutamique 40 mM et de la soude 1 M sont utilisés comme électrolytes ; après une préfocalisation de 400 VH à 7 W constants, l'électrophorèse se poursuit pendant 2000 VH puis 1500 VH à 2800 V constants (durée totale 2 H et 45 min). Les protéines du blé sont solubilisées par un mélange d'acétonitrile 50% et de mercapto-éthanol 10% ; les dépôts sont réalisés du côté acide du gel.

RESULTATS et DISCUSSIONS

1-Effet du dithio-1,4- érythritol.

En l'absence d'agent réducteur dans le milieu de réhydratation, des traînées sont observées du côté basique du gel (Fig. 1, A). L'addition de DTE 5 mM, permet de révéler la présence des LMWG (Fig. 1, B) qui sont complètement focalisées lorsque la concentration en DTE atteint 50 mM (Fig. 1, C). De toute évidence, les gels séchés puis réhydratés présentent une activité oxydante qui conduit à l'agrégation des LMWG, mais qui peut être éliminée par l'adjonction d'un réducteur au milieu de réhydratation. K. Altland, a déjà souligné l'apparition d'une activité oxydante pendant le séchage de gels d'Immobilines (1) ; activité qui provoque la formation d'une liaison covalente disulfure entre globines humaines au cours de la focalisation (2).

2-Utilisation des gels d'électrofocalisation pour l'établissement de diagrammes bidimensionnels.

Le diagramme bidimensionnel est réalisé en combinant l'électrofocalisation à une électrophorèse PAGE-SDS selon U.K. Laemmli (3). Après l'électrofocalisation, le gel est découpé en bandes de 12x.8 cm qui peuvent être stockées à - 80 °C sans altération. Lors de l'utilisation, les bandes sont équilibrées dans un tampon Tris-glycine 50 mM pH 6.8, SDS 2% et saccharose 10% (W/V) puis légèrement enfoncées dans le gel de concentration. L'ensemble des opérations (électrofocalisation + PAGE-SDS) peut être réalisé dans la même journée.

La durée d'équilibration du gel d'électrofocalisation est critique : en deçà de 1 min 30 s les protéines ne sont pas complètement saturées en SDS et leur migration est ralentie par rapport au témoin (Fig. 2, A et B); mais après 2 min d'équilibration de nombreux spots ne sont plus révélés par le bleu de Coomassie (Fig. 2, C). En routine, nous réalisons un compromis en équilibrant le gel 1 min et 15 s (Fig. 2, D).

3-Analyse intervariétale des LMWG de *Triticum durum* Desf.

La figure 3 présente les diagrammes d'électrofocalisation de quelques variétés de blé dur. Si l'on s'intéresse à la région la plus basique du diagramme, deux groupes peuvent être distingués : certaines variétés possèdent un quadruplet de protéines basiques (LMWG-1), alors que les autres possèdent un triplet (LMWG-2). Ces deux groupes de variétés correspondent aux variétés de type gamma gliadine 42 et gamma gliadine 45 ; cette dernière étant utilisée comme marqueur de la qualité technologique du blé dur (4). Ces deux gliadines, protéines allèles codées au niveau du locus Gli-B1 sont génétiquement associées aux deux groupes de LMWG 1 et 2 (5).

D'après les études densitométriques que nous avons menées, les LMWG-2 représentent 32% des protéines extraites par notre solvant contre 22% pour les LMWG-1. C'est la protéine la plus basique du groupe des LMWG-2 qui est quantitativement la plus représentée. Cette protéine pourrait être responsable de la meilleure qualité viscoélastique du gluten des variétés de type 45. Et ce d'autant plus, que compte tenu des similitudes de pHi et de poids moléculaires révélés par l'analyse bidimensionnelle, les deux protéines les plus acides des deux groupes semblent identiques (Fig. 4).

Figure 1 : Effet du DTE sur l'électrofocalisation des protéines du blé.

La solution de réhydratation comprend les ampholytes, l'urée 4M et : 0 mM de DTE (A) ; 5 mM de DTE (B) ; 50 mM de DTE (C).

Figure 2 : Diagrammes bidimensionnels des protéines du blé : effet du temps d'incubation des gels d'électrofocalisation dans le tampon d'équilibration.

Les gels d'électrofocalisation sont incubés en Tris-glycine 50 mM, pH 6.8, SDS 2% (W/V) et saccharose 10% pendant : 45 s (A) ; 1 min 35 s (B) ; 2 min s (C) ; 1 min 15 s (D).

Figure 3 : Electrofocalisation des protéines de réserve de quelques variétés de blés durs (*Triticum durum Desf.*).

Les protéines sont solubilisées et analysées par électrofocalisation selon le protocole décrit en Matériels et Méthodes. De gauche à droite on distingue : Agathé (type 45) ; Mondur (type 45) ; Alpidur (type 45) ; variété en cours de sélection (type 42) ; Pastour (type 45) ; Kidur (type 42) ; Arcour (type 45) ; Cando (type 42) ; variété en cours de sélection (type 45) ; variété en cours de sélection (type 42) ; Kidur (type 42) et Tomclair (type 42).

Figure 4 : Diagrammes bidimensionnels des variétés Agathé (type 45, LMWG-2) et Calvinor (type 42, LMWG-1).

Les diagrammes sont réalisés en combinant l'électrofocalisation (Matériels et Méthodes) des protéines avec une électrophorèse PAGE-SDS (T=9 %, C = 2.8%) selon U.K. Laemmli. Variétés présentées: Agathé (type 45) (A); Calvinor (type 42) (B). Les flèches pleines indiquent les deux composés homologues des groupes LMW-1 et LMW-2.

(1) Altland K. et Rosmann U. *Electrophoresis* 1985, 6, 314-325

(2) Altland K., Becher P., Rossmann U. et Bjellqvist B. *Electrophoresis* 1988, 9, 474-485.

(3) Laemmli U.K. *Nature* 1970, 227, 680-685.

(4) Damidaux R., Autran J.C., Grignac P. et Feillet P. C. R. *Acad. Sci. Paris* 1978, série D, 287, 701-704.

(5) Payne P.I., Jackson E.A. et Holt L.M. *J. Cereal Sci.* 1984, 2, 73-81.

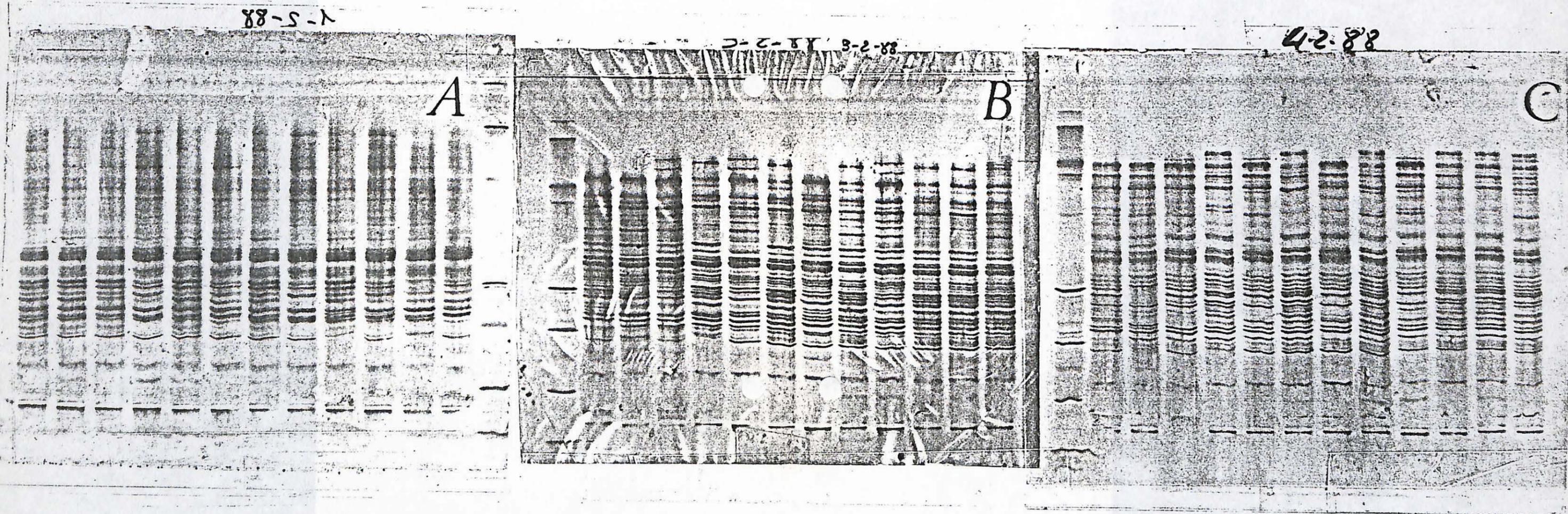


Figure 1 : Effet du DTE sur l'électrofocalisation des protéines du blé.
La solution de réhydratation comprend les ampholytes, l'urée 4M et : 0 mM de DTE (A) ; 5 mM de DTE (B) ; 50 mM de DTE (C).

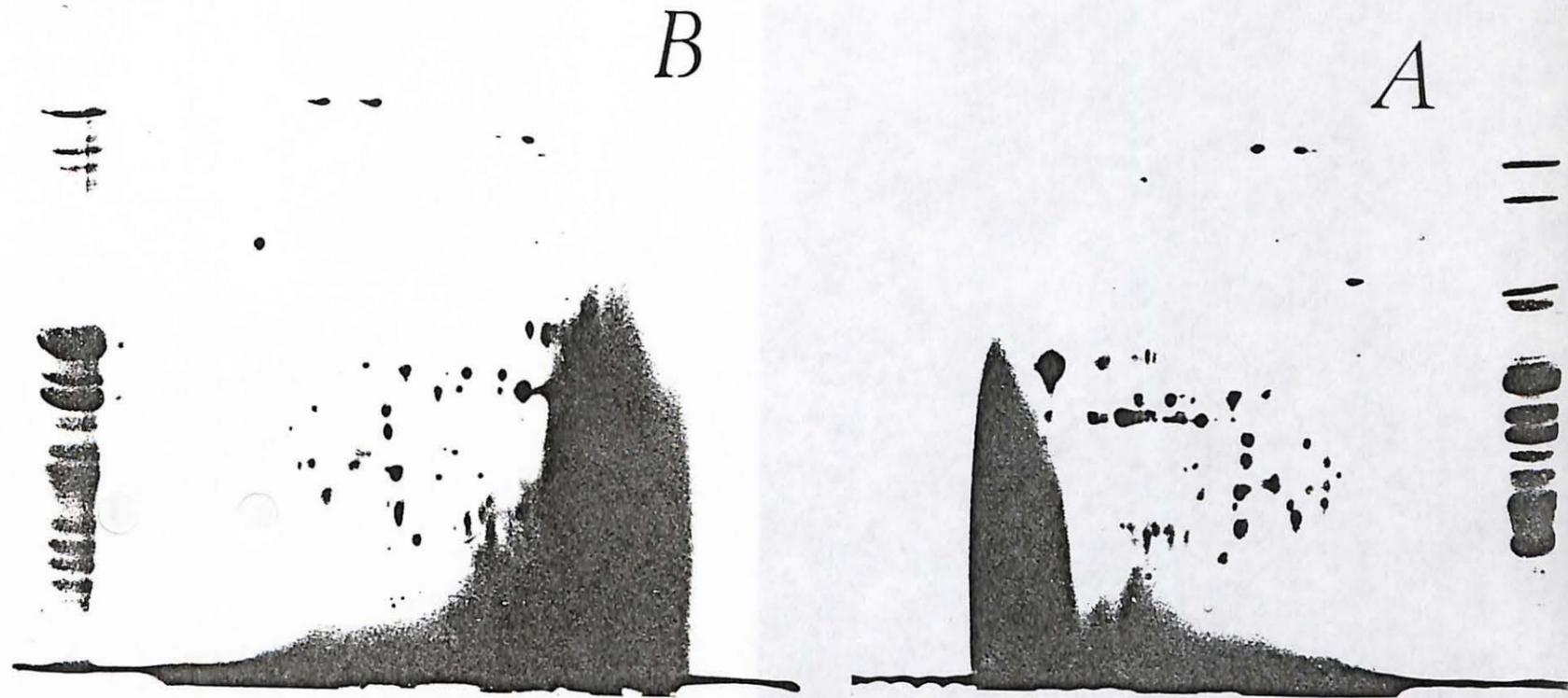
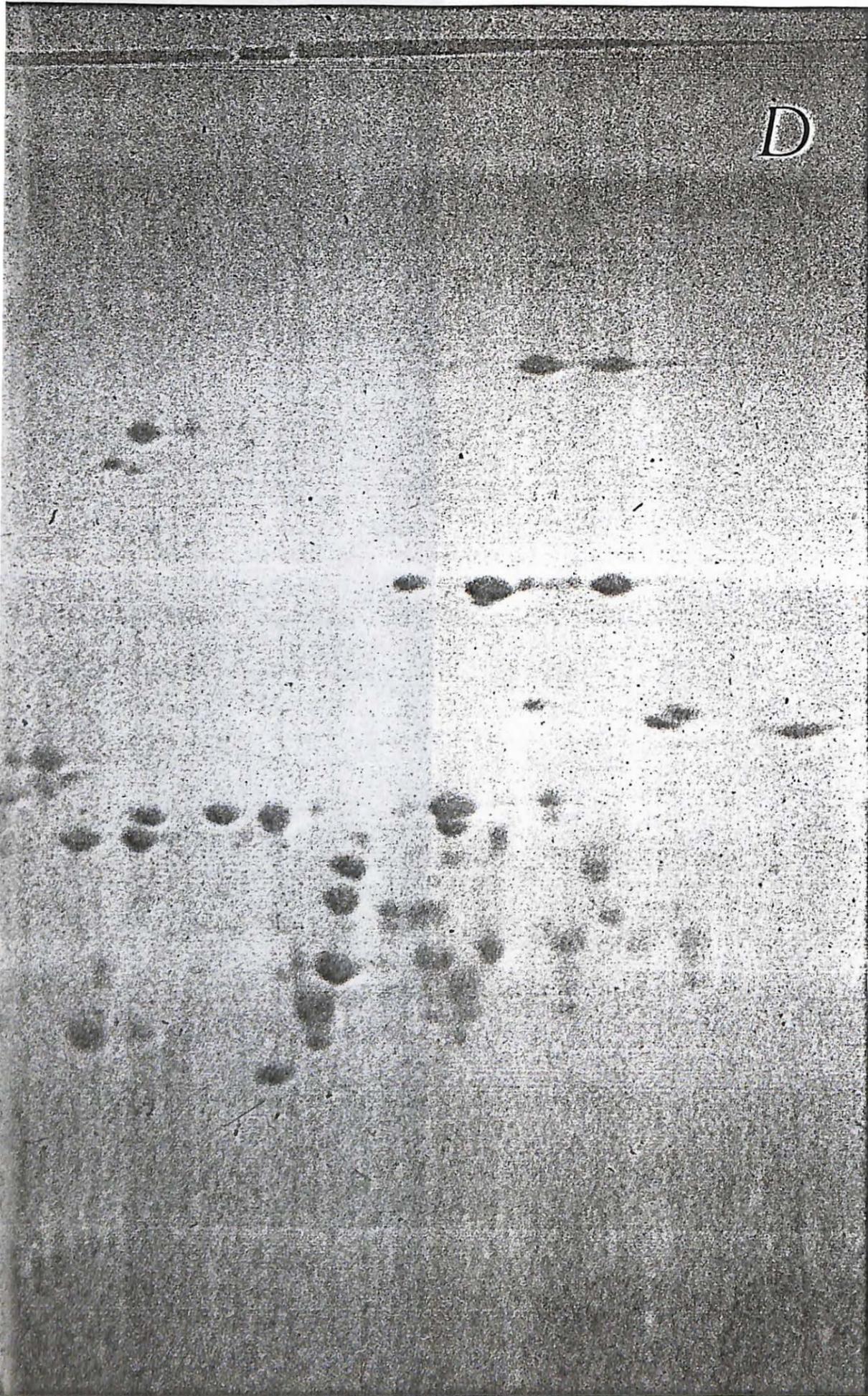


Figure 2 : Diagrammes bidimensionnels des protéines du blé : effet du temps d'incubation des gels d'électrofocalisation dans le tampon d'équilibration.

Les gels d'électrofocalisation sont incubés en Tris-glycine 50 mM, pH 6.8, SDS 2% (W/V) et saccharose 10% pendant : 45 s (A) ; 1 min 35 s (B) ; 2 min s (C) ; 1 min 15 s (D).

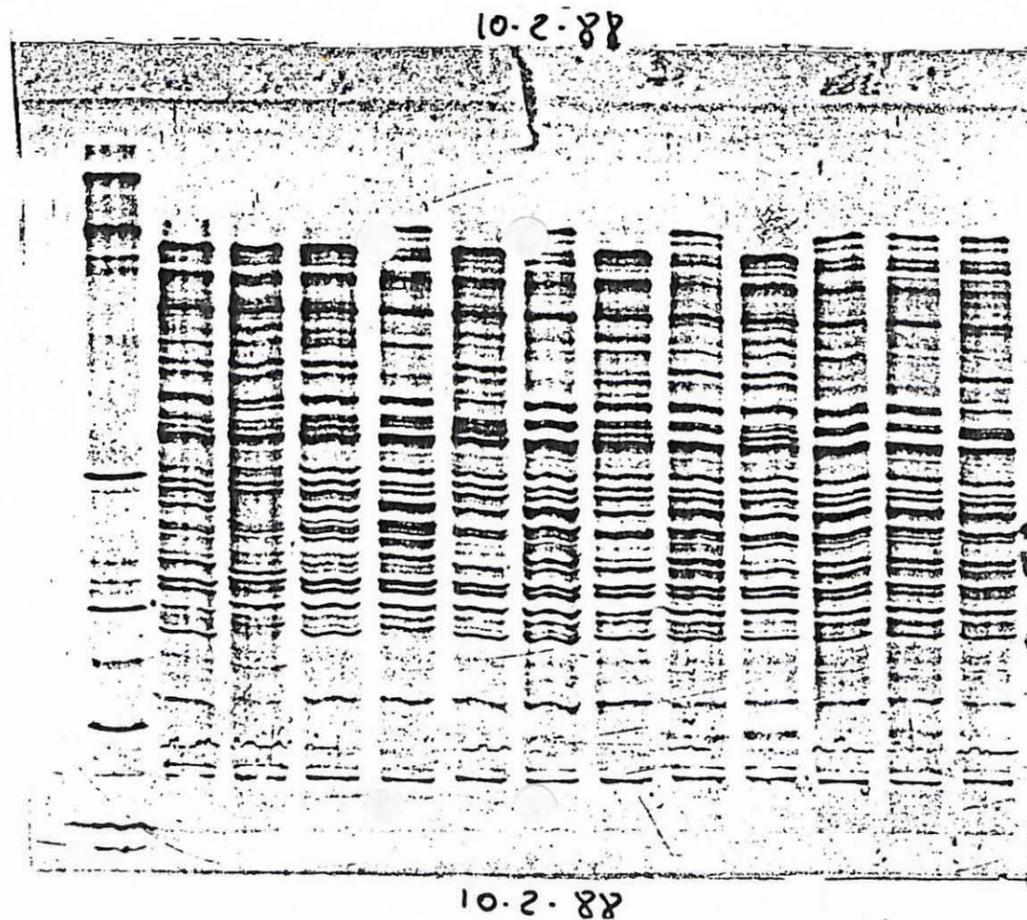


Figure 3 : Electrofocalisation des protéines de réserve de quelques variétés de blés durs (*Triticum durum* Desf.).

Les protéines sont solubilisées et analysées par électrofocalisation selon le protocole décrit en Matériels et Méthodes. De gauche à droite on distingue : Agathé (type 45) ; Mondur (type 45) ; Alpidur (type 45) ; variété en cours de sélection (type 42) ; Pastour (type 45) ; Kidur (type 42) ; Arcour (type 45) ; Cando (type 42) ; variété en cours de sélection (type 45) ; variété en cours de sélection (type 42) ; Kidur (type 42) et Tomclair (type 42).

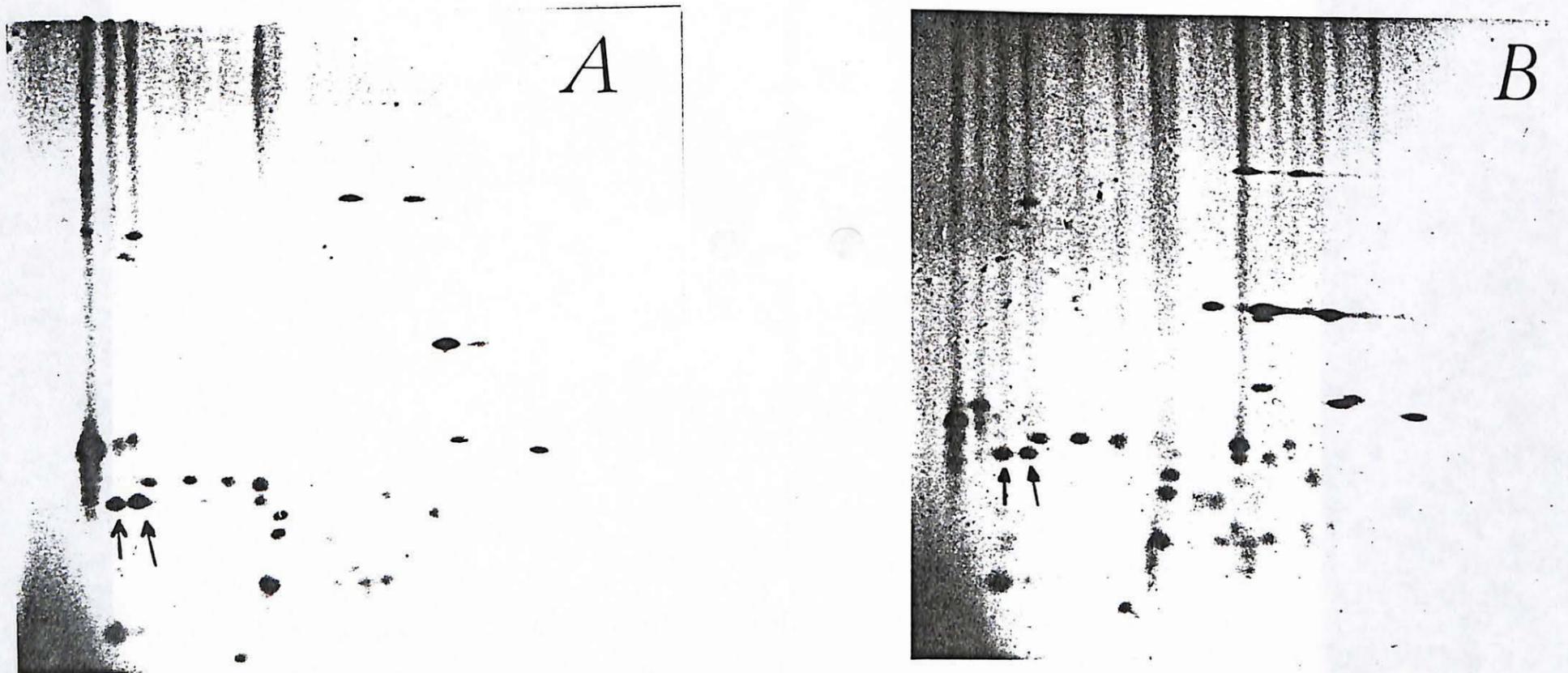


Figure 4 : Diagrammes bidimensionnels des variétés *Agathé* (type 45, LMWG-2) et *Calvinor* (type 42, LMWG-1).

Les diagrammes sont réalisés en combinant l'électrofocalisation (Matériels et Méthodes) des protéines avec une électrophorèse PAGE-SDS (T=9 %, C = 2.8%) selon U.K. Laemmli. Variétés présentées: *Agathé* (type 45) (A); *Calvinor* (type 42) (B). Les flèches pleines indiquent les deux composés homologues des groupes LMW-1 et LMW-2.

Proceedings from

Therin
→ *etc*

ICC '89
SYMPOSIUM

WHEAT END-USE PROPERTIES

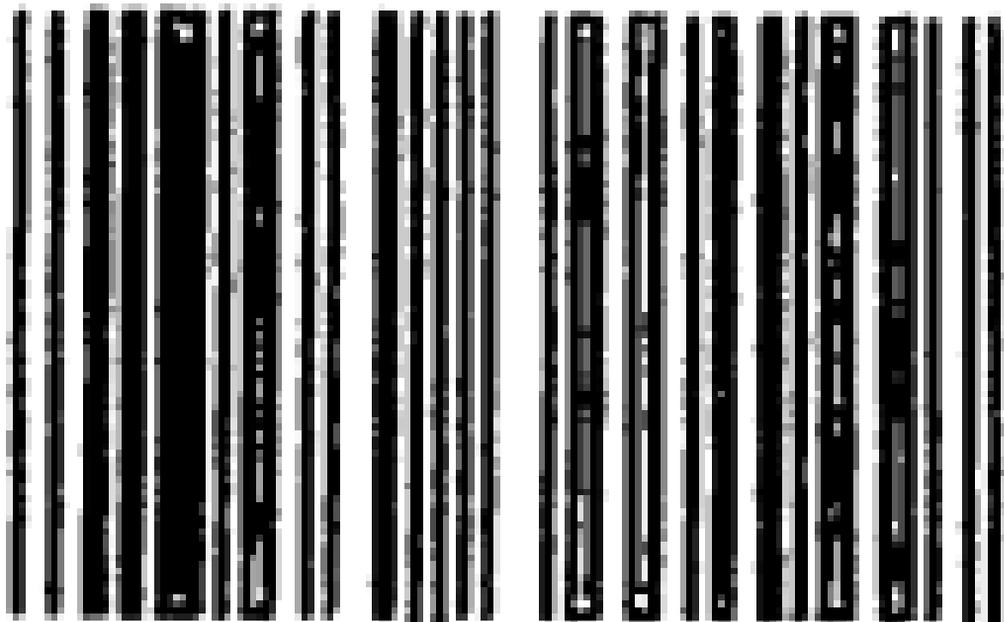
Wheat and Flour Characterization for
Specific End-Uses



Lahti 1989

Compiled by H. Salovaara

15 €



32354 640149