

CHROM. 3605

### Persulfate et artefacts en électrophorèse sur gel d'acrylamide

L'étude des peptides libérés lors de l'activation du trypsinogène de mouton<sup>1</sup> nous a amenés à émettre l'hypothèse de l'existence de deux isoenzymes du trypsinogène. Cette hypothèse a été confirmée par la mise en évidence, par les méthodes de SANGER et d'EDMAN, de deux résidus N-terminaux, la phénylalanine et la valine.

Les premières tentatives en vue de séparer les deux isoenzymes par électrophorèse sur gel d'acrylamide par la méthode de REISFELD *et al*<sup>2</sup> ont échoué. Nous avons alors soumis le trypsinogène de mouton à l'électrophorèse sur gel d'acrylamide à un pH plus acide, selon la méthode de CHOULES ET ZIMM<sup>3</sup> et nous avons obtenu deux bandes bien distinctes après coloration à l'amidoschwarz (Fig. 1).

Avant de conclure que les deux bandes correspondaient bien aux deux isoenzymes du trypsinogène, nous avons effectué sur chacune d'elles la détermination du résidu N-terminal en faisant agir directement sur les gels non révélés, soit le fluorodinitrobenzène selon la méthode de CATSIMPOOLAS<sup>4</sup>, soit le phénylisothiocyanate en adaptant aux gels la méthode classique d'EDMAN. L'identification des DNP-acides aminés par chromatographie sur couche mince<sup>5</sup>, après découpage des tranches de gel et hydrolyse du matériel fixé, met en évidence les deux résidus N-terminaux Val et Phe dans chaque bande, en proportion sensiblement équivalente. De même, l'hydrolyse des PTH-acides aminés, suivie de l'identification des acides aminés par chromatographie à l'aide d'un analyseur Beckman Spinco donne un rapport Phe/Val identique pour les deux bandes.

L'activité potentielle envers l'ester éthylique de la benzoylarginine (BAEE) montre qu'il s'agit bien de trypsinogène dans les deux bandes, l'activité de la bande

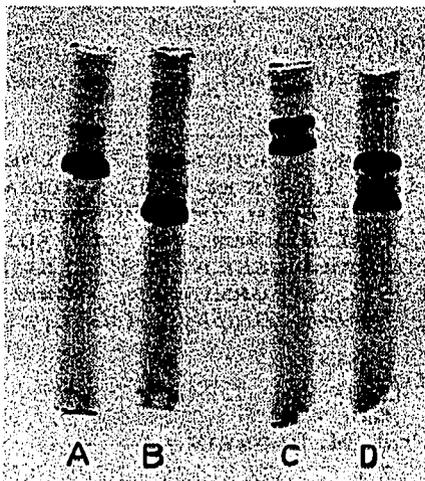
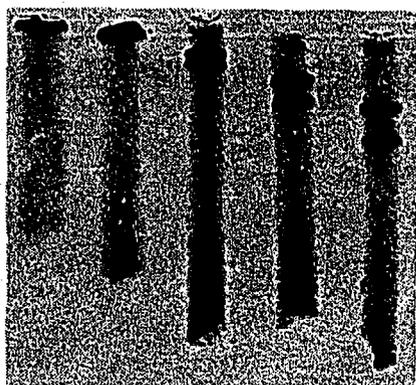


Fig. 1. Electrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de persulfate de 10  $\mu$ g de trypsinogène de mouton, à pH 2.5 selon la méthode de CHOULES ET ZIMM<sup>3</sup>. Le temps d'électrophorèse est respectivement de 30 min, 60 min, 2 h, 3 h et 4 h.

Fig. 2. Electrophorèse sur gel d'acrylamide de 10  $\mu$ g de trypsinogène de mouton en présence et en absence de persulfate. A et B, persulfate éliminé par passage du courant pendant 8 h sous une tension de 80 V, 2 mA par gel. C et D, persulfate éliminé par passage du courant pendant 30 min, même tension. Durée de l'électrophorèse: A et C: 3 h; B et D: 4 h.

la plus lente étant cependant moins élevée que celle de la bande la plus rapide. Il ne s'agit pas de trypsine, celle-ci se séparant distinctement du trypsinogène sur les gels.

Plusieurs articles ont paru signalant la possibilité d'artefacts dus à la présence de persulfate<sup>6,7</sup>. Celui-ci, qui était éliminé lors de nos premiers essais, en faisant passer le courant dans les gels pendant une demi-heure sous une tension de 80 V, 2 mA par gel en reliant le compartiment inférieur à l'anode, a été éliminé de façon plus complète en portant le temps de pré-électrophorèse à 8 h, le tampon du compartiment anodique étant changé trois fois. La Fig. 2 montre le résultat des électrophorèses effectuées en parallèle sur deux séries de gels débarrassés du persulfate respectivement pendant 30 min et 8 h. Une seule bande importante est visible dans les gels débarrassés du persulfate tandis qu'une deuxième bande d'importance à peu près égale à la première apparaît dans les gels où le persulfate n'a été éliminé que pendant 30 min. D'une manière générale, il faut signaler que le trypsinogène migre plus vite dans les gels sans persulfate et que les disques sont moins nets.

Nous pensons que la bande la plus lente activable par la trypsine, mais dont l'activité est légèrement inférieure à celle de la bande rapide, correspond à un trypsinogène partiellement oxydé, l'oxydation ayant fait apparaître une ou plusieurs charges négatives. Le trypsinogène de mouton contient deux résidus méthionine et 11 résidus demi-cystine, il y a donc probablement un groupe -SH libre. La bande la plus lente pourrait correspondre à un trypsinogène où le résidu cystéine ou les résidus méthionine seraient oxydés sous l'action du persulfate. Signalons également que le trypsinogène de boeuf et le trypsinogène de chèvre ne donnent pas lieu au même phénomène.

D'une manière générale, nous pensons qu'il faut être très prudent dans l'interprétation des résultats obtenus par électrophorèse sur gel d'acrylamide et que l'élimination du persulfate par passage du courant pendant une demi-heure est très insuffisante.

Laboratoire de Biochimie\*,  
Université de Liège (Belgique)

ROBERT SCHYNS

- 1 S. BRICTEUX-GREGOIRE, R. SCHYNS ET M. FLORKIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 127 (1966) 277.
- 2 R. A. REISFELD, U. J. LEWIS ET D. E. WILLIAMS, *Nature*, 195 (1962) 281.
- 3 G. L. CHOULES ET B. H. ZIMM, *Anal. Biochem.*, 13 (1965) 336.
- 4 N. CATSIMPOOLAS, *Anal. Biochem.*, 19 (1967) 592.
- 5 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER ET G. PATAKI, *Experientia*, 17 (1961) 145.
- 6 K. H. FANTES ET I. G. S. FURMINGER, *Nature*, 215 (1967) 750.
- 7 W. A. MITCHELL, *Biochim. Biophys. Acta* 147 (1967) 171.

Reçu le 16 mai 1968

\* Directeur: Prof. M. FLORKIN.