

CHROM. 11,449

Note

Détermination de la mobilité électrophorétique libre des protéines par électrophorèse en gradient de polyacrylamide

PATRICK MASSON

Division de Chimie et Pharmacologie, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, 108, Boulevard Pinel, 69272 Lyon Cédex 1 (France)

(Reçu le 28 juin 1978; manuscrit modifié reçu le 8 septembre 1978)

La relation de Ferguson¹ suggère la possibilité théorique de déterminer la mobilité électrophorétique libre (m_0) par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

$$\log m = \log m_0 - K_R T \quad (1)$$

(K_R représente le coefficient de retardement et T la concentration totale en acrylamide et méthylène-bis-acrylamide). La méthode directe proposée par Morris et Morris² est imprécise et celle de Rodbard et Chrambach³ fondée sur la conversion de la mobilité relative (Rm_0) en mobilité absolue peut engendrer d'importantes erreurs; aussi, la plupart des utilisateurs préfèrent exprimer les mobilités en termes relatifs.

La méthode que nous proposons est une synthèse et une extension de celle d'Hedrick et Smith⁴ et de Manwell⁵; le calcul de la mobilité électrophorétique libre que nous effectuons ne nécessite aucune opération technique supplémentaire et vient naturellement en complément de la détermination de la masse moléculaire, objet initial de ces deux méthodes. Ce procédé présente en outre l'intérêt de permettre la détermination des mobilités libres des séries de protéines polymériques, impossible par électrophorèse en veine liquide ou sur papier.

THÉORIE

La vitesse de migration d'une protéine dans un gradient concave de polyacrylamide $T = f(x)$ est donnée par la relation de Manwell⁵

$$\frac{dx}{dt} = k(x_L - x) \quad (2)$$

La molécule se déplaçant dans un milieu de plus en plus dense, sa mobilité décroît et tend vers zéro lorsqu'elle atteint l'hypothétique distance limite x_L .

Avec pour conditions initiales $x = 0$ lorsque $t = 0$, la solution de l'équation 2 est:

$$\frac{x_L - x}{x_L} = e^{kt} \quad (3)$$

Pour t suffisamment petit ($kt < 1$), on peut écrire l'équation 3 sous la forme :

$$x = \frac{x_L t}{\frac{1}{k} + t} \quad (4)$$

Cette équation d'une hyperbole équilatère dont l'asymptote est x_L , peut être transformée :

$$\frac{1}{x} = \frac{1}{kx_L} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{x_L} \quad (5)$$

k , l'abscisse à l'origine, a les dimensions de l'inverse d'un temps et $1/k$ représente le temps nécessaire à une protéine donnée pour parcourir une distance $x = x_L/2$. C'est une grandeur caractéristique d'une protéine migrant dans des conditions définies.

$$t_{0.5} = \frac{1}{k} \quad (6)$$

La connaissance de K_R , de $T = f(x)$ et de $t_{0.5}$ permet d'accéder directement à la mobilité électrophorétique libre.

Selon l'équation 1 de Ferguson, la mobilité $m = dx/dt$ à une concentration T d'acrylamide s'écrit :

$$\frac{dx}{dt} = m_0 e^{-2.3K_R f(x)} \quad (7)$$

(le champ électrique est arbitrairement choisi égal à 1 V/cm).

L'intégration de $y = \int dt$ entre $t = 0$ et $t_{0.5} = 1/k$ donne :

$$t_{0.5} = \frac{1}{m_0} \int_0^{x_L/2} e^{2.3K_R f(x)} \quad (8)$$

d'où l'on tire la mobilité libre m_0

$$m_0 = \frac{1}{t_{0.5}} \int_0^{x_L/2} e^{2.3K_R f(x)} \cdot dx \quad (9)$$

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons étudié les protéines suivantes : l'albumine du sérum de boeuf (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.) en solution dans le chlorure de sodium à 9 g/l à la concentration de 20 mg/ml et la butyrylcholinestérase du sérum humain. (Le sérum a été prélevé sur des volontaires).

Nous avons opéré en deux temps afin de déterminer, d'une part (K_R) et d'autre part k et x_L .

Le coefficient de retardement qui permet d'accéder également à la masse moléculaire a été déterminé par la méthode d'Hedrick et Smith⁴ en opérant à $+4^\circ$, en tampon Tris-glycine pH 8.4 et force ionique 0.0225, avec des gels de C constant égal à 3.5% et de concentration T variant entre 5 et 10% (Fig. 1A et 2A).

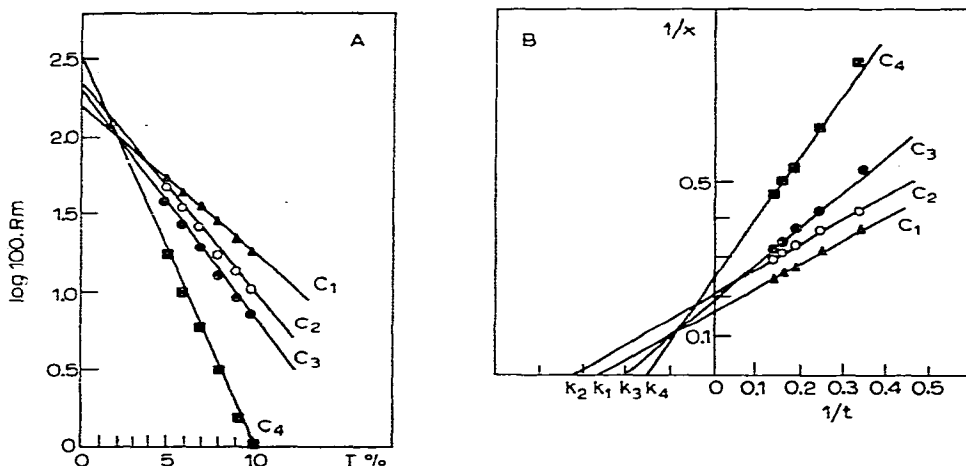


Fig. 1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des formes multiples de la butyrylcholinestérase du sérum humain. (A) Méthode d'Hedrick et Smith⁴ droites représentatives de $\log 100 \cdot R_m = \log 100 R_{m_0} - K_R T$. (B) Méthode de Manwell⁵ droites représentatives de $1/x = 1/k_{x_L} \cdot 1/t + 1/x_L$.

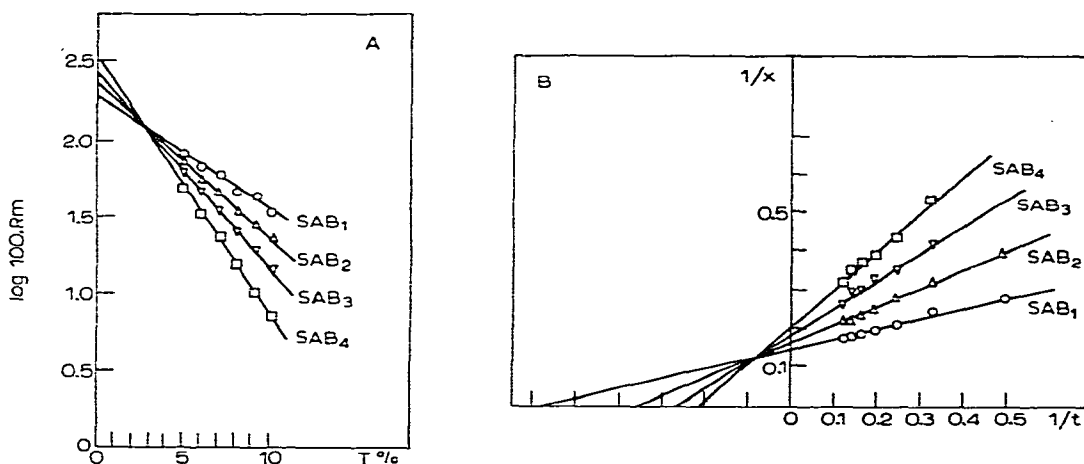


Fig. 2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des polymères de la sérum albumine bovine (SAB) [SAB_n = n-mère]. (A) Méthode d'Hedrick et Smith⁴ droites représentatives de $\log 100 \cdot R_m = \log 100 R_{m_0} - K_R T$. (B) Méthode de Manwell⁵ droites représentatives de $1/x = 1/k_{x_L} \cdot 1/t + 1/x_L$.

Pour la détermination de x_L et de k , nous avons utilisé la technique de Manwell⁵ avec des plaques de gels de polyacrylamide Gradipore (Uniscil) de concentration T variant entre 3.3 et 28% et de $C = 3.5\%$ jusqu'à 6 cm, en opérant dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment. Les indications graphiques fournies par le fabricant de gels Gradipore nous ont permis de déterminer $T = f(x)$. Ainsi, $T = ax^2 + bx + c$. Les constantes, a , b , c qui varient légèrement d'un lot de gels à un autre sont de l'ordre de $a = 0.4$; $b = 1.2$; $c = 3.3$.

La mesure du champ électrique a été pratiquée avec un voltmètre de précision ($E = 16.94$ V/cm).

La coloration de la sérum albumine a été effectuée avec le Noir amido (Merck, Darmstadt, R.F.A.) et la révélation des zones d'activité cholinestérasique par la technique de Juul⁶.

Les distances de migration des protéines ont été mesurées à l'aide d'un double décimètre appliqué à la surface des gels.

Après ces mesures, la construction des diagrammes $1/x = f(1/t)$ nous a permis de déterminer $k(h^{-1})$ et $1/x_L(\text{cm}^{-1})$ (Figs. 1B et 2B). L'intégration des expressions

$$\int_0^{xL/2} e^{2.3KR(ax^2+bx+c)} \cdot dx$$

a été effectuée par la méthode des trapèzes.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La butyrylcholinestérase du sérum humain est constituée d'un système de quatre formes moléculaires multiples C_1 , C_2 , C_3 et C_4 , polymères d'une sous-unité monomérique qui s'identifie à C_1 . La forme majoritaire, C_4 , est de nature tétramérique⁷ et les termes moyens, C_3 et C_2 , correspondent respectivement à la forme dimérique de l'enzyme et à une espèce moléculaire voisine qui apparaît être un dimère amputé d'un fragment glycoprotéique⁸. Le comportement électrophorétique de cette dernière forme diffère donc de celui des trois isomères de taille C_1 , C_3 et C_4 (Figs. 1A et 1B). Les valeurs moyennes des mobilités libres absolues des quatre formes moléculaires de la butyrylcholinestérase à pH 8.4 (Tableau I) obtenues sur 5 déterminations sont supérieures au résultat global ($-3.1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) donné par Svensmark et Kristensen⁹ à pH 8.6. Mais cette valeur, compte-tenu des corrections dues à la technique (électro-osmose, évaporation, structure du papier et phénomènes d'adsorption), ne peut être tenue pour équivalente à la mobilité libre de l'enzyme. Par contre, les résultats que nous obtenons pour la sérum albumine monomère (SAB_1) (Tableau II) sont en accord avec les valeurs des mobilités libres absolues déterminées par d'autres auteurs à l'aide de techniques différentes (Tableau III). Enfin, pour les deux séries de protéines étudiées, la corrélation entre la mobilité absolue et la mobilité relative est excellente avec r respectivement égal à 0.99 pour les isomères de taille de la butyrylcholinestérase et 0.95 pour la sérum albumine bovine et ses polymères.

En conclusion, la méthode de calcul que nous proposons permet de déterminer en complément des autres paramètres moléculaires, la mobilité électrophorétique libre

TABLEAU I

MOBILITÉS LIBRES RELATIVES ET ABSOLUES DES QUATRE FORMES DE LA BUTYRYLCHOLINESTÉRASE DU SÉRUM HUMAIN À pH 8.4

$\mu = 0.0225$ et $\theta = +4^\circ$.

	Valeurs moyennes \pm erreurs standards			
	C_1	C_2	C_3	C_4
Rm_0^*	1.67 ± 0.02	2.37 ± 0.04	2.16 ± 0.01	3.56 ± 0.13
$m_0 \cdot 10^5 (\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1})$	-6.73 ± 0.53	-8.69 ± 0.64	-8.40 ± 0.69	-13.84 ± 1.35

* Le traitement statistique de l'équation de Ferguson a été effectué selon la méthode de Rodbard et Chrambach¹⁰.

TABLEAU II

MOBILITÉS LIBRES RELATIVES ET ABSOLUES DE LA SÉRUM ALBUMINE BOVINE ET DE SES POLYMÈRES À pH 8.4

 $\mu = 0.0225$ et $\theta^\circ = +4^\circ$.

	Valeurs moyennes \pm erreurs standards			
	Monomère	Dimère	Trimère	Tétramère
Rm_0^*	1.93 ± 0.01	2.30 ± 0.03	2.55 ± 0.06	3.20 ± 0.09
$m_0 \cdot 10^5$ ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)	-11.21 ± 1.09	-13.09 ± 1.11	-15.12 ± 1.63	-16.17 ± 1.84

* Le traitement statistique de l'équation de Ferguson a été effectué selon la méthode de Rodbard et Chrumbach¹⁰.

TABLEAU III

MOBILITÉ LIBRE ABSOLUE DE LA SÉRUM ALBUMINE BOVINE (MONOMÈRE)

	Technique et conditions	$m_0 \cdot 10^5$ ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)
Schlessinger ¹¹	Veine liquide, 0° , pH 8.5, $\mu = 0.025$	Environ -9
Morris et Morris ²	Gel de polyacrylamide, $+10^\circ$, pH 8.76, $\mu = 0.05$, $C = 3\%$	-11.55
Ghosh <i>et al.</i> ¹²	Gel d'agarose, $+20^\circ$, pH 8, $\mu = 0.05$	-11.50

absolue des protéines, avec une précision de l'ordre de 10% au risque $\alpha = 0.05$; celle-ci correspond à la précision que l'on peut attendre des méthodes d'estimation des paramètres moléculaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 K. A. Ferguson, *Metab. Clin. Exp.*, 13 (1964) 985.
- 2 C. J. O. R. Morris et P. Morris, *Biochem. J.*, 124 (1971) 517.
- 3 D. Rodbard et A. Chrumbach, *Anal. Biochem.*, 40 (1971) 95.
- 4 J. L. Hedrick et A. J. Smith, *Arch. Biochem. Biophys.*, 126 (1968) 155.
- 5 C. Manwell, *Biochem. J.*, 165 (1977) 487.
- 6 P. Juul, *Clin. Chim. Acta*, 19 (1968) 205.
- 7 H. Muensch, H. W. Goedde et A. Yoshida, *Eur. J. Biochem.*, 70 (1976) 217.
- 8 P. Masson, *Formes moléculaires multiples et structure quaternaire de la butyrylcholinestérase du sérum humain*, Thèse de Doctorat d'État ès-sciences pharmaceutiques, Lyon, 1978.
- 9 O. Svensmark et P. Kristensen, *Biochim. Biophys. Acta*, 67 (1963) 441.
- 10 D. Rodbard et A. Chrumbach, in R. C. Allen et H. R. Maurer (Rédacteurs), *Electrophoresis and Isoelectric focusing in polyacrylamide gel*, De Gruyter, 1974, p. 28.
- 11 B. S. Schlessinger, *J. Phys. Chem.*, 62 (1958) 916.
- 12 S. Ghosh, M. K. Basu et J. S. Schweppe *Anal. Biochem.*, 50 (1972) 592.