



УДК 547.458.7 : 543.545

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ КИСЛЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ
В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Усов А. И., Архипова В. С.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Исследовано электрофоретическое поведение сульфатированных κ - и λ -каррагинанов из красной морской водоросли *Tichocarpus crinitus* и нескольких образцов сульфопропилцеллюлозы, синтезированных в разных условиях и различающихся по молекулярно-весовому распределению. Показано, что электрофорез в трис-НСI-глициновой буферной системе является простым и удобным методом качественной оценки содержания в полисахаридах низкомолекулярной фракции. Электрофорез в фосфатном буфере дает наглядное представление о молекулярно-весовом распределении в полидисперсных образцах и позволяет производить их микрофракционирование.

Метод гелевого электрофореза является одним из наиболее эффективных приемов аналитического разделения и контроля индивидуальности белков. В химии кислых полисахаридов он применяется гораздо реже, поскольку фракционирование по молекулярному весу за счет «эффекта молекулярного сита» в большей степени препятствует разделению продуктов по классам, т. е. по плотности заряда. Такое разделение удастся лишь изредка провести на гелях минимальной концентрации для веществ с относительно низким молекулярным весом [1]. Напротив, внутри каждого класса кислых полисахаридов в том случае, когда плотность заряда можно считать постоянной величиной, метод гелевого электрофореза может применяться для быстрого деления по молекулярному весу. Так, при изучении кислых мукополисахаридов этот метод можно использовать для качественной оценки неоднородности образца [2], для микрофракционирования по молекулярному весу [3] и для вычисления молекулярных весов при наличии необходимых стандартов [1, 4, 5]. Недавно метод гелевого электрофореза был предложен для оценки «качества» альгиновой кислоты [6], а также для характеристики других гликуроногликанов и даже нейтральных полисахаридов (в боратном буфере) [7].

Мы исследовали поведение при электрофорезе в полиакриламидном геле двух сульфатированных полисахаридов — κ - и λ -каррагинанов из красной морской водоросли *Tichocarpus crinitus* [8], а также образцов сульфопропиловых эфиров целлюлозы, синтезированных в разных условиях и различающихся поэтому по молекулярно-весовому распределению [9]. Для электрофореза были использованы трис-глициновый и фосфатный буферные растворы. Чтобы получить более четкие зоны, вещества перед нанесением растворяли в буферах с тем же рН, но в 6—8 раз меньшей ионной силой [10].

Было обнаружено, что в трис-глициновом буфере кислые полисахариды образуют размытую зону с относительно небольшой электрофоретической

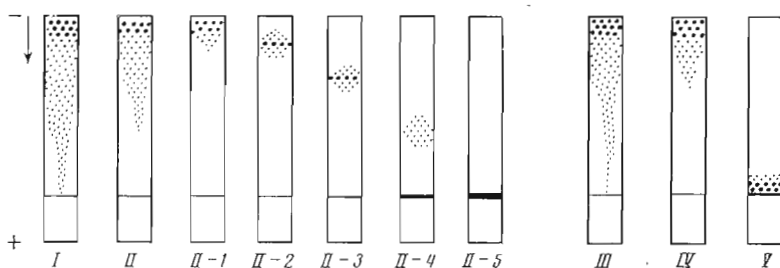


Рис. 1. Электрофорез в трис-НС1-глициновой буферной системе: I — κ -каррагинан; II — λ -каррагинан; II-1 — II-5 — фракции 1—5 λ -каррагинана; III—V — образцы А, В и Г сульфопропилцеллюлозы

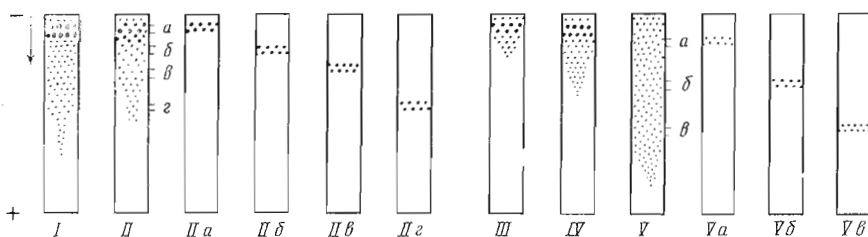


Рис. 2. Электрофорез в фосфатном буфере: I — κ -каррагинан; II — λ -каррагинан; IIa — IIг — диски, вырезанные из электрофорезграммы II; III—V — образцы А, В и Г сульфопропилцеллюлозы; Va — Vб — диски, вырезанные из электрофорезграммы V

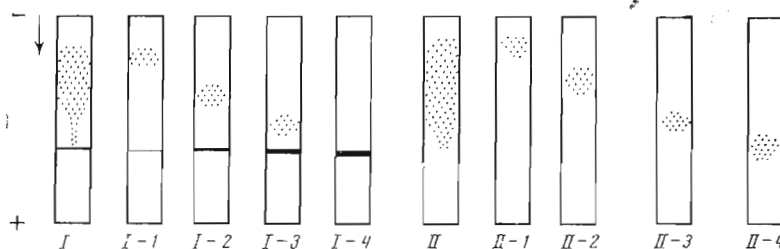


Рис. 3. Электрофорез «низкомолекулярного» κ -каррагинана и его фракций 1—4 в трис-НС1-глициновой буферной системе (I, I-1—I-4) и в фосфатном буфере (II, II-1—II-4)

подвижностью и четкую зону, совпадающую по подвижности с маркирующим красителем. Как показал электрофорез предварительно фракционированных на колонке с сефадексом G-200 образцов κ - и λ -каррагинанов, эта более подвижная зона соответствует фракции полисахаридов с относительно низким молекулярным весом (рис. 1, 3). Аналогично из электрофорезграмм различных сульфопропиловых эфиров целлюлозы видно, что наиболее интенсивную подвижную зону дает сильно деструктурированный образец Г, обладающий наименьшей вязкостью (рис. 1). Таким образом, электрофорез в этих условиях является удобным наглядным методом качественной оценки содержания низкомолекулярной фракции в образце или сравнения различных образцов кислых полисахаридов по степени деструкции.

При электрофорезе в фосфатном буфере кислые полисахариды дают размытые зоны без четко выраженной фронтальной полосы. При этом наблю-

даются определенные различия в скорости миграции и в форме этих зон на гелях разной концентрации. И в этом случае разделение обусловлено различием в молекулярных весах. Это подтверждено не только данными электрофореза отдельных фракций каррагинанов, полученных при хроматографировании на сефадексе G-200, но и методом разделения геля на диски [3]. Вещества, содержащиеся в дисках, вырезанных из окрашенного геля или из соответствующего участка столбика неокрашенного геля, сохраняли первоначальную подвижность при повторном электрофорезе (рис. 2). Этот факт позволяет заключить, что при наличии соответствующей калибровки электрофорез в фосфатном буфере может быть использован как быстрый и удобный метод определения молекулярного веса узких фракций полисахарида. Для нефракционированных полисахаридов этот метод дает качественную характеристику молекулярно-вещного распределения. Так, из рис. 2 видно, что изученные образцы κ - и λ -каррагинанов содержат высокомолекулярную фракцию с нулевой подвижностью, но содержание низкомолекулярной фракции в κ -каррагинане заметно выше, и он, следовательно, более дисперсен. Из трех исследованных образцов сульфопропилцеллюлозы (рис. 2) образец А является довольно однородным и высокомолекулярным; образец В наряду с высокомолекулярной фракцией содержит значительное количество фракции среднего молекулярного веса, а образец Г — сильно деструктурированный продукт.

Экспериментальная часть

Выделение λ - и κ -каррагинанов из водоросли *Tichocarpus crinitus* описано в работе [8]; «низкомолекулярный» κ -каррагинан получали при фракционировании κ -каррагинана осаждением спиртом из водного раствора. Для гель-фильтрации раствор 150 мг полисахарида в 5 мл 1 М NaCl наносили на колонку $3,5 \times 80$ см с сефадексом G-200 (V_0 100 мл, V_e 350 мл), которую промывали 1 М NaCl, собирали фракции по 50 мл, диализовали против дистиллированной воды и лиофилизовали.

Синтез сульфопропиловых эфиров целлюлозы описан в работе [9]; изучали электрофоретическое поведение образцов А (с. з. 0,7; $[\eta]$ 3,6), Б (с. з. 0,7; $[\eta]$ 3), В (с. з. 0,7; $[\eta]$ 0,9) и Г (с. з. 1,4; $[\eta]$ 0,5).

Для электрофореза использовали прибор и реактивы фирмы «Reanal» (Венгрия). Гели заливали в стеклянные трубочки (75×5 мм) на высоту 55 мм. Для электрофоретического разделения раствор 20—60 мкг полисахарида в 0,03—0,05 мл 8-кратно разбавленного буфера, содержащего 40% сахарозы, наслаивали на поверхность геля. Электрофорез проводили 15 мин при 1,5—2 мА, затем силу тока увеличивали до 5—7 мА на трубку. Для маркировки анодного фронта использовали 0,01%-ный водный раствор бромфенолового голубого. Процесс заканчивали через 3—4 ч, когда маркировочная полоса находилась на расстоянии 2 см от конца трубки. Для обнаружения зон полисахаридов столбик геля окрашивали 0,5%-ным раствором алцианового голубого в 7%-ной уксусной кислоте [1] или 0,1%-ным раствором толудинового голубого в воде [3].

Электрофорез в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,5) проводили при напряжении в 30 В. Гели 4 и 8%-ной концентрации готовили по методу [1], фракционирование путем вырезания дисков проводили по методу [3].

Электрофорез в трис-НСI-глициновой буферной системе проводили при напряжении в 150—100 В. В качестве резервуарного использовали трис-глициновый буфер (рН 8,3) (1,2 г трис-(оксиметил)аминометана + 5,76 г глицина на 2 л воды). Для получения геля мономеры (7% акриламида и 0,02% N,N-метиленабисакриламида) растворяли в трис-НСI буфере (рН 8,9) (4,57 г трис-(оксиметил)аминометана + 6 мл 1 н. НСI в 100 мл воды), содержащем 0,05% тетраметилэтилендиамина и 0,07% персульфата аммония.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mathews M. B., Decker L. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **244**, 30—34.
2. Rennert O. M. (1967) *Nature*, **213**, 1133—1134.
3. Hsu D.-S., Hoffman P., Mashburn T. A., Jr. (1973) *Anal. Biochem.*, **52**, 382—393.
4. Hilborn J. C., Anastassiadis P. A. (1971) *Anal. Biochem.*, **39**, 88—92.
5. Hsu D.-S., Hoffman P., Mashburn T. A., Jr. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **338**, 254—264.
6. Bucke C. (1974) *J. Chromatogr.*, **89**, 99—102.
7. Pavlenko A. F., Ovodov Yu. S. (1970) *J. Chromatogr.*, **52**, 165—168.
8. Усов А. И., Рехтер М. А., Кочетков Н. К. (1969) *Ж. общ. химии*, **39**, 905—911.
9. Шорыгина Н. Н., Кузнецова З. И., Архипова В. С., Простякова В. М. (1968) *Высокомолекуляр. соед.*, **10Б**, 438—441.
10. Hjerten S., Jerstedt S., Tiselius A. (1965) *Anal. Biochem.*, **11**, 219—223.

Поступила в редакцию
10.II.1975

POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS OF ACID POLYSACCHARIDES

USOV A. I., ARKHIPOVA V. S.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A study is presented on polyacrylamide gel electrophoresis of sulfated κ - and λ -carrageenans from the red algae *Tichocarpus crinitus* as well as several synthetic sulphopropyl cellulose preparations of different molecular weight. The electrophoresis in tris-HCl-glycine buffer was shown to be a simple and convenient method for qualitative estimation of low molecular fractions in polysaccharides. The electrophoresis in phosphate buffer provides a picture of molecular weight distribution and can be used for microscale fractionation of polysaccharides.
