

Рийна МАХЛАПУУ, Т. ПЮССА, А. КОЛЛИСТ

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ АГАРОНОСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

6. Гель-хроматография высокомолекулярных декстранов на гранулированных агарозных гелях

(Представил О. Эйзен)

Проведена гель-фильтрация высокомолекулярных декстранов ($M = 500\,000$, $110\,000$ и $40\,000$) на колонках с сефарозой 4В и 4%-ным гранулированным студнем агарозы, изготовленной из красных морских водорослей *Ahnfeltia tobuchiensis* в лабораторных условиях. Установлено, что картина разделения декстранов на обеих колонках практически идентична, причем механическая прочность 4%-ных гранул лабораторной агарозы несколько превышает прочность сефарозы 4В.

Гель-хроматография является одним из наиболее распространенных методов разделения и очистки биополимеров. Наряду с такими давно известными наполнителями колонки, как поперечносшитые декстраны (сефадексы, молселекты), пористое стекло, полиакриламиды (биогель II), в последнее время, в особенности для разделения сверхвысокомолекулярных биополимеров (даже для очистки вирусов), все шире используются коммерческие гранулированные макропористые гели агарозы (сефароза, поперечносшитая сефароза, биогель А и др.). Агароза является электронейтральным компонентом агара — полисахарида, выделяемого из ряда красных морских водорослей (виды *Gracilaria*, *Gelidium*, *Pterocladia*, *Acanthopeltis* и др.) [1, 2].

В предыдущем сообщении настоящей серии [3] нами было показано, что из дальневосточной агароносной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (залив Петра Великого, Японское море) можно выделить агарозу, электроэндоосмотические и механические свойства студня которой вполне отвечают требованиям, предъявляемым к агарозам, используемым для зонального гель-электрофореза белков сыворотки крови.

Как известно [4], разделение биополимеров методом гель-проникающей хроматографии (гель-фильтрации) основывается на разнице в молекулярных весах (размерах) разделяемых компонентов. Разные сорбционные (как специфические, так и неспецифические) процессы, обусловленные особенностями геля, здесь нежелательны.

В случае агарозы причиной сорбции могут стать остаточные отрицательнозаряженные группировки, концентрацию которых можно оценить измерением, например, сдвига какой-то электронейтральной молекулы в геле агарозы в электрическом поле (электроэндоосмос). С другой стороны, важной характеристикой агарозы является механическая прочность ее студня. Чем выше прочность студня, тем выше может быть

столбик гранулированного геля, а следовательно, и скорость элюирования колонки. Третьим важным параметром гранулированного геля-хроматографического сорбента является величина его пор и их распределение по диаметрам, поскольку этими величинами определяется интервал фракционирования полимеров по молекулярной массе на данном носителе.

Агарозные гели, изготавливаемые зарубежными фирмами и используемые, как было сказано, для разделения сверхвысокомолекулярных соединений, являются крупнопористыми носителями. Например, сефароза 4В работает в интервале $60\,000 < M < 20\,000\,000$ в случае белков и вирусов [5].

Поскольку агароза, полученная по нашей методике, характеризуется сравнительно низкой величиной электроэндоосмоса и высокой прочностью студня [3], мы считали целесообразным использовать ее для получения 4%-ного гранулированного геля, геля-хроматографические свойства которого — пористость и интервал фракционирования полимеров — были оценены с помощью высокомолекулярных декстранов с известными средними молекулярными весами. Чтобы сравнить гранулированный студень из нейтральной полисахаридной фракции, выделенной из *Ahnfeltia tobuchiensis*, с коммерческим геля-хроматографическим носителем, те же операции были проведены на сефарозе 4В.

Экспериментальная часть

Использовались следующие материалы: сефароза 4В фирмы «Pharmacia» (Швеция), декстраны со средним M 500 000, 110 000, 40 000 и голубой декстран фирмы «Flucka» (Австрия). Остальные материалы были марки «хч».

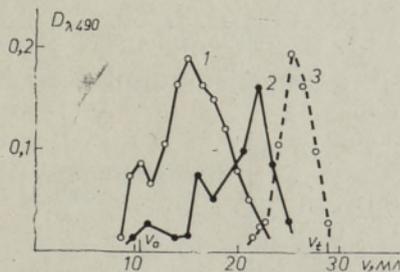
Гранулирование 4%-ного раствора агарозы было проведено по модифицированной методике Хьертена [6]. Для геля-хроматографии декстранов использовались колонки двух размеров — для сефарозы 4В (опыт 1) $22,5 \cdot 1,4$ см, для гранул агарозы из дальневосточной анфельции (опыт 2) $25 \cdot 1,5$ см.

Скорость элюирования с 0,05 М фосфатным буферным раствором ($pH=7,0$) при ионных силах $I=0,05$ и 0,5 (с добавлением NaCl) составляла 7,0 мл/ч. Объем нанесенной пробы, которая содержала 1,5—2 мл декстрана, был 0,3—0,4 мл. Фракции отбирались по 1,1 мл. Концентрацию полисахарида измеряли по методу Дюбуа и др. [7]. Параметры колонок v_0 и v_t (свободный и полный объемы соответственно) определяли с помощью голубого декстрана (4,5—5,0 мг в 0,3—0,4 мл, $\lambda=620$ нм) и бихромата калия (0,5—2,0 мг в 0,3—0,4 мл, $\lambda=410$ нм) [8].

Колонку наполняли гранулами геля (сефарозы 4В или агарозы из анфельции), используя буферный раствор при $I=0,05$, $pH=7,0$. Определяли v_0 , v_t и v_e (наибольший объем выхода данного компонента) для каждого декстрана, проводя параллельно не менее двух опытов. Затем заменяли элюент тем же буферным раствором с добавкой NaCl ($I=0,5$, $pH=7,0$) и вновь определяли величины v_0 , v_t и v_e для декстранов. Повторяли замену буфера первоначальным буфером ($I=0,05$, $pH=7,0$) и еще раз определяли v_0 , v_t и v_e для каждого декстрана.

Обсуждение результатов

Как видно из рис. 1, коммерческие декстраны, имеющие, по данным фирмы «Flucka», определенный молекулярный вес, в действительности представляют собой смесь молекул с довольно широким диапазоном величин молекулярного веса (кривые в координатах оптическая плотность от объема элюента имеют несколько максимумов). Поскольку

Рис. 1. Разделение декстранов ($M = 500\,000$ (1), $110\,000$ (2), $40\,000$ (3)) на сефарозе 4В.

полимолекулярность декстранов затрудняет интерпретацию результатов, каждый декстран был хроматографирован отдельно.

Характеристики двух использованных колонок — v_0 , $v_0 + v_i = v_t$ и K_d — для каждого высокомолекулярного декстрана, причем

$$K_d = (v_e - v_0) / v_i,$$

приведены в таблице.

Характеристики колонок

Тип носителя	$I^* = 0,05$		$I = 0,5$		K_d декстрана					
	v_0	v_t	v_0	v_t	$M = 500\,000$		$M = 110\,000$		$M = 40\,000$	
					$I = 0,05$	$I = 0,5$	$I = 0,05$	$I = 0,5$	$I = 0,05$	$I = 0,5$
Сефароза 4В	10,2	28,4	10,2	28,2	0,30	0,31	0,62	0,57	—	—
	10,2	28,8	—	—	0,32*	—	0,63*	—	0,82*	—
4%-ный гель агарозы	12,0	34,2	11,6	32,6	0,33	0,30	0,59	0,54	0,83	0,70
	11,5*	33,2*	—	—	0,31*	—	0,51*	—	—	—

* Величины, полученные после повторной замены буферного раствора с $I = 0,5$ на буферный раствор с $I = 0,05$ (см. эксп. часть).

Как видно, при изменении ионной силы I раствора в пределах от 0,05 до 0,5 (рН постоянна) параметры колонок v_0 и $v_0 + v_i$, а также в пределах экспериментальной погрешности объем выхода v_e каждого декстрана в случае обоих использованных агарозных носителей существенно не изменяются.

Из таблицы видно также, что величина v_0 для данного декстрана не зависит и от применяемого носителя — сефарозы или полученной нами гранулированной агарозы. Эти величины точно совпадают в случае гель-фильтрации декстранов с $M = 500\,000$ и $40\,000$, менее точно в случае $M = 110\,000$. Следовательно, 4%-ный гранулированный студень, изготовленный из лабораторной агарозы, имеет примерно равные с сефарозой 4В размеры пор, что указывает на возможность его использования для гель-хроматографического разделения высокомолекулярных биополимеров. Более точное определение интервала молекулярных весов, в котором работает полученный нами гранулированный гель агарозы из дальневосточной анфельции, требует дальнейших исследований.

Результаты изучения зависимости скорости протекания буферного раствора ($I = 0,05$) от прилагаемого на колонку давления водяного (буферного) столба показаны на рис. 2. Как видно, прочность полученного нами гранулированного носителя несколько превышает прочность

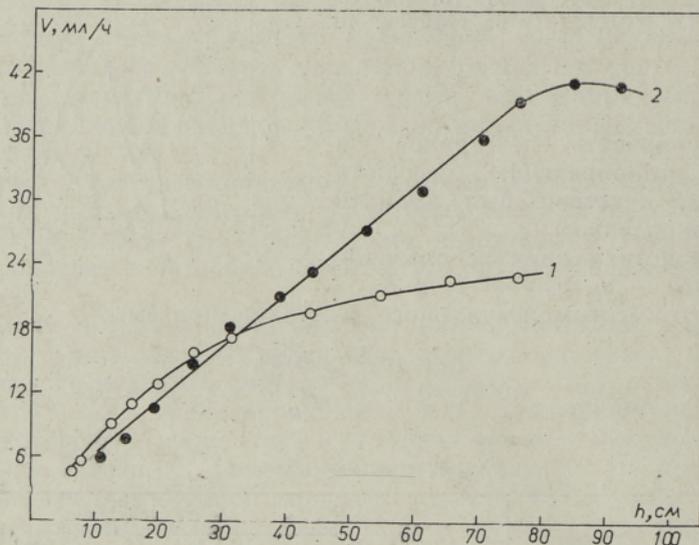


Рис. 2. Зависимость скорости v протекания буферного раствора от прилагаемого на колонку давления водяного (буферного) столба h . Сефароза 4В (1), лабораторная агароза (2).

гранул сефарозы 4В и соответствует прочности студней исходных агароз [3].

Авторы выражают благодарность М. Вахер за оказанную ей техническую помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fuse, T., Goto, F. Studies on utilization of agar. Part X. Some properties of agarose and agaropectin isolated from various mucilaginous substances of red seaweed. — *Agric. and Biol. Chem.*, 1970, v. 35, N 6, p. 799—804.
2. Aгaki, C. Seaweed polysaccharides. — In: *Proc. IV Intern. Congr. Biochem.*, 1959, v. 1, p. 15—30.
3. Коллист А., Парик Ю., Пюсса Т. Выделение, характеристика и использование полисахаридов агароносных водорослей. 5. Оценка качества различных агароз. — *Изв. АН ЭССР. Хим.*, 1980, т. 29, № 3, с. 215—220.
4. Кубик М. Жидкостная колоночная хроматография. Т. 1. М., 1978, с. 80—83.
5. Лурье А. А. Хроматографические материалы (справочник). М., 1978, с. 60—61.
6. Hjerten, S. The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles. — *Biochim. et biophys. acta*, 1964, v. 79, p. 393—398.
7. Dubois, M., Giles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. — *Analyt. Chem.*, 1956, v. 28, N 3, p. 350—356.
8. Детерман Г. Гель-хроматография. М., 1970, с. 105—109.

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
24/X 1979

Тартуский государственный университет

Riina MAHLAPUU, T. PUSSA, A. KOLLIST

AGARIVETIKATEST ERALDATUD POLUSAHHARIIDIDE UURIMINE JA KASUTAMINE

6. Kõrgmolekulaarsete dekstraanide geelkromatograafia agarooosi granuleeritud geelidel

Kolme kõrgmolekulaarse dekstraani ($M = 500\,000$, $110\,000$ ja $40\,000$) geelkromatograafias kasutati artiklis kirjeldatud katsetes ühel juhul sefaroos 4B-ga ja teisel juhul agarooosi 4%-lise geeli graanulitega täidetud kolonni (vastav agarooos oli eraldatud vetikast *Ahnfeltia tobuchiensis* selle seeria eelmistes artiklites kirjeldatud meetodil). Dekstraanid kromatografeeriti eraldi, eluendina kasutati fosfaatpuhvrit (pH 7,0), lahuse ioonjõud oli 0,05 ja 0,5. Selgus, et dekstraanifraktsioonide jaotuskoeffitsient K_d ei sõltu (vea piires) ei sorbendist ega ka ioonjõust. Seega peaksid nii sorbentide poorsus kui ka nende pinnalaengu tihedus olema ligikaudu võrdsed. Artiklis kasutatud meetodil saadud agarooosi geeli graanulid on mehaaniliselt veidi tugevamad kui sefaroos 4B graanulid.

Riina MAHLAPUU, T. PUSSA, A. KOLLIST

CHARACTERIZATION AND UTILIZATION OF POLYSACCHARIDES ISOLATED FROM AGAR-CONTAINING ALGAE

6. Gel chromatography of high-molecular dextrans on granulated agarose gels

Gel chromatography of 3 high-molecular dextran samples («Fluka», Austria) ($M = 500\,000$, $110\,000$ and $40\,000$) has been performed on two granulated agarose gel columns filled with Sepharose 4B («Pharmacia», Sweden) and 4% agarose gel granules. The corresponding agarose was isolated from red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* (the Gulf of Peter the Great, the Sea of Japan) using the methods published earlier [3]. The dextran samples have been chromatographed separately, the eluant being phosphate buffer (pH=7.0) with ionic strengths 0.05 and 0.5 (by adding of NaCl). As seen from the table, the partition coefficient K_d of the given dextran sample does not depend on the sorbent or the ionic strength used. This means that the porosity and charge density of these two agarose gels are identical, the last quantity being negligible for both sorbents. Agarose gel granules obtained by our method have slightly higher mechanical rigidity, estimated by comparison of dependences of velocities of the eluant flowing through the column on the pressure of buffer solution column applied on these granulated gels (Fig. 1).