

**ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ДЛЯ АНАЛІЗУ
ГЕТЕРОГЕННОСТІ ХІТОЗАНУ ЗА МОЛЕКУЛЯРНОЮ МАСОЮ**

М. Луцик, Н. Манько, О. Кармаш, М. Луцик (мол.), Р. Стойка

*Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів 79005, Україна
e-mail: lootsik@cellbiol.lviv.ua*

М. Lootsik, N. Manko, A. Karmash, M. Lutsyk, R. Stoika. ELECTROPHORETIC METHOD OF ANALYSIS OF CHITOSAN HETEROGENEITY AFTER ITS MOLECULAR MASS. Method of chitosan electrophoresis in PAG at pH 4,5 with a stepwise gradient of acrylamide concentration of 5, 10, 15, 20 % was developed which permits to analyse the distribution of chitosan molecules in a specimen after their mol. mass and to determine the content of each fraction. Characteristic densitometric profile of phoretogram can be used for identification of chitosan types.

Біологічна дія хітозану (ХТЗ) суттєво залежить від молекулярної маси і ступеня деацетилювання цього біополімеру. Ці дані наводяться для комерційних зразків ХТЗ, однак зазвичай визначення молекулярної маси ХТЗ здійснюється вискозиметрично і показник відповідає середній молекулярній масі препарату. Це не дає уявлення про дійсний розподіл молекул за молекулярною масою, який може знаходитись у широкому діапазоні від 1000 до 50 кДа. Особливості дослідження препаратів ХТЗ за допомогою гель-проникної хроматографії зумовлені високою адгезивністю ХТЗ і його адсорбцією на хроматографічних матеріалах, тому доброю альтернативою є метод електрофорезу. А. Audi та А. Asselin (1992) встановили, що для електрофоретичного аналізу ХТЗ придатним є поліакриламідний гель (ПАГ) і кислі буферні системи. Молекули ХТЗ з масою більше 300 кДа в гелі не мігрували, а фракції, які проникали в гель, мігрували суцільною смугою без ділення на окремі зони. Задовільне розділення спостерігали лише для олігосахаридів ХТЗ після ензиматичного розщеплення.

Нами досліджено електрофоретичні властивості ХТЗ у гелі агарози (ГА) і ПАГ в різних буферних системах з метою з'ясування можливості застосування методу електрофорезу для виявлення розподілу молекул ХТЗ і його похідних за молекулярною масою. Методика проведення електрофорезу ХТЗ в пластинах ГА і ПАГ та проявлення електрофореграм не відрізнялась від такої для білків. В лунку вносили 10–20 мкг ХТЗ, розчиненого в амоній-ацетатному буфері, рН 5,0.

При електрофорезі у 0,8% ГА (25 мМ амоній ацетатний буфер, рН 6,3) в гель проникали молекули ХТЗ з молекулярною масою 500 кДа і менше, які мігрували як однорідна смуга за ведучим краєм треку без видимих максимумів, що свідчить про сорбцію ХТЗ на агарозі по мірі його міграції. Застосування буферу з 8 М сечовиною лише частково зменшувало сорбцію. Довжина треку міграції була обернено пропорційною до середньої молекулярної маси ХТЗ, однак розділення на окремі зони не спостерігали.

Значно кращі результати отримали при електрофорезі у 5% ПАГ в буферній системі Райсфельда (β-аланін-оцтова кислота, рН 4,5). У гель проникали молекули ХТЗ з масою 300 кДа і менше, а електрофореграма мала вигляд смуги із 2–3 максимумами. Для більш чіткого фракціонування за молекулярною масою використано ступеневий градієнт пористості ПАГ, який містив від 3 до 5 шарів акриламідну зростаючої концентрації. Оптимальний результат отримали на градієнті із 4 шарів із концентрацією акриламідну 5, 10, 15 і 20 %.

На електрофореграмі спостерігали до 5 максимумів, із яких найменш рухливі відповідали молекулярній масі приблизно 300 кДа, а найбільш рухливі – 10 кДа і менше, які рухались швидше, ніж цитохром *c* (12 кДа). Найбільш виражений максимум відповідав середній молекулярній масі препарату. Денситометричний профіль електрофореграми відрізнявся у різних препаратах ХТЗ, що дозволяє застосовувати його для ідентифікації зразків цього полісахариду.