

07

Использование голографической интерферометрии в реальном времени для анализа проб и визуализации процессов, происходящих при жидкостном аналитическом электрофорезе в плоском капилляре

© В.А. Бабенко, В.Б. Константинов, А.Ф. Малый

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, С.-Петербург
E-mail: babenko@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 2 ноября 2006 г.

Показана целесообразность использования плоского капилляра для анализа проб методом жидкостного электрофореза.

PACS: 42.40.Kw, 82.45.-h

В голографической интерферометрии реального времени (ГИРВ) создается голограмма начального состояния объекта, через которую наблюдают и регистрируют процессы. В наблюдаемое изображение вводятся интерференционные полосы конечной ширины. Процессы в объекте визуализируются по изменениям вида интерференционных полос, фиксирующих изменение объекта. Малогабаритный интерферометр [1] и его модификации позволили расширить сферы применения ГИРВ. На станции „САЛЮТ 7“ [2] были проведены исследования процессов электрофореза. Из работ по исследованию сжимаемости жидкостей [3] и растворимости газов в жидкостях [4] следовало, что ГИРВ позволяет с точностью до 10^{-6} определять коэффициенты преломления прозрачных сред. Электрофорез с визуализацией процесса можно проводить в кюветках значительно более тонких, чем в работе [2] (где толщина кюветы составляла 10 mm). В связи с этим была рассмотрена возможность использования плоского капилляра. Такой капилляр позволяет исследовать очень малые количества вещества [5]. Проведение исследований в капилляре цилиндрического сечения сопровождается фокусировкой

проходящего света, что усложняет интерпретацию полученных интерферограмм при ГИРВ.

Был изготовлен капилляр толщиной 0.15 mm (в 67 раз тоньше толщины кюветы в эксперименте на „Салюте 7“). Длина капилляра составляла 145 mm, а ширина — 6 mm. Интерферометрические методы позволяют определять изменения концентраций вещества порядка 0.002%, например, такой же чувствительностью как ГИРВ обладает интерферометр Рэлея [6]. Однако ГИРВ не требует для ее получения дополнительных приспособлений, так как все недостатки кюветы автоматически компенсируются при записи голограммы.

Была показана возможность применения ГИРВ при исследовании капиллярного электрофореза. Для этого надо зарегистрировать прохождение через капилляр белковой пробы, визуализировать и вычислить распределение концентрации вещества в зоне пробы. Для многих биологических соединений характерна прямо пропорциональная зависимость между показателем преломления n и концентрацией вещества в растворе C [6]:

$$C = (n - n_0)/k = \Delta n/k(1), \quad (1)$$

где C — концентрация вещества в растворе (g/100 ml), n — показатель преломления раствора, n_0 — показатель преломления чистого растворителя, k — удельный инкремент показателя преломления вещества (который определяется независимо как изменение n после добавления 1 g вещества в 100 ml раствора). Пользуясь формулой (1) и таблицами [6], можно определить количественно концентрацию вещества в растворе по распределению показателя преломления. В варианте аналитического жидкостного электрофореза раствор буфера представлял собой однородную среду с показателем преломления n_l . В растворе движется смесь разделяемых веществ, имеющих показатель преломления n_{alb} . (для белков $n \sim 1.5900$ [6]), что приводит к оптической разности хода $\Delta L(x, y)$ между световой волной, прошедшей область буфера и смеси, и областью чистого буфера. Для описания системы использована модель двумерного фазового объекта. Она характеризуется тем, что показатели преломления n_l и n_{alb} зависят от координат x и y и не меняются в направлении z . Ось x направлена вдоль капилляра, ось y перпендикулярна оси x и лежит в плоскости капилляра, а ось z совпадает с направлением распространения предметной волны. Толщина капилляра h в направлении z много меньше размеров по осям

x и y . В этом случае оптическая разность хода световой волны в данной точке в направлении z в безрефракционном приближении определяется как

$$\begin{aligned} h\Delta L(x, y) &= S[n_{alb.}(x, y) - n_l.(x, y)]dz \\ &= [n_{alb.}(x, y) - n_l.(x, y)]h = \Delta n(x, y)h. \end{aligned} \quad (2)$$

В формуле (2) толщина биополимера равна толщине капилляра. Разность хода можно измерить непосредственно в длинах волн по интерферограмме:

$$\Delta L(x, y) = N(x, y)\lambda, \quad (3)$$

где λ — длина волны лазера, $N(x, y)$ — относительный сдвиг интерференционных полос (т.е. величина сдвига, деленная на период полос) при прохождении биополимера через капилляр в случае полос конечной ширины. Приравнявая (2) и (3), получим

$$\Delta n(x, y) = N(x, y)\lambda/h. \quad (4)$$

Из формулы (4) следует, что при постоянных λ и h минимальное различие в показателе преломления определяется минимально регистрируемым смещением интерференционной полосы. Подставив в уравнение (1) выражение (4), получим для концентрации биополимера

$$C(x, y) = N(x, y)\lambda/hk = N(x, y)\alpha, \quad (5)$$

где $\alpha = \lambda/hk$. Инкремент показателя преломления k индивидуален для каждого конкретного вещества (у альбумина $k = 0.00187$ 100 ml/g, у гемоглобина — 0.00193 100 ml/g), поэтому величина α индивидуальна для каждого компонента смеси. Следовательно, можно определить вещество, пользуясь формулой (5), значением k и регистрируемым сдвигом интерференционных полос.

Оптическая схема установки приведена на рис. 1. В капилляр впрыскивался буферный раствор, представляющий собой 0.05 М раствора натрия тетраборнокислого (буры, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), pH = 9.24. Моделирующим белковым веществом выступал бычий сывороточный альбумин (pH = 7.7). Концентрация альбумина составляла 10 mg/ml, объем вводимой пробы — 0.05 ml, разность напряжений — 2 kV, ток — 3.1 mA.

На рис. 2 приведены кадры видеозаписи процесса, демонстрирующие смену состояний после подачи разности потенциалов на электроды

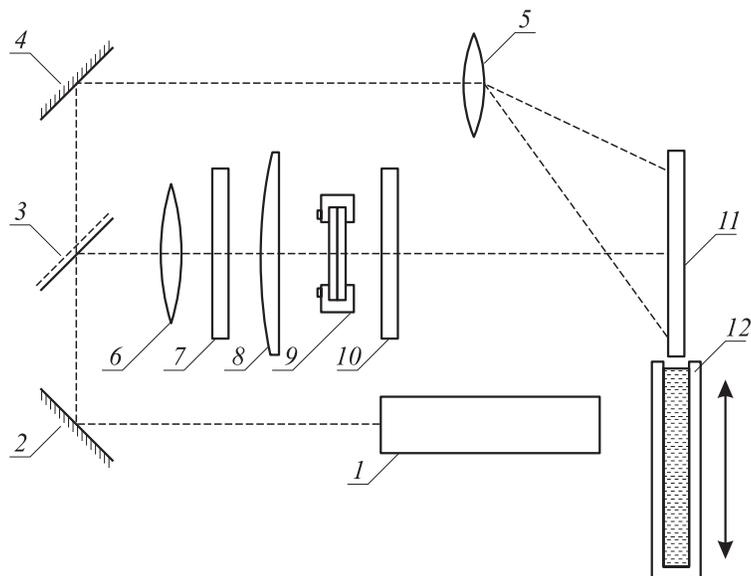


Рис. 1. Оптическая схема голографической установки: 1 — лазер; 2 — зеркало; 3 — полупрозрачное зеркало; 4 — зеркало; 5 — микролинза; 6 — микролинза; 7 — плоскопараллельная пластина для внесения разности хода; 8 — линза; 9 — объект исследования (электрофоретическая кювета); 10 — рассеиватель; 11 — фотопластинка; 12 — кювета с проявителем.

(капилляром является средняя часть изображений). Движение белка осуществляется в направлении справа налево. Интерференционная картина на рис. 2, *a* соответствует невозмущенному состоянию системы (интерференционные полосы вертикальны), когда в капилляре находится лишь буферный раствор. Искривление полос в сторону, противоположную движению пробы альбумина, связано с тем, что $n_{alb.} > n_l$, а это соответствует увеличению оптической разности хода в зоне исследуемого вещества. Искривление полосы большее в центре, чем по краям, говорит об аналогичном распределении концентрации белка в капилляре. Рис. 2, *b* демонстрирует фрагмент развития процесса — фронт пробы движется с постоянной скоростью и сохраняет свою форму. Во фронтальной области прохождения альбуминовой пробы

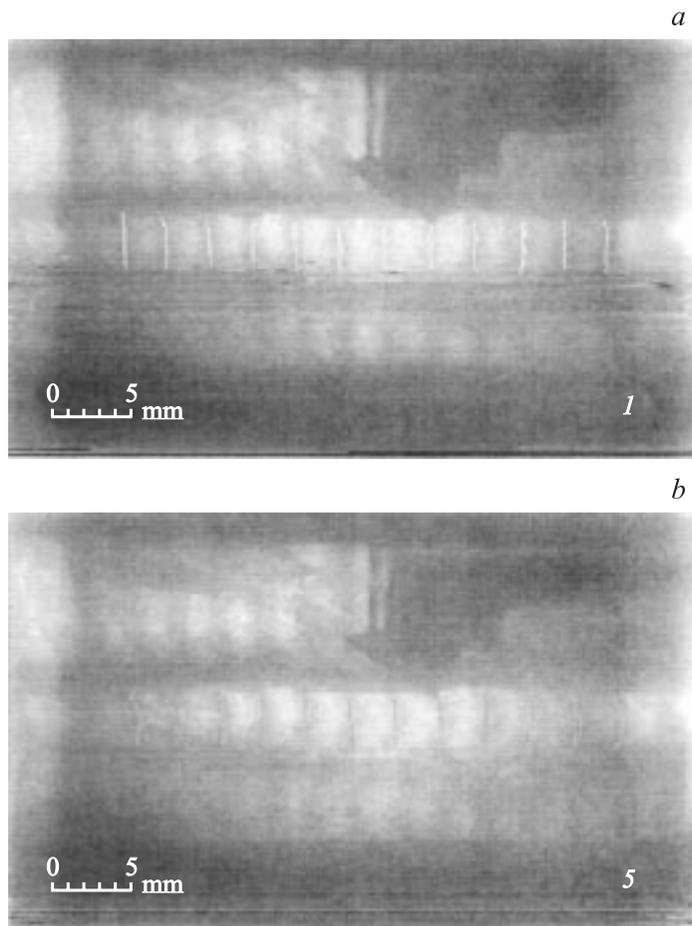


Рис. 2. Интерферограмма начального состояния (*a*) и интерферограмма пятого капилляра (*b*). Линиями выделены минимумы интенсивности интерференционных полос в области капилляра.

время искривления интерференционных полос заметно короче времени восстановления их первоначального вида. Это говорит о том, что зона хвостовой области альбуминовой пробы более размыта и протяженна, чем фронтальная.

Обработка интерференционных картин осуществлялась с помощью программ Try On и Origin 5.0. Программа Try One определила максимумы и минимумы светлых и темных полос на интерферограммах. Затем по ним были проведены обсчеты интерферограмм с использованием формулы (4). Конечным результатом этой обработки явилось нахождение для каждой из них полей $(x, y, \Delta n)$, где Δn — разность показателей преломления возмущенного и начального состояний в точке с координатами (x, y) .

Зная удельный инкремент показателя преломления альбумина, равный 0.00187, и используя формулу (1), были получены распределения его концентраций для серии интерферограмм, показывающих динамику процесса электрофореза в капилляре. Программа Origin 5.0 позволила создать трехмерное изображение распределения концентраций альбумина в зоне наблюдения капилляра в различные моменты времени при прохождении пробы. Полученные изображения позволяют проследить за перемещением белковой пробы, визуализировать распределение концентраций в пробе и получить численную информацию о распределении концентраций альбумина в капилляре.

Проведенный эксперимент показал эффективность использования метода ГИРВ для исследования процесса электрофореза в плоских капиллярах.

Авторы выражают благодарность за помощь при выполнении работы К.Л. Малхасян и Л.Г. Малхасян.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 06-08-00219.

Список литературы

- [1] Гуревич С.Б., Константинов В.Б. и др. // А.с. № 1265688. Бюл. изобр. 1986. № 39. С. 257.
- [2] Баранников А.Л., Ганжерли Н.М., Гуревич С.Б., Константинов В.Б. и др. // Письма в ЖТФ. 1983. Т. 9. В. 2. С. 659–661.
- [3] Maliy A.F., Malkhasyan L.G., Konstantinov V.B., Dunaev N.Yu., Chernyc D.F. // Tech. Phys. Lett. 1994. March. V. 20(3). P. 254–255.
- [4] Константинов В.Б., Малый А.Ф., Бабенко В.А. // Письма в ЖТФ. 2003. Т. 29. В. 13. С. 83–88.
- [5] Гааль Э., Медьеши Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982.
- [6] Йоффе В.Б. Рефрактометрические методы химии. Л.: Химия, 1983.