

07;12

## Исследование массопереноса белков методом голографической интерферометрии реального времени

© Н.М. Ганжерли, И.А. Маурер, П.В. Гранский

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,  
194021 Санкт-Петербург, Россия  
e-mail: nina@holo.ioffe.rssi.ru

(Поступило в Редакцию 3 июля 2003 г.)

Предложен и отработан экспериментально алгоритм количественного анализа массопереноса белков в гелях на основе результатов интерференционно-голографического исследования электрофореза и диффузии. Определены коэффициенты диффузии отдельных белков в различных средах.

### Введение

Массоперенос относится к процессам, сопровождающимся так называемыми фазовыми неоднородностями, которые могут быть изучены оптическими методами, в том числе интерференционно-голографическими. Применение методов голографической интерферометрии в задачах исследования фазовых объектов существенно расширило возможности оптического эксперимента по визуализации фазовых неоднородностей [1,2].

Ранее была продемонстрирована эффективность применения методов голографической интерферометрии для контроля кинетики электрофореза биопрепаратов в гелях [3]. Использование методов голографической интерферометрии реального времени для визуализации электрофореза позволяет изучать процесс в ходе его протекания непосредственно в рабочей зоне электрофоретической колонки без введения красящих веществ. Метод позволяет следить за разделением в ходе электрофореза и перемещением белковых фракций, контролировать форму фронта белковой фракции и т.д.

### Количественный анализ результатов электрофоретического разделения белков в гелях

В данной работе приводятся результаты исследований по отработке методики количественного анализа интерферограмм процессов электрофореза и диффузии биопрепаратов в гелях. Методика отработывалась на примере донорского альбумина человека, составляющего порядка 60% общей массы белков плазмы крови. Исследования проводились в системе непрерывного электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле, хорошо зарекомендовавшем себя при интерференционно-голографическом изучении кинетики электрофоретического разделения белков. В этом случае за счет однородности системы уменьшается тепловой нагрев геля и вся система ведет себя стабильно. Незначительный равномерный нагрев и перераспределение ионов в буферной системе под действием электрического поля

проявляется в некотором наклоне полос конечной ширины на интерферограмме относительно их начального положения, однако это отклонение можно учесть при расшифровке интерферограммы.

Использовалась электрофоретическая колонка для вертикального электрофореза высотой 100 мм и шириной 35 мм с полиакриламидным гелем толщиной 7 мм. Поперечное сечение колонки и геля  $7 \times 30$  мм позволило вводить в колонку достаточно большие объемы образцов, что оказалось важным при анализе препаратов с низкой концентрацией. При этом белки равномерно распределялись по сечению геля и практически одновременно входили в гель.

В процессе электрофореза белковые фракции концентрируются и формируются в узкие зоны. Интерференционная картина в полосах конечной ширины при локализации в рабочей зоне колонки белковой фракции массой  $m$  имеет вид семейства подобных кривых и схематически может быть представлена следующим образом (рис. 1). Ее можно описать числом полос  $N$  конечной ширины на интерферограмме, функцией искривления каждой интерференционной линии  $f(x)$  и площадью под кривой интерференционной линии  $S$ .

Разумно предположить существование зависимости между площадью  $S$ , массой  $m$  локализованного в данной зоне белка и числом полос  $N$  конечной ширины на интерферограмме. Нахождение этой зависимости явля-

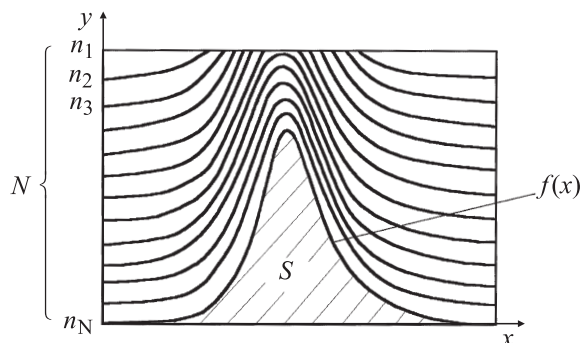
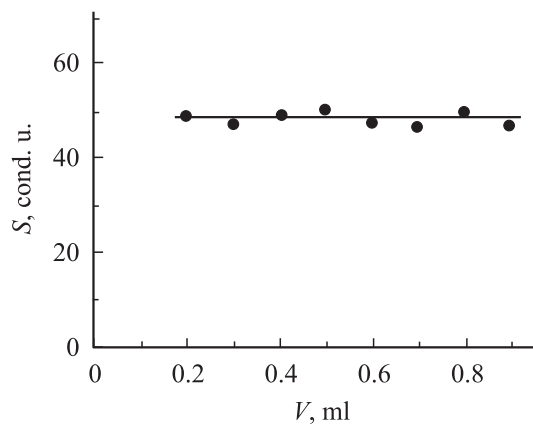


Рис. 1. Схема интерферограммы процесса электрофореза белка в полосах конечной ширины.

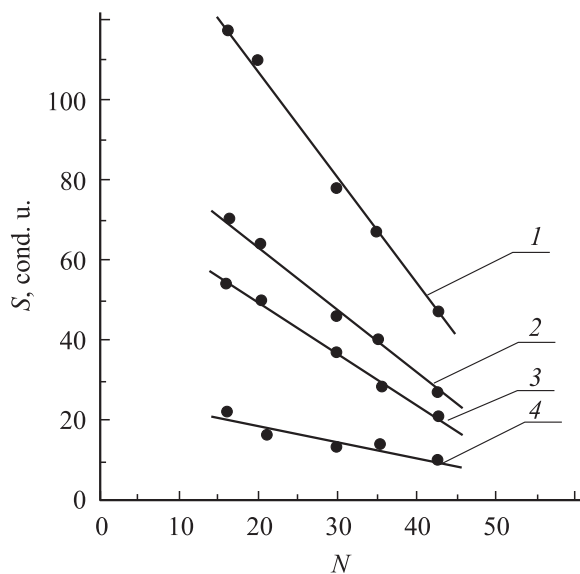


**Рис. 2.** Зависимость площади  $S$  под кривой интерференционной линии от объема  $V$ , введенного в колонку белка одной массы  $m$ .

ется основой методики количественного анализа электрофореза смеси белков.

Показано, что искривление интерференционных полос, обусловленное локализацией белковой фракции, и площадь под интерференционной кривой будут зависеть не от концентрации белка в исследуемом образце, а от общего количества введенного белка  $m$  (рис. 2). При фиксированном числе полос конечной ширины на интерферограмме  $N$  для одного и того же количества введенного белка  $m$  величина  $S$  мало меняется при изменении объема вводимого в электрофоретическую колонку белка  $V$ .

Найдена зависимость площади  $S$  под кривой интерференционной линии  $S$  от числа интерференционных по-



**Рис. 3.** Зависимость площади  $S$  под кривой интерференционной линии от числа полос конечной ширины на интерферограмме  $N$  для различного количества введенного белка в мг: 1 — 8, 2 — 5, 3 — 4, 4 — 0.5.

лос  $N$  для различного количества введенного в колонку белка альбумина  $m$  (рис. 3).

Экспериментально подтверждено предположение о том, что форма изгиба интерференционной линии  $f(x)$  зависит от выбора системы электрофореза, напряженности электрического поля в электрофоретической колонке, пористости геля и других параметров электрофореза и будет сохраняться, если все основные характеристики электрофореза будут фиксироваться. Также показано, что при изменении количества введенного в колонку белка  $m$  происходит пропорциональное изменение площади  $S$  при сохранении формы кривой  $f(x)$ . Этот факт дает алгоритм разделения сложного профиля искривления интерференционной линии  $f(x)$ , полученного на интерферограмме в результате наблюдения смеси недостаточно хорошо разделившихся в ходе электрофореза белков.

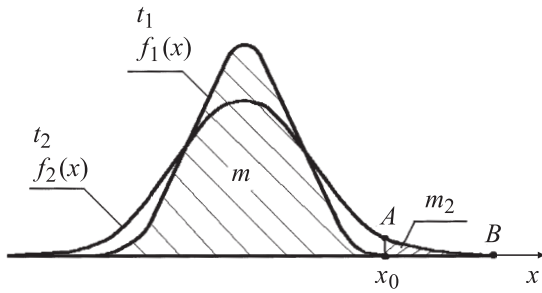
### Количественный анализ диффузии белков в гелях

Диффузия как процесс самопроизвольного переноса вещества между различными частями системы в пределах одной фазы зависит от температуры, полей внешних сил, физической структуры биопрепаратов, а также от градиента концентрации. Именно процесс диффузии является тем фактором, который приводит к размытию белковых зон при препаративном анализе и, как следствие, уменьшению разрешающей способности электрофоретических приборов. В литературе приводятся примеры использования метода голографической интерферометрии для исследования диффузии различных веществ и смеси веществ [4–7].

Ниже мы приводим методику определения коэффициентов диффузии белков в гелях. Рассматривался процесс молекулярной диффузии, наблюдаемый при наличии градиента концентрации.

Для определения коэффициента диффузии альбумина в полиакриламидный гель вводилось определенное количество белка. Методом голографической интерферометрии реального времени велось наблюдение процесса электрофореза. После того как в ходе электрофореза белковая зона сформировалась, осуществлялась регистрация интерферограммы начального состояния процесса диффузии. Далее электрофоретический ток выключался и начинался процесс макроскопической направленной диффузии белка в геле, обусловленный наличием градиента концентрации исследуемого белка.

Для пояснения методики определения коэффициента диффузии на рис. 4 схематически представлены два изгиба интерференционных линий  $f_1(x)$  и  $f_2(x)$  в зоне локализации белка массой  $m$ , соответствующие начальному  $t_1$  и конечному  $t_2$  моментам времени процесса диффузии.



**Рис. 4.** Схема интерференционных линий  $f_1(x)$  и  $f_2(x)$  для начального  $t_1$  и конечного  $t_2$  моментов диффузии.

Коэффициент диффузии определяется первым законом Фика

$$L = -D \frac{dc}{dx}, \quad (1)$$

где  $L$  — поток вещества, который равен массе белка, диффундирующей через единичное сечение в единицу времени в направлении градиента концентрации;  $D$  — коэффициент диффузии;  $dc/dx$  — градиент концентрации белка в направлении  $x$ .

Проинтегрируем обе части уравнения (1) по времени

$$\int_{t_1}^{t_2} L dt = -D \int_{t_1}^{t_2} \frac{\partial c}{\partial x} dt. \quad (2)$$

Интеграл справа можно записать

$$\int_{t_1}^{t_2} \frac{\partial c}{\partial x} dt = \frac{\overline{\partial c}}{\partial x} \Delta t = \frac{\overline{\partial c}}{\partial x} (t_2 - t_1), \quad (3)$$

где  $\overline{\partial c}/\partial x$  — средняя по времени на заданном промежутке от  $t_1$  до  $t_2$  производная величины  $c(x)$  в выбранной точке  $x_0$ .

Эту точку мы определяем из тех соображений, чтобы в момент времени  $t_1$  в ней практически еще не было диффундирующего вещества. Для оценки величины  $\overline{\partial c}/\partial x$  воспользуемся следующим приближенным:

$$\frac{\overline{\partial c}}{\partial x} \approx \frac{1}{2} \frac{\partial c(x_0, t_2)}{\partial x}. \quad (4)$$

Рассмотрим левую часть равенства (2)

$$\int_{t_1}^{t_2} L dt = \frac{1}{s} \int_{t_1}^{t_2} \frac{\partial m}{\partial t} dt = \frac{1}{s} (m_2 - m_1), \quad (5)$$

где  $m_1$  и  $m_2$  — массы вещества, прошедшие через сечение колонки  $s$  в точке  $x_0$  к моменту времени  $t_1$  и  $t_2$  соответственно.

В силу выбора точки  $x_0$   $m_1 = 0$ ,

$$m_2 = \int_{x_0}^{\infty} s c(x, t_2) dx. \quad (6)$$

Используя полученные промежуточные выражения, получим уравнение (1) в следующем виде:

$$\int_{x_0}^{\infty} c(x, t_2) dx = -D \frac{1}{2} \frac{\partial c(x_0, t_2)}{\partial x} \Delta t. \quad (7)$$

Предполагая пропорциональность функции искривления интерференционной линии  $f(x)$  концентрации  $c(x)$ , определим площадь фигуры  $ABx_0$  и наклон касательной к кривой  $f_2(x)$  в точке  $x_0$ . В результате получим, что коэффициент диффузии равен  $1.2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

Эксперименты показали, что концентрация полиакриламидного геля как поддерживающей среды не может быть ниже 3%, так как в этом случае гель достаточно быстро начинает распадаться. Были получены коэффициенты диффузии для различных концентраций полиакриламидного геля. На рис. 5 представлена зависимость коэффициента диффузии альбумина в полиакриламидном геле различной концентрации.

Коэффициент диффузии можно определить и другим путем, используя второй закон Фика, который определяет скорость изменения концентрации за счет диффузии. Второй закон Фика выглядит так:

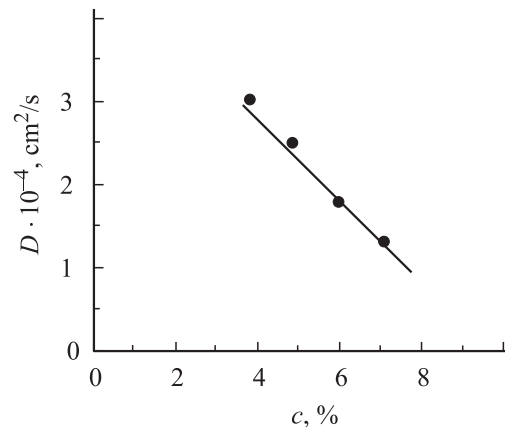
$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}, \quad (8)$$

где  $D$  — коэффициент диффузии,  $t$  — время диффузии,  $x$  — направление диффузии.

Форма искривления интерференционной линии с хорошей точностью может быть описана функцией Гаусса. В ходе процесса диффузии происходит расширение функции Гаусса. Предполагая, что кривая концентрации  $c(x)$  пропорциональна кривой  $f(x)$ , представим  $c(x)$  в виде функции Гаусса

$$c(x) = \frac{A}{b\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{x}{b}\right)^2\right], \quad (9)$$

где  $A$  — нормировочный множитель;  $b$  — зависящий от времени параметр, характеризующий ширину распределения.



**Рис. 5.** Изменение коэффициента диффузии альбумина в зависимости от концентрации геля.

В процессе диффузии этот параметр возрастает с течением времени — распределение уширяется. Но масса введенного в колонку белкового компонента не меняется, площадь под кривой  $c(x)$ , пропорциональная массе, также не изменяется, и мы можем написать

$$\int_{-\infty}^{+\infty} c(x) dx = A. \quad (10)$$

Напишем выражения для первой и второй производных по  $x$  и первой производной по времени  $t$  для переменной  $c(x)$

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} &= \frac{1}{b^4} (x^2 - b^2) c(x) \\ &= \frac{A}{b^5 \sqrt{2\pi}} (x^2 - b^2) \exp\left[-\frac{1}{2} (x/b)^2\right], \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial c}{\partial t} &= \frac{1}{b^3} (x^2 - b^2) \frac{\partial b}{\partial t} c(x) \\ &= \frac{A}{b^4 \sqrt{2\pi}} (x^2 - b^2) \exp\left[-\frac{1}{2} (x/b)^2\right] \frac{\partial b}{\partial t}. \end{aligned} \quad (12)$$

После подстановки формул (11) и (12) в уравнение (8) получим следующее выражение для определения коэффициента диффузии:

$$D = b \frac{\partial b}{\partial t}. \quad (13)$$

Допустим, что некоторое множество экспериментальных точек  $u_k$  для кривой  $c(x)$  нам кажется разумным интерполировать формулой (9). Параметры  $b$  и  $A$  можно найти методом наименьших квадратов. В то же время простое выражение (13) для коэффициента диффузии  $D$ , полученное при преобразовании второго закона Фика, позволяет непосредственно из экспериментальных данных определять искомый параметр на основе измерения величин  $b$  и  $\partial b/\partial t$ . Из формулы (9) найдем, что  $b$  есть половина ширины распределения  $c(x)$  на уровне 0.6 от максимального значения. Величину  $\partial b/\partial t$  можно заменить на  $\Delta b/\Delta t$  и определять малые изменения  $\Delta b$  величины  $b$  за малые промежутки времени процесса диффузии  $\Delta t$ . Такой подход к определению коэффициента диффузии  $D$  на основании второго закона Фика дает величину коэффициента, равную  $1.6 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

Обсудим более подробно, почему два подхода к определению коэффициента диффузии дают разные результаты. Определенный вклад в погрешность наших вычислений вносит неопределенность нахождения базисной линии для кривых  $f(x)$  (рис. 4). Это приводит к разбросу величины площади фигуры  $ABx_0$  и величины  $D$  соответственно. В то же время эта неопределенность в меньшей степени сказывается на величине  $b$ .

## Выводы

В работе показано, что метод голографической интерферометрии реального времени может оказаться полезным в задачах количественного анализа массопереноса белков в гелях и определения коэффициента диффузии. Предложенная методика количественного анализа белков имеет наглядный вид и хорошо согласуется с современными способами обработки данных на ЭВМ. Методика определения коэффициентов диффузии может быть применена для изучения процесса диффузии различных белковых компонент и позволяет определять коэффициент диффузии при изменении условий проведения электрофореза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 01-02-17854) и Научной школы (грант № НШ-98.2003.2).

## Список литературы

- [1] *Островский Ю.И., Бутусов М.М., Островская Г.В.* // Голографическая интерферометрия. М.: Наука, 1977. 339 с.
- [2] *Бекетова А.К., Белозеров А.Ф., Березкин А.Н.* и др. // Голографическая интерферометрия фазовых объектов. Л.: Наука, 1979. 232 с.
- [3] *Баранников В.Л., Ганжерли Н.М., Гуревич С.Б.* и др. // Письма в ЖТФ. 1983. Т. 9. С. 659–662.
- [4] *Pipman J., Lipson S., Landam J.* // Laser Elektro-Optik. 1976. Vol. 8. P. 24–27.
- [5] *Stetson K.A., Becsey G.* // JOSA. 1965. Vol. 55. N. 12. P. 1694–1695.
- [6] *Paolletti D., Schirrippa G.* // Opt. Eng. 1988. Vol. 27. N. 6. P. 486–489.
- [7] *Вениаминов А.В., Лашков Г.И., Ратнер О.Б., Шелехов Н.С., Бандюк О.В.* // Опт. и спектр. 1986. Т. 60. № 1. С. 142–147.