

07;12

## Анализ проб и визуализация процессов, происходящих при жидкостном аналитическом электрофорезе в плоском капилляре

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

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

(Поступило в Редакцию 6 февраля 2007 г.)

Показана возможность использования голографической интерферометрии реального времени для анализа проб и визуализации процессов, происходящих при жидкостном аналитическом электрофорезе в плоском капилляре. Получены интерферограммы электрофореза и проведен их анализ.

PACS: 42.40.Kw, 82.45.-h

### Введение

Электрофорез позволяет разделять биологические макромолекулы, отличающиеся по размеру, молекулярной массе, пространственной конфигурации и электрическому заряду. Молекулы в электрическое поле движутся с разными скоростями. Препарат, состоящий из смеси молекул, разделяется на зоны молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью [1].

Наиболее технологичными и точными для наблюдения приграничных изменений концентраций исследуемых веществ и определения формы границ между растворами различных концентраций при проведении электрофореза являются оптические методы. Они не оказывают влияния на результат разделения и обеспечивают визуальный контроль динамики процессов электрофореза.

В работе рассматривается применение голографической интерферометрии реального времени (ГИРВ) как высокочувствительного метода фиксации малых отклонений показателя преломления прозрачных сред от среднего значения для регистрации концентраций исследуемых при электрофорезе веществ.

Изоэлектрофокусирование фракций альбумина и белков плазмы крови с использованием разработанной в ФТИ голографической аппаратурой „КГА-2“ проводилось в эксперименте „Таврия“ на космической станции „Салют-7“. Толщина кюветы составляла 10 mm [2]. Исследование сжимаемости жидкостей [3] и растворимости газов в жидкостях [4] показало, что ГИРВ позволяет с точностью до  $10^{-6}$  определять коэффициенты преломления прозрачных сред. Разница показателей преломления растворов, определенная термометрией или теньвым методом, составляет 0.001–0.002% [1].

### Теоретический анализ

Различия в подвижности частиц служат основой для разделения смесей частиц в аналитических и препара-

тивных целях. Определение подвижности используется для составления характеристик вещества.

Оптические методы не нарушают свойств разделяемых веществ, обладают высокой чувствительностью, точностью и быстродействием. Явления переноса в растворе сводятся к регистрации формы подвижных или неподвижных границ между растворами различных концентраций. Для количественных оценок используется зависимость, связывающая концентрацию биополимера с каким-либо оптическим свойством, например светорассеянием или показателем преломления.

Световая волна при прохождении через прозрачный объект несет информацию о пространственном распределении показателя преломления  $n = n(x, y, z)$ . Если на пути проходящей волны оказывается неоднородность, то световой луч отклоняется на некоторый угол. В плоскости регистрации можно измерять смещение луча, угол отклонения луча вне однородности и разность фаз двух лучей, определяемую их оптической разностью хода. Рефрактометрические методы основаны на регистрации одной из этих величин или их комбинации.

Применение голографической интерферометрии для исследования биологических макромолекул основано на том, что между показателем преломления  $n$  и концентрацией вещества в растворе  $C$  для многих биологических соединений характерна прямопропорциональная зависимость

$$C = \frac{n - n_0}{k} \equiv \frac{\Delta n}{k}, \quad (1)$$

где  $C$  — концентрация биополимера в растворе (g/100 ml),  $n$  — показатель преломления раствора,  $n_0$  — показатель преломления чистого растворителя,  $k$  — удельный инкремент показателя преломления биополимера (определяется в независимом опыте как изменение  $n$  после добавления 1 g вещества к 100 ml раствора).

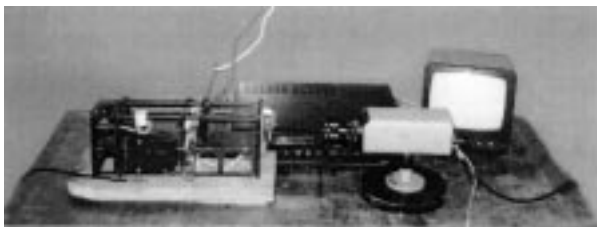
Пользуясь (1) или таблицами [5], можно определить содержание вещества в растворе по распределению показателя преломления, т.е. количественно определить содержание биополимера.

Для реализации ГИРВ и последующего анализа интерферограмм целесообразно создание плоского капилляра. При аналитическом жидкостном электрофорезе раствор буфера, расположенный в стеклянном капилляре с плоскими стенками, представляет собой слой однородной среды. Движение в растворе смеси разделяемых веществ (для белков  $n \cong 1.5900$ ) приводит к появлению фазовых искажений волнового фронта, которые вызваны дополнительной оптической разностью хода  $\Delta L(x, y)$ , приобретаемой световой волной, прошедшей область буфера с биополимерами, по отношению к волне, прошедшей область чистого буфера.

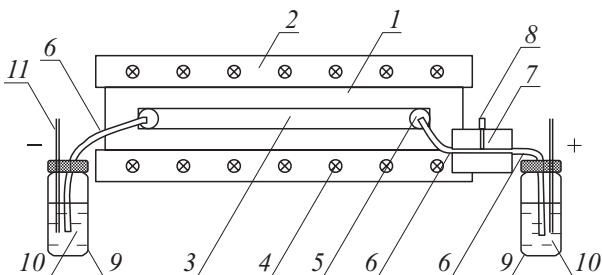
## Экспериментальная часть

Установка для проведения электрофореза включает голографическую и электрофоретическую части (рис. 1). Исследование проводилось с использованием голографического интерференционного регистратора, включающего лазер; оптические элементы (зеркала, полупрозрачное зеркало, микролинзы, плоскопараллельную пластину для внесения разности хода, рассеиватель); регистратор (фотопластинка, кювета с проявителем) [6,7].

В качестве буферного раствора в данных экспериментах использовался 0.05 М раствор натрия тетраборнокислого,  $pH$  9.24. В роли модельного вещества выступал бычий сывороточный альбумин. Величина разности напряжений, прилагаемой к электродам, составляла 2 кВ,



**Рис. 1.** Экспериментальная установка для исследования жидкостного электрофореза в плоском капилляре методом голографической интерферометрии реального времени.



**Рис. 2.** Схема электрофоретической кюветы. Вид спереди. 1 — стекло; 2 — алюминиевая фиксирующая рамка; 3 — объем капилляра; 4 — прижимные винты; 5 — штуцер из оргстекла; 6 — подводящие капилляры; 7 — тройник; 8 — заглушка; 9 — электродная камера; 10 — раствор электролита; 11 — трубчатый электрод.

величина тока — 3.1 мА; концентрация альбумина составляла 10 mg/ml; объем вводимой пробы — 0.05 ml.

Интерферограммы с помощью телевизионной камеры передавались на монитор для наблюдения динамики процесса в реальном времени, велась запись картины на видеокассету. Интерференционные картины вводились в компьютер для дальнейшей обработки с использованием программ TryOne и Origin 5.0.

Электрофоретическая часть представляла собой кювету из двух оптических стекол 1 размером  $187 \times 45 \times 4$  mm, между которыми формировался капилляр 3 для проведения электрофореза (рис. 2). Был создан капилляр толщиной 0.15, длиной 145, шириной 6 mm.

## Результаты и их обсуждение

Была осуществлена регистрация серии интерферограмм процесса миграции альбумина и проведен их анализ. На рис. 3 приведена видеозапись процесса, демонстрирующая последовательную смену состояний системы в следующие моменты времени после начала эксперимента (т.е. после подачи разности потенциалов на электроды): 1 — 0 s, 2 — 2 min 14 s, 3 — 2 min 20 s, 4 — 2 min 37 s, 5 — 2 min 42 s, 6 — 2 min 49 s, 7 — 2 min 55 s, 8 — 3 min 02 s, 9 — 3 min 17 s, 10 — 3 min 25 s, 11 — 3 min 37 s. Интерферограммы получены в вертикальных полосах конечной ширины. Без альбумина полосы представляют собой параллельные прямые с одинаковым расстоянием между ними, соответствующим постоянному градиенту фазы.

Движение белка осуществлялось в направлении справа налево. Интерференционная картина, приведенная на рис. 3, 1, соответствует начальному, невозмущенному состоянию системы с буферным раствором равной концентрации по всему объему. Интерференционные полосы вертикальны и не искривлены. На рис. 3, 2 приведена интерференционная картина части капилляра в следующий момент времени, соответствующий началу вхождения переднего фронта белковой пробы в видимую область. Крайняя справа полоса искривилась, остальные остались невозмущенными. На рис. 3, 3–7 продемонстрировано развитие процесса. Интерференционные полосы последовательно искривляются, причем искривление носит один и тот же характер и распространяется в направлении справа налево с постоянной скоростью, что позволяет сделать вывод о сохранении передним фронтом альбуминовой пробы своей формы и о движении ее с постоянной скоростью. Следующая группа (рис. 3, 8–11) позволяет проследить уход белковой зоны из области наблюдения. Кривизна интерференционных полос постепенно в направлении справа налево уменьшается, пока полосы не приобретают свой первоначальный вид. Это означает, что белок окончательно покинул видимую область капилляра. Хвостовая область альбуминовой зоны значительно более размыта и протяженна, нежели фронтальная.

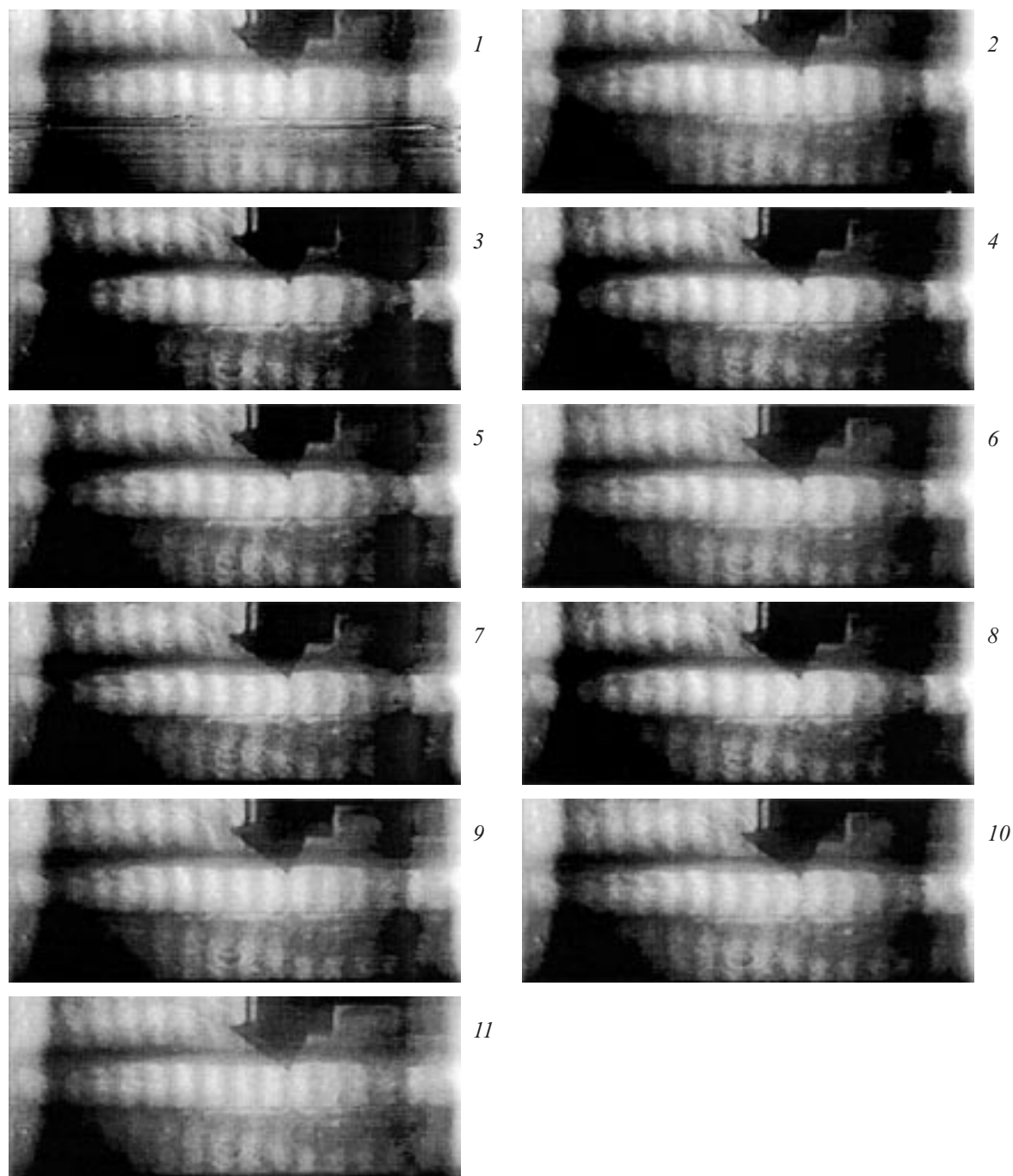


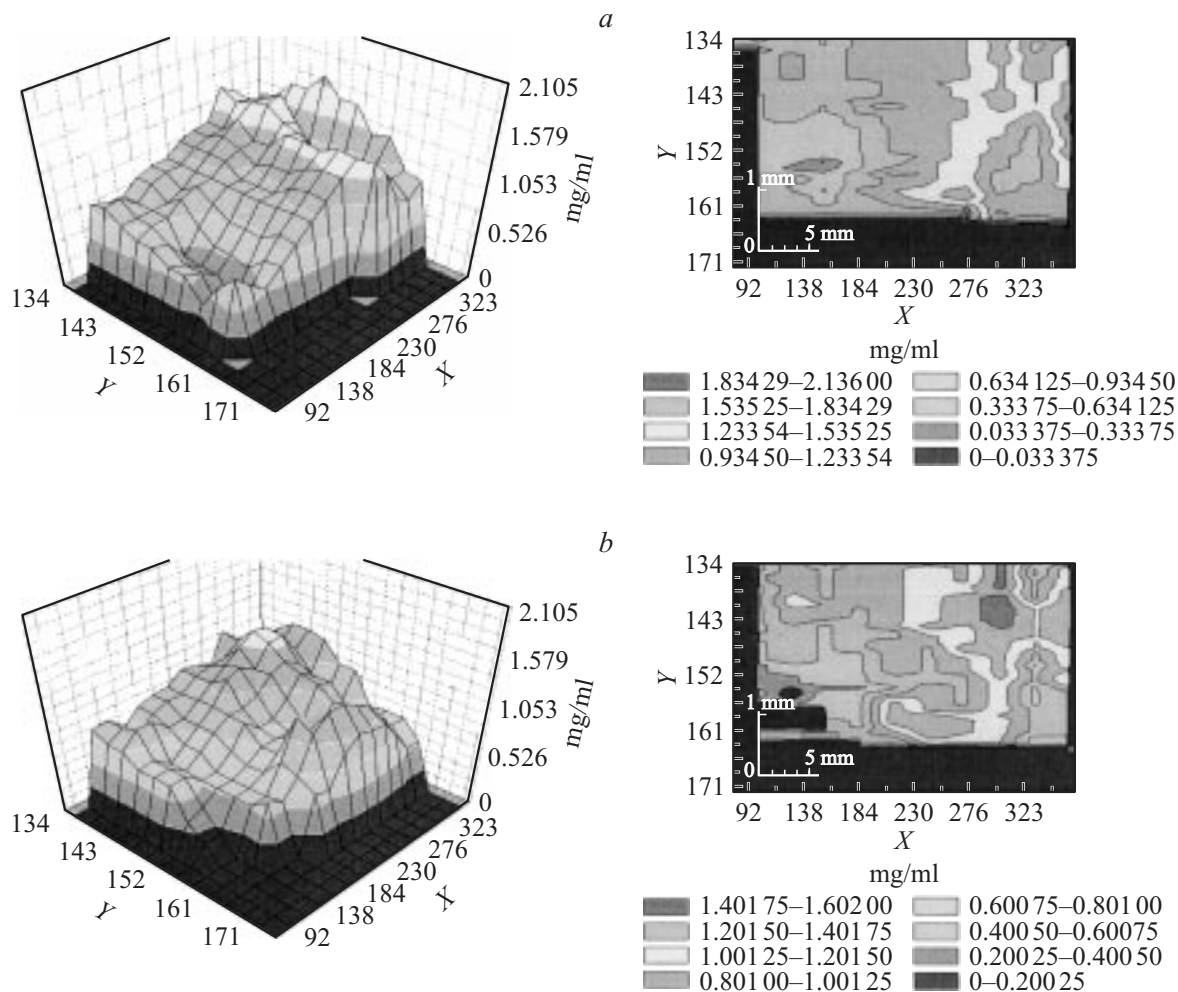
Рис. 3. Интерференционные картины видимой области капилляра в различные моменты времени.

### Обсчет интерферограмм

Программа TrueOne позволяет выявлять максимумы интенсивности светлых полос и минимумы темных. Поле распределения показателя преломления интерферограммы начального состояния принято нулевым. Результатом обработки серии интерферограмм последующих состояний системы явилось нахождение для каждой из интерферограмм полей  $(x, y, \Delta n)$ , где  $\Delta n$  — разность показателей преломления возмущенного и начального

состояний в точке с координатами  $(x, y)$ . Применяв формулу (1) к полученным в результате обсчета интерферограмм трехмерным полям распределения показателя преломления, можно построить трехмерные графики зависимости концентрации биополимера от координат  $(x, y)$  капилляра.

На рис. 4 приведен фрагмент серии полученных с использованием программ Origin 5.0 трехмерных картин концентрации альбумина, наглядно демонстрирующих динамику изменения концентрации белка в видимой



**Рис. 4.** Трехмерные картины распределения концентрации альбумина и соответствующие им двумерные карты, полученные при обработке интерферограмм 2, 3 (рис. 3).

области капилляра с течением времени. На рис. 4 приведены соответствующие трехмерным картинам двумерные, где областям, окрашенным в разные цвета, соответствуют области концентраций альбумина. Эти графики позволяют проследить за перемещением белковой пробы и дают численную информацию о концентрации альбумина в капилляре.

График (рис. 4, *a*) демонстрирует вхождение белка в видимую область капилляра. Концентрация альбумина во фронтальной области составляет в среднем 0.333 75–0.934 50 mg/ml в то время как на правой границе видимой части капилляра в области двух „хребтов“, перпендикулярных направлению движения белка и выделенных желтым цветом, значения концентраций достигает пределов 1.233 54–1.535 25, а в области пиков 1 и 2 — 1.535 25–1.815 60 mg/ml. За следующие 6 с (рис. 4, *b*) происходит перемещение хребтов в сторону направления движения, включая пиковые области 1 и 2 предыдущего графика, концентрационные значения которых при этом несколько снижаются. Два пика 1 объединяются в один с концентраци-

ей 1.201 50–1.401 75 mg/ml, концентрационное значение пика 2 практически не меняется.

Через 17 с наблюдался концентрационный рост по всей видимой области, кроме границы переднего фронта пробы. Одновременно с этим еще больше смещались и разрастались оба „хребта“. Еще через 5 с передний фронт альбуминовой пробы покинул видимую область, и концентрационная поверхность выровнялась. Спустя 13 с концентрационная поверхность поднялась еще выше и достигла наибольшей высоты за весь период прохождения альбуминовой пробы через видимую область капилляра. Время прохождения основной массы альбумина через видимую область капилляра длиной порядка 35 мм составило  $\approx 1$  min (скорость движения белка  $\approx 0.6$  mm/s).

## Выводы

Показана возможность и эффективность использования ГИРВ для анализа проб и визуализации процессов, происходящих при жидкостном аналитическом электро-

форезе в плоском капилляре. Изготовлена экспериментальная установка, реализующая ГИРВ. Получены интерферограммы процессов электрофореза, проведен их обсчет, построены графики распределения концентрации альбумина в капилляре.

Грант РФФИ 06-08-00219.

## Список литературы

- [1] Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982.
- [2] Баранников А.Л., Ганжерли Н.М., Гуревич С.Б., Константинов В.Б. и др. // Письма в ЖТФ. 1983. Т. 9. Вып. 2. С. 659–661.
- [3] Maliy A.F., Malkhasyan L.G., Konstantinov V.B., Dunaev N.Yu., Chernys D.F. // Tech. Phys. Lett. 1994. Vol. 20. N 3. P. 254–255.
- [4] Константинов В.Б., Малый А.Ф., Бабенко В.А. // Письма в ЖТФ. 2003. Т. 29. Вып. 13. С. 83–88.
- [5] Иоффе В.Б. Рефрактометрические методы химии. Л.: Химия, 1983.
- [6] Бабенко В.А., Гуревич С.Б., Константинов В.Б. // Мат. Междунар. оптич. конгресс „Оптика — XXI век“. СПб, 2006. С. 41.
- [7] Бабенко В.А., Константинов В.Б., Малый А.Ф. // ЖТФ. 2007. Т. 77. Вып. 12. С. 92