

12. *Wojtkowiak Z., Briggs R. C., Hnilica L. C.* A sensitive method for staining proteins transferred to nitrocellulose sheets // *Anal. Biochem.* — 1983.—129, N 2. — P. 486—489.
13. *Faye L., Chrispeels M. J.* Characterization of N-linked oligosaccharides by affino blotting with concanavalin A-peroxidase and treatment of the blots with glycosidases // *Ibid.*— 1985.—149, N 1.— P. 218—224.
14. *Handman E., Jarvis H. M.* Nitrocellulose-based assays for the detection of glycolipids and other antigens: mechanism of binding to nitrocellulose // *J. Immunol. Meth.* — 1985.—83, N 1.— P. 113—123.
15. *Loeb M. R.* Immunoblot method for identifying surface components, determining their cross-reactivity, and investigating cell topology: results with *Haemophilus influenzae* type *b* // *Anal. Biochem.* — 1984.—143, N 1.— P. 196—204.
16. *Grace A. M., Strauss A. W., Sobel B. E.* Sensitive quantification of isoforms of canine MM creatine kinase with an immunoblot procedure suitable for large numbers of samples // *Ibid.* — 1985.—149, N 1.— P. 209—217.
17. *King S. M., Offer T., Witman G. B.* Characterization of monoclonal antibodies against *Chlamydomonas flagellar* dyneins by high-resolution protein blotting // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1985.—82, N 14.— P. 4717—4721.
18. *Legocki R. P., Verma D. P. S.* Multiple immunoreplica technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel // *Anal. Biochem.* — 1981.—111, N 2.— P. 385—392.
19. *Preparative* elution of proteins from nitrocellulose membranes after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / *B. S. Parekh, H. B. Mehta, M. D. West, R. C. Montelaro* // *Ibid.* — 1985.—148, N 1.— P. 87—92.
20. *Atkinson P. J.* The recovery of nitrocellulose-bound protein // *Ibid.* — P. 105—110.
21. *Roberts R. L.* Comparison of fluorographic methods for detecting radioactivity in polyacrylamide gels or on nitrocellulose filters // *Ibid.* — 147, N 2.— P. 521—524.
22. *Lin W., Kasamatsu H.* On the electrotransfer of polypeptides from gels to nitrocellulose membranes // *Ibid.* — 1983.—128, N 2.— P. 302—311.
23. *Jahn R., Shieber W., Greengard P.* A quantitative dot-immunoblotting assay for proteins using nitrocellulose membrane filter // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1984.—81, N 6.— P. 1684—1687.

Ин-т цитологии АН СССР, Ленинград

Получено 21.10.85

УДК 576.8.094.2.087.4:543.545

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В СВОБОДНОМ ПОТОКЕ КЛЕТОК И БЕЛКОВ

**И. С. Габуев, А. Л. Мазанов, В. Н. Брезгунов,
И. Н. Прелова, А. С. Колезнев**

Введение. Электрофоретическая подвижность (ЭФП) клеток микроорганизмов является весьма информативной их характеристикой [1]. ЭФП клеток измеряют в основном методом микроэлектрофореза [2]. В лабораторной практике часто приходится измерять ЭФП белков и других макромолекул, для чего обычно используют метод подвижной границы [3]. Недостатками этих методов являются длительность, трудоемкость, низкая точность измерений.

В последнее время успешно разрабатывается метод электрофореза в свободном потоке (ЭФСП), который обеспечивает непрерывное препаративное разделение смесей микроорганизмов [4], клеток крови, лимфоцитов, субклеточных частиц, фагов, белков и других макромолекул [5] за 1—5 мин. В ряде экспериментальных установок ЭФСП осуществляется оптическая регистрация разделившихся фракций [6]. Однако в настоящее время нет серийно выпускаемой аппаратуры, обеспечивающей как препаративное разделение, так и точное измерение ЭФП частиц. Поэтому нами была разработана универсальная установка для препаративного и аналитического ЭФСП, изучены ее эксплуатационные и метрологические характеристики.

Материалы и методы. Аппаратура для ЭФСП. Структурная схема установки для ЭФСП приведена на рис. 1. Буферный раствор поступает в камеру разделения через демпферные сосуды (ДС) 60 каналов ввода. Два центробежных насоса

(ЦН) промывают электродные отделения. С помощью перистальтического насоса НП-1 в один из входных каналов камеры непрерывно вводят струю препарата. Под действием электрического поля источника ИСН-0,2-1200 опускающаяся струя препарата разделяется на фракции, отбираемые 60 каналами перистальтического насоса в пробирки коллектора. Второй перистальтический насос НП-1, соединенный со специальными каналами противотока в камере разделения, создает замкнутый противоток буфера от анода к катоду. Это позволяет увеличить время разделения фракций с большими значениями ЭФП. Данная установка обеспечивает также разделение препаратов в градиентах рН

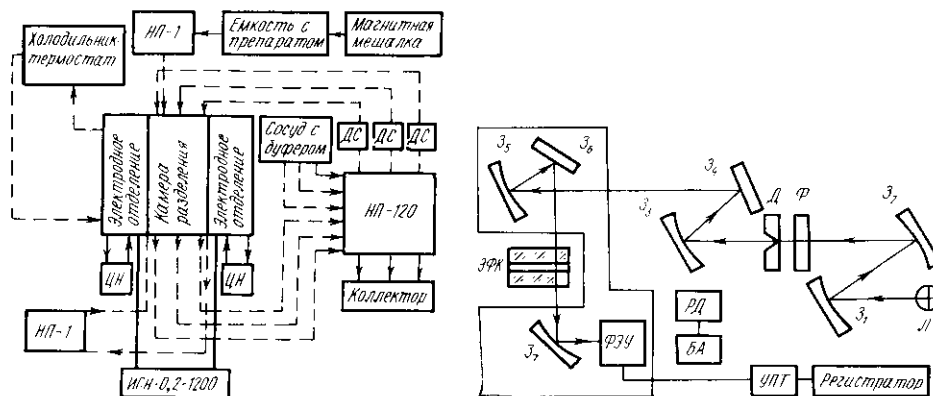


Рис. 1. (Слева). Схема установки (обозначения в тексте).

Fig. 1. (On the left). Scheme of the device (see the text).

Рис. 2. (Справа). Схема оптического сканатора (обозначения в тексте).

Fig. 2. (On the right). Optical scanner scheme (see the text).

и электропроводности при подаче во входные каналы камеры соответствующих буферов из ряда сосудов.

Для автоматического измерения светопропускания разделившихся фракций применяется сканатор, схема которого показана на рис. 2. Излучение источника Л (лампа ДДС-30) фокусируется сферическими зеркалами З₁ и З₂ через интерференционный фильтр Ф в плоскость диафрагмы Д (щель УФС-1). Параллельный пучок света от сферического зеркала З₃ после отражения от зеркала З₄ фокусируется сферическим зеркалом З₅ и, отразившись от зеркала З₆, дает изображение диафрагмы Д в середине зазора камеры разделения ЭФК. Прошедшее сквозь нее излучение сферическим зеркалом З₇ собирается в приемник излучения (фотоумножитель ФЭУ-130). Сканирующий столик, несущий зеркала З₅—З₇ и приемник излучения, перемещается вдоль камеры с помощью реверсивного двигателя РД-09 под управлением блока автоматики (БА). Электрический сигнал с приемника, усиливаясь блоком УПТ, поступает на самописец, а также на вход ЭВМ.

При движении оптического зонда вдоль камеры разделения происходит измерение и фиксация величины электрического сигнала с постоянной скоростью 80 измерений в секунду. Для определения величины относительного смещения зонда вдоль камеры разделения и линейной скорости сканирования (измерений на 1 мм), проводили сканирование оптической решетки с известным периодом. Результаты сканирования обрабатывали на ЭВМ, где методами линейного регрессионного анализа определена линейная скорость сканирования $95,8 \pm 0,3$ измерений на 1 мм.

Разрешение сканатора определяется шириной оптического зонда. Его измеряли, устанавливая в плоскости сканирования вторую щель УФС-1 шириной 10 мкм, что значительно меньше ширины зонда. Результаты сканирования представлены на рис. 3. Полуширина распределения величины электрического сигнала, получаемого в ходе такого сканирования, равна полуширине оптического зонда. На рис. 4 представлена зависимость полуширины оптического зонда от ширины входной щели оптической системы сканатора. Видно, что полуширина зонда слабо зависит от ширины входной щели и определяется в основном aberrациями в оптической системе.

Созданная нами установка имеет следующие технические характеристики: длина рабочей части камеры — 300 мм; ширина камеры — 60 мм; толщина зазора камеры — 0,6 мм; скорость ввода препарата — 0,5—2 мл/ч; расход буфера — 0,05—1 л/ч; макси-

мальная напряженность электрического поля — $2 \cdot 10^4$ В/м; ток через камеру — 0,05—0,4 А; максимальная рассеиваемая мощность в камере — 100 В·А; температура в камере — 4—20 °С; спектральный диапазон — 280, 330, 380 нм; полуширина оптического зонда — 0,15 мм; ширина зоны сканирования — 40 мм; скорость сканирования — 0,84 мм/с; нижний предел измерений по белкам — 1 мг/мл; по клеткам *E. coli* — 10^7 кл/мл.

Приготовление препаратов. Клетки *E. coli* штаммов *C-600* и *MRE-600* выращивали в мясо-пептонном бульоне при температуре 37 °С до стационарной фазы.

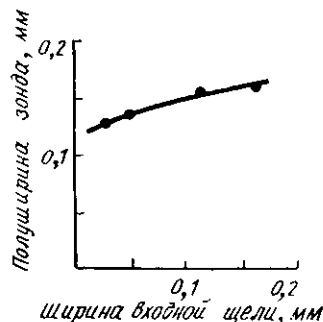
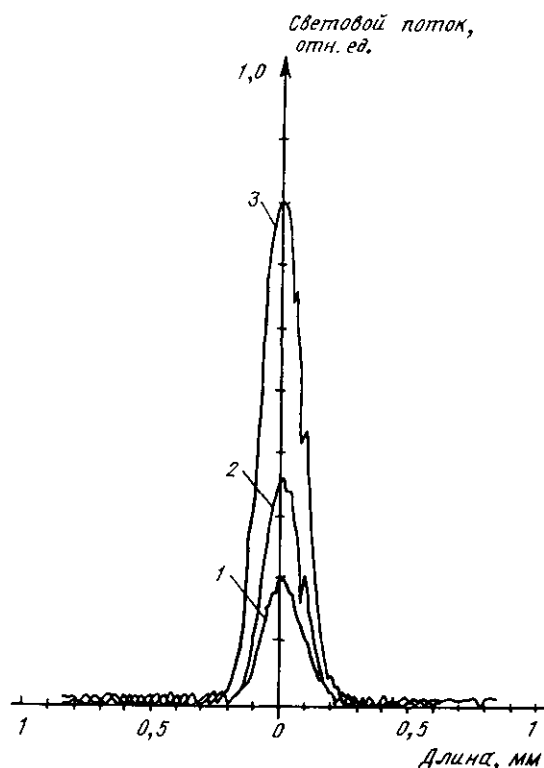


Рис. 4. Зависимость полуширины зонда от ширины входной щели.

Fig. 4. Probe halfwidth as a function of entrance slitwidth.

Рис. 3. Распределение светового потока в оптическом зонде в зависимости от ширины входной щели: 1 — 30; 2 — 50; 3 — 110 мкм.

Fig. 3. Light flux distribution in the optical probe as a function of the entrance slitwidth: 1 — 30 μm ; 2 — 50 μm ; 3 — 110 μm .

Выращенные клетки осаждали на центрифуге Т-23 при 4000 об/мин, трижды отмывали от культуральной жидкости в 0,013 М триэтанолламин- NaOH -буфере, pH 7,15, после чего ресуспендировали в этом же буфере до концентрации 10^8 кл/мл. Эритроциты барана (30 %-ная взвесь в физиологическом растворе, Одесское предприятие по производству бактериальных препаратов) подготавливали для измерений аналогичным образом.

Для измерения ЭФП белков использовали лиофилизированные бычий сывороточный альбумин (БСА) и гемоглобин лошади («Серва», ФРГ), которые растворяли до концентрации 5 мг/мл в том же триэтанолламиноном буфере либо в растворе 0,01 М NaCl , pH 4,7.

Для измерения величины электроосмоса использовали имеющий нулевое значение ЭФП голубой декстран («Fluka», Швейцария) с концентрацией 5 мг/мл.

Аналитический электрофорез в свободном потоке. Электрофорез проводили в указанных буферах при токах через камеру разделения, равных 30 и 60 мА, расходе буфера 440 ± 5 мл/ч, скорости подачи препарата $1 \pm 0,05$ мл/ч. Удельная электропроводность буфера равнялась $0,1 \pm 0,003 \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{м}^{-1}$, температура в камере поддерживалась равной $20 \pm 0,2$ °С.

Обработка информации на ЭВМ. Результаты сканирования преобразовывали в цифровую форму и вводили в мини-ЭВМ. Первоначально в качестве промежуточного носителя использовали перфоленгу, в настоящее время выход сканатора через аналого-цифровой преобразователь непосредственно связан с мини-ЭВМ. Обработка информации сводилась к удалению фона, уменьшению шума в сигнале, определению положений максимумов поглощения (см., например, [7]) и, наконец, расчету ЭФП фракций. Для удаления фона многократно сканировали фоновую линию (т. е. без вводимого материала), которую после усреднения вычитали из электрофорезграммы

исследуемого материала. Величину шума уменьшали посредством цифровой фильтрации сигнала [8]. Для ЭФСП характерно асимметричное распределение сигнала от каждой фракции на выходе из камеры разделения [9]. Тем не менее величина смещения X максимума поглощения фракции с электрофоретической подвижностью U хорошо списывается линейной зависимостью

$$X = 2/3t(EU - V),$$

где E — напряженность поля в камере; t — среднее время нахождения частиц в камере; V — величина электроосмотического потока в центре камеры. Значение U вычисля-

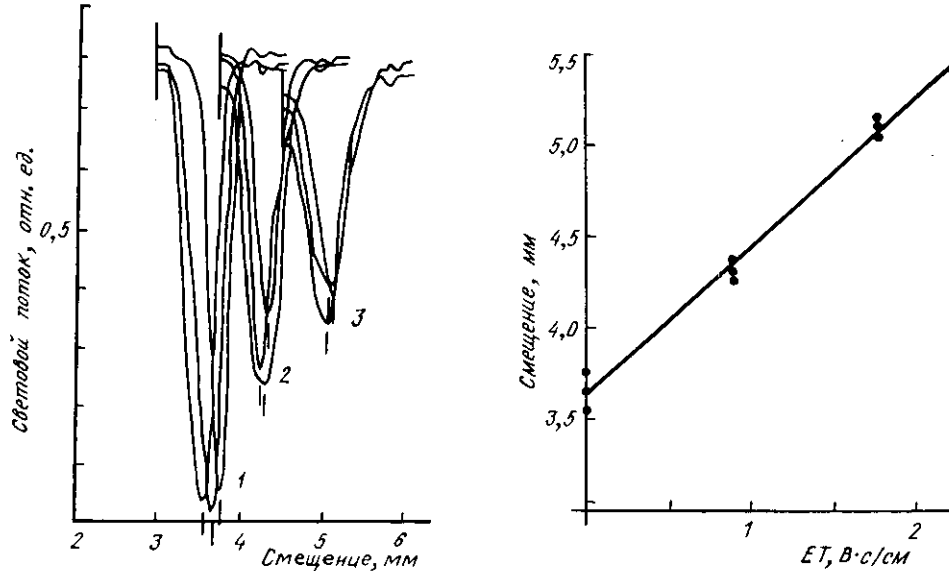


Рис. 5. Распределение коэффициента светопропускания в зоне декстрана при различных значениях тока в камере: 1 — 0; 2 — 30; 3 — 60 мА.

Fig. 5. Distribution of the light transmission coefficient within dextran band at various electric current values in chamber: 1 — 0 mA; 2 — 30 mA; 3 — 60 mA.

Рис. 6. Зависимость между смещением зоны декстрана и произведением напряженности электрического поля на среднее время нахождения декстрана в поле.

Fig. 6. Dextran band displacement as a function of the electric field strength product by the mean time of dextran exposure to the field.

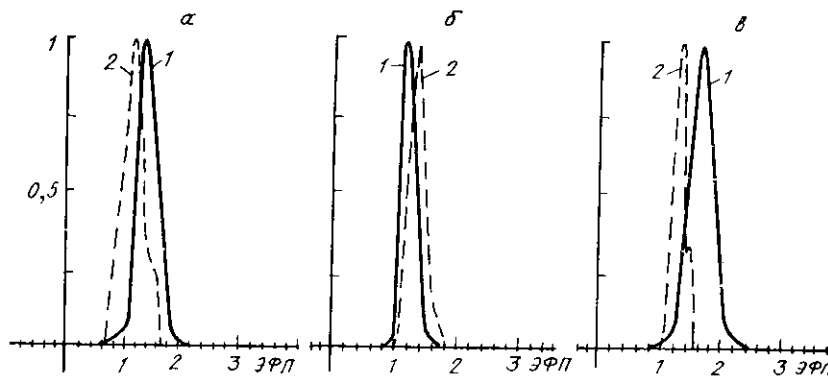


Рис. 7. Распределения эритроцитов (а), *E. coli* MRE-600 (б), *E. coli* C-600 (в) по ЭФП, полученные методами: 1 — микроэлектрофореза; 2 — ЭФСП.

Fig. 7. Electrophoretic mobility distribution of erythrocytes (а), *E. coli* MRE-600 (б), *E. coli* C-600 (в) measured by microelectrophoresis (1) and free flow electrophoresis (2).

ли из соотношения методами линейного регрессионного анализа, для чего определяли смещение X (и величину V) при разных напряженностях поля E .

На рис. 5 представлены результаты сканирования струи декстрана как в отсутствие поля, так и при разных значениях тока в камере. Величина смещения струи декстрана в поле, определяемая по положению максимума поглощения, прямо пропорцио-

нальна произведению напряженности электрического поля на среднее время нахождения в нем препарата (рис. 6). Коэффициент пропорциональности — тангенс угла наклона регрессионной прямой, равен величине скорости электроосмотического потока в центре камеры, которую необходимо учитывать при определении абсолютных значений ЭФП препаратов.

Обсуждение результатов. Для сравнения метода ЭФСП с микроэлектрофорезом измеряли ЭФП эритроцитов и клеток *E. coli*. В табл. 1 приведены средние значения ЭФП, полученные этими двумя методами. Измерения ЭФП микроэлектрофорезом проводили на цитоферометре «Ортоп» («Ортоп», ФРГ), результаты измерений обрабатывали на мини-ЭВМ. Распределения клеток по ЭФП, полученные с помощью этих методов, демонстрируют хорошее согласие между ними (рис. 7).

В табл. 2 приведены средние значения ЭФП изученных нами белков. Наши результаты соответствуют данным, имеющимся в литературе. Так, для БСА результаты измерений ЭФП в растворе 0,01 М NaCl совпадают с данными, полученными в аналогичных условиях методом подвижной границы [2].

Таблица 1

ЭФП клеток, полученные методом ЭФСП и микроэлектрофорезом, $(\text{см}^2/\text{В}\cdot\text{с})\cdot 10^4$
Electrophoretic mobility of cells measured by free flow electrophoresis and microelectrophoresis $(\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s})\cdot 10^4$

Объект исследования	Метод измерения ЭФП	
	ЭФСП	Микроэлектрофорез
Эритроциты	1,1	1,3
<i>E. coli</i> C-600	1,4	1,7
<i>E. coli</i> MRE-600	1,5	1,2

Таблица 2

ЭФП белков, полученные методом ЭФСП, $(\text{см}^2/\text{В}\cdot\text{с})\cdot 10^4$
Electrophoretic mobility of proteins measured by free flow electrophoresis, $(\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s})\cdot 10^4$

Объект исследования	Буферный раствор	
	Триэтанол-мин, pH 7,15	NaCl, pH 4,7
БСА	0,6	-0,3
Гемоглобин	-0,4	-2,1

Полученные нами результаты показывают, что метод аналитического ЭФСП может быть успешно использован для определения ЭФП клеток, субклеточных частиц, белков и других биополимеров. Основными его преимуществами являются быстрота (5—10 мин), малая относительная погрешность (3 %) измерения ЭФП, препаративное получение необходимых фракций, применение ЭВМ для автоматизации и обработки результатов измерений.

ANALYTICAL FREE FLOW ELECTROPHORESIS OF CELLS AND PROTEINS

I. S. Gabuev, A. L. Mazanov, V. N. Brezgunov, I. N. Prelova, A. S. Koleznev

ALL-Union Research Institute of Applied Microbiology, Obolensk, Moscow Region

Summary

A free-flow electrophoresis device combined with optical scanner and microcomputer is described. In the device the sample is continuously pumped into the vertical stream of buffer. When constant electric field is applied at the right angle with the stream, the sample band is separated into fractions. The magnitudes of fraction displacement are measured by the scanner, and the computer provides the calculation of electrophoretic mobility of fractions. Runs last only for 10 minutes. The technique is illustrated by *E. coli*, sheep erythrocytes, bovine serum albumin, horse hemoglobin. It may be applied to determine isoelectric points of proteins for rapid measurement of electrophoretic mobility of cells in fermentation.

1. Аболина Т. А. Микроэлектрофорез как метод изучения поверхностной структуры бактериальных клеток // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 1980. — № 4. — С. 21—27.
2. Духин С. С., Дерягин Б. В. Электрофорез. — М.: Наука, 1976. — 332 с.
3. Троицкий Г. В. Электрофорез белков. — Харьков: Вища шк., 1962. — 319 с.
4. Ramsey S. W., Nowland E. D., Simpson L. B. Resolution of microbial mixtures by free-flow electrophoresis // Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol. — 1982. — N 9. — P. 217—226.
5. Разделение клеточных суспензий / А. И. Мирошников, В. М. Фомченков, И. С. Габурев, В. А. Чекапов. — М.: Наука, 1977. — 367 с.
6. Hannig K. New aspects in preparative and analytical continuous free-flow electrophoresis // Electrophoresis. — 1982. — 3, N 2. — P. 235—243.
7. Силис Я. Я., Кофман А. М., Розенблит А. Б. Первичная обработка хроматограмм и спектров на ЭВМ. Принципы. Алгоритмы. Программы. — Рига: Зинатне, 1980. — 128 с.
8. Хемминг Р. В. Цифровые фильтры. — М.: Радио и связь, 1980. — 224 с.
9. Мазанов А. Л., Гаврюшкин А. В. Методы математической обработки экспериментальных данных электрофореза в свободном потоке. Анализ распределения материала по сечению проточной камеры // Молекуляр. биология. — 1984. — Вып. 36. — С. 34—43.

ВНИИ прикл. микробиологии
 Главмикробиопрома при СМ СССР,
 Оболенск Московской области

Получено 21.10.85

УДК 517.9:532:536.7

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗОТАХОФЕРЕЗА ПРИ ПОСТОЯННОМ НАПРЯЖЕНИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДВИЖНОСТИ

М. Ю. Жуков, Л. Е. Король

Электрофоретическая подвижность является важной характеристикой молекул, в том числе биополимеров, а ее измерение требует применения специальных аналитических методов.

В работе [1] содержится описание способа измерения подвижности ионов электролита при помощи видоизмененного метода изотахофореза (ИТФ) в смеси лидер — терминатор. Основная идея предлагаемого способа измерения заключается в изменении режима проведения ИТФ — в электрофоретической камере поддерживается постоянная разность потенциалов на электродах, а не постоянная плотность тока. Это приводит к тому, что скорость движения границы между лидером и терминатором, зависящая в режиме с постоянной плотностью тока лишь от физико-химических параметров лидера, определяется параметрами как лидера, так и терминатора. В конечном итоге в случае стандартного лидера имеется возможность определения подвижности ионов терминатора на основе измерения времени движения границы зон.

К сожалению, при выводе расчетных формул в работе [1] допущены серьезные ошибки — игнорировано регулирующее соотношение Кольрауша, что привело к неправильному определению значений рН, для которых измерены электрофоретические подвижности; не учтено падение напряжения на участках электрод — датчик регистрации границ зон (термопара), что, по-видимому, привело к внесению систематических погрешностей при определении величины электрофоретической подвижности.

Ниже излагается исправленная методика измерения подвижности ионов слабых электролитов, основанная на теории ИТФ, детально разработанной для стационарного случая в работах [2, 3] и для нестационарного — в [4—6].

Теория ИТФ для режима с постоянным напряжением м. Рассмотрим электрофоретическую камеру, заполненную раствором двух слабых кислот и одного слабого основания. Схематический вид камеры и начальное распределение концентраций кислот и осно-