

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. Габуев, 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.

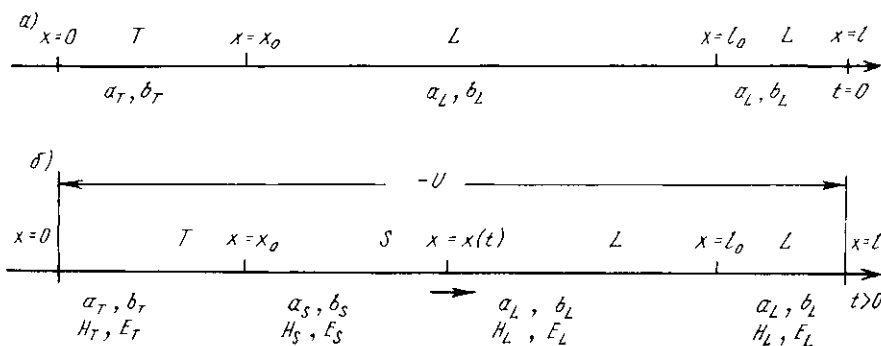
В работе [1] содержится описание способа измерения подвижности ионов электролита при помощи видоизмененного метода изотахофореза (ИТФ) в смеси лидер — терминатор. Основная идея предлагаемого способа измерения заключается в изменении режима проведения ИТФ — в электрофоретической камере поддерживается 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-

ваший в момент времени $t=0$ показаны на рисунке, а. В точках $x=0$ и $x=l$ расположены электроды, а в точках $x=x_0$ и $x=l_0$ — датчики, регистрирующие границы зон (например, термопары). В области $x < x_0$ находится терминатор (Т)-электролит, состоящий из слабой кислоты HA_T с концентрацией a_T и слабого основания B с концентрацией b_T . В области $x_0 < x$ находится лидер (L)-электролит, состоящий из слабой кислоты HA_L с концентрацией a_L и слабого основания B с кон-



Расположение зон в электрофоретической камере.
Zone distribution in electrophoretic chamber.

центрацией b_L . Ионы слабого основания H^+B выполняют роль противоиона.

В соответствии с [1] введем электрофоретические подвижности m_T и m_L слабых кислот HA_T и HA_L

$$m_T(H) = \alpha_T(H) \gamma_T, \quad m_L(H) = \alpha_L(H) \gamma_L, \quad (1)$$

где

$$\alpha_T(H) = \frac{K_T}{K_T + H}, \quad \alpha_L(H) = \frac{K_L}{K_L + H}. \quad (2)$$

Здесь H — концентрация иона водорода H^+ ; $\alpha_T(H)$, $\alpha_L(H)$ — степени диссоциации кислот HA_T и HA_L ; γ_T , γ_L — подвижности ионов A_T^- и A_L^- (кислотных остатков); K_T и K_L — константы диссоциации кислот HA_T и HA_L .

Электрофоретическая подвижность характеризует скорость движения в электрическом поле комплекса нейтральная молекула — ион кислоты, возникающего в результате быстрых химических реакций, и, естественно, зависит от pH раствора ($pH = -\lg H$).

Потребуем выполнения условия, при котором лидер перемещается в электрическом поле быстрее терминатора

$$m_L(H) > m_T(H). \quad (3)$$

Тогда в процессе движения под действием электрического поля в электрофоретической камере возникают три зоны электролитов (рисунок, б). Зона Т, расположенная в интервале $0 \leq x < x_0$ — терминатор с прежним составом и концентрациями; зона L, расположенная в интервале $x(t) < x \leq l$ — лидер с прежним составом и концентрациями; зона S, расположенная в интервале $x_0 < x < x(t)$ — электролит, имеющий такой же состав, как и терминатор, но с иными концентрациями компонент, т. е. электролит, состоящий из слабой кислоты HA_T с концентрацией a_S и слабого основания B с концентрацией b_S . Граница между зонами S и L движется по закону $x=x(t)$ со скоростью v .

Концентрации a_S , b_S , скорость движения границы v и напряженности электрического поля E_T , E_S , E_L (рисунок, б) определяются законами сохранения массы, заряда и условием электронейтральности [3, 6]. В случае, когда концентрации компонент смеси достаточно велики по сравнению с концентрацией ионов водорода (на практике это усло-

вие всегда выполнено), имеем:

$$a_S = \frac{\gamma_T}{\gamma_T + \gamma_B} \frac{\gamma_L + \gamma_B}{\gamma_L} a_L; \quad (4)$$

$$b_S = b_L + \frac{\gamma_B}{\gamma_L} \frac{\gamma_T - \gamma_L}{\gamma_T + \gamma_L} a_L; \quad (5)$$

$$\dot{x} = v = -\frac{j}{F} \frac{\gamma_L}{\gamma_L + \gamma_B} \frac{1}{a_L}, \quad \dot{x} = \frac{dx}{dt}; \quad (6)$$

$$E_S = -\frac{v}{m_T(H_S)}; \quad E_L = -\frac{v}{m_L(H_L)}; \quad (7)$$

$$E_T = -v \frac{a_S}{a_T} \frac{1}{m_T(H_T)}. \quad (8)$$

Здесь γ_B — подвижность ионов слабого основания H^+B ; j — плотность электрического тока; F — число Фарадея; H_T, H_S, H_L — концентрации ионов водорода в зонах T, S, L соответственно.

Формула (4) представляет собой хорошо известное регулирующее соотношение Кольрауша [2—6]; (5) — аналог соотношения Кольрауша для противоиона [6]; (6) — известное в теории ИТФ выражение для скорости движущейся границы [2—6]; (7) — отражают тот факт, что вещества слева и справа от границы $x=x(t)$ движутся с одинаковой скоростью. Формула (8) не встречается в стационарной теории ИТФ [2, 3], рассматривающей финальные стадии процесса. Ее аналоги имеются в [4—6], где впервые отмечено наличие неподвижной границы со скачками концентрации терминатора.

Концентрации ионов водорода H_T, H_S, H_L (или $pH = -\lg H$) для электролита слабая кислота — слабое основание определяются условием электронейтральности [7].

$$H_i = \frac{1}{2} K_i \left\{ \left(\frac{a_i}{b_i} - 1 \right) + \sqrt{\left(\frac{a_i}{b_i} - 1 \right)^2 + 4 \frac{K_B}{K_i} \frac{a_i}{b_i}} \right\}, \quad i = T, S, L, \quad (9)$$

где K_B — константа диссоциации основания B .

Разность потенциалов ($-U$) на электродах $x=0, x=l$ определяется соотношением (рисунок, б)

$$-U = E_T x_0 + E_S (x - x_0) + E_L (l - x_0). \quad (10)$$

В обычном режиме ИТФ — режиме с постоянной плотностью тока ($j = \text{const}$) — граница $x=x(t)$ движется с постоянной скоростью $v = \text{const}$, задаваемой соотношением (6). Закон движения имеет вид $x(t) = x_0 + vt$. Формула (10) в этом случае определяет зависимость разности потенциалов от времени $U = U(t)$.

В видоизмененном методе ИТФ — режиме с постоянной разностью потенциалов ($U = \text{const}$) — граница $x=x(t)$ движется с переменной скоростью. В этом случае формула (10) определяет закон движения границы. Действительно, подставляя (7) и (8) в (10), с учетом $v = \dot{x}$, получим дифференциальное уравнение

$$U = \frac{\dot{x} x_0}{m} + \frac{\dot{x} (x - x_0)}{m_T} + \frac{\dot{x} (l - x)}{m_L}, \quad (11)$$

где

$$m = m_T(H_T) \frac{a_T}{a_S}, \quad m_T = m_T(H_S), \quad m_L = m_L(H_L). \quad (12)$$

Начальное условие для (11), означающее, что в момент $t=0$ граница $x=x(t)$ находится в точке $x=x_0$, имеет вид

$$x(0) = x_0. \quad (13)$$

Решая задачи (11), (13), определим время t_0 прохождения границы $x=x(t)$ между датчиками в точках $x=x_0$ и $x=l_0$;

$$t_0 = \frac{(l_0 - x_0)^2}{2U} \left(\frac{1}{m_T} + \frac{1}{m_L} \right) (1 + \varepsilon); \quad (14)$$

$$\varepsilon = \frac{2m_T m_L}{m_T + m_L} \left(\frac{l - l_0}{l_0 - x_0} \frac{1}{m_L} + \frac{x_0}{l_0 - x_0} \frac{1}{m} \right). \quad (15)$$

Соотношения (4), (5), (9), (14), (15) при известных величинах $a_L, b_L, U, t_0, K_T, K_B, K_L, \gamma_L, \gamma_B, x_0, l_0, l$ позволяют в принципе определить величину $m_T = m_T(H_S)$ и H_S (или γ_T, H_S).

Замечание 1. Кислоту HA_L можно считать сильной, т. е. полностью диссоциирующей на ионы ($K_L = \infty, m_L = \gamma_L$). В этом случае все соотношения остаются прежними, за исключением формулы (9) для определения концентрации ионов водорода H_L в зоне L , которая заменяется следующей [7]

$$H_L = \frac{(a_L - b_L) + \sqrt{(a_L - b_L)^2 + 4K_B a_L}}{2}, \quad a_L \geq b_L. \quad (16)$$

Описание методики эксперимента для определения электрофоретической подвижности. Основной недостаток, затрудняющий применение формул (4), (5), (9), (14), (15) для определения m_T , заключается в том, что в эти формулы входит неизвестная величина γ_T . Однако существует режим эксперимента, свободный от указанного недостатка.

Обеспечим следующие условия:

$$a_T = b_T, \quad a_L = b_L, \quad x_0 = 0, \quad l = l_0. \quad (17)$$

Это означает, что концентрации кислоты и основания в лидере и терминаторе должны совпадать, а датчики, регистрирующие границу зоны, должны быть совмещены с электродами, на которых поддерживается постоянная разность потенциалов (впрочем, условие $l=l_0$ не является обязательным — его несоблюдение приводит лишь к более громоздким формулам).

Из (4), (5) (9), (14), (15) имеем:

$$a_S = b_S, \quad H_T = H_S = \sqrt{K_T K_B}, \quad H_L = \sqrt{K_L K_B}, \quad (18)$$

$$\frac{1}{m_T} = \frac{2Ut_0}{l^2} - \frac{1}{m_L}, \quad \left(m_L = \frac{K_L}{K_L + H_L} \gamma_L \right), \quad (H_L = \sqrt{K_B a_L} \text{ при } K_L = \infty).$$

Таким образом, электрофоретическая подвижность m_T при $pH_T = pH_S = pK_T + pK_B$ определяется разностью потенциалов U , расстоянием между датчиками l , временем прохождения границы зоны от одного датчика к другому t_0 и величиной m_L . Значения U, l, t_0 могут быть легко измерены, а значение m_L определяется параметрами лидера, в качестве которого следует выбирать стандартный электролит с известными свойствами. Изменение величины $pH_T = pH_S$ для построения зависимости $m_T = m_T(pH_T)$ достигается путем проведения экспериментов с различными основаниями B , т. е. с различными pK_B .

Замечание 2. Величины $pH_T = pH_S$ и pH_L могут быть непосредственно измерены в момент начала эксперимента, так как в процессе эволюции они остаются неизменными. В этом случае отпадает необходимость в информации о pK_T и pK_L .

Замечание 3. Формулы (18) справедливы лишь при выполнении условия (3), которое в данном случае имеет вид $m_L(H_L) > m_T(H_T)$.

Замечание 4. Нет никаких физических противоречий, препятствующих расположению электродов в точках $x=x_0=0$ и $x=l=l_0$, т. е. непосредственно в рабочей части электрофоретической камеры, а не в сосудах с буферным раствором, как это обычно делается. Действи-

тельно, роль электрического поля заключается, в частности, в поддержании концентрации терминатора непосредственно справа от электрода $x=0$, равной a_T , и концентрации лидера непосредственно слева от электрода $x=l$, равной a_L , т. е. такими же, как и их концентрации в сосудах с буферным раствором. Это означает, что электрод может быть расположен в любой части сосудов с буферным раствором, и, в частности, на границе сосуда с рабочей частью камеры.

Ошибки расчетов работы [1]. Авторы работы [1] полагают, что зона S (рисунок, б) не образуется, т. е. что концентрации терминатора в этой зоне прежние $a_S=a_T$, $b_S=b_T$. Это противоречит регулирующим соотношениям Кольрауша (4), (5) и в итоге приводит к неправильному определению рН в зоне S , которое ошибочно считается совпадающим с рН в зоне T . На основе (4), (5), (9) возможно построение пересчетных формул для определения истинного значения рН в зоне S , которые не приведены ввиду их громоздкости. Использование этих формул для пересчета на основе экспериментов работы [1] в случае большинства веществ дало противоречивые результаты. Это связано с тем, что для этих веществ измеренные в [1] значения m_T оказались большими γ_T , что невозможно (см. (1), (2), откуда следует $\alpha_T \leq 1$, $m_T \leq \gamma_T$). Вероятно, дело в том, что для определения m_T использовали формулу (14) при $\epsilon=0$. Как уже указывалось, это соответствует совмещенному расположению датчиков (термопар) и электродов — $x_0=0$, $l=l_0$. Из текста работы [1] неясно, были ли выполнены указанные условия совмещения.

Для проверки методики, предложенной в [1], проведены эксперименты на установке, описанной в [8]. Результаты экспериментов показали, что указанная методика неприменима для определения электрофоретической подвижности. Результаты экспериментов по методике, предложенной в настоящей статье, показали существование неподвижной границы раздела, что косвенно подтверждает правильность этой методики и уж во всяком случае неприменимость методики работы [1]. Полные результаты экспериментов по измерению подвижностей будут опубликованы в следующей статье.

USE OF ISOTACHOPHORESIS AT A CONSTANT VOLTAGE FOR DETERMINATION OF MOBILITY

M. Yu. Zhukov, L. E. Korol

M. A. Suslov University, Rostov
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The simple experimental procedure which permits determining the dependence of electrophoretic mobility of substances on pII of the solution is described. The absence of experimental data on such dependences considerably delays the progress of electrophoretic methods and their use for analyzing separating biopolymers.

1. *Carchon H., Eggermont E.* Isotachophoretic determination of relative apparent mobility as an estimate of electrophoretic mobility of ions // *Electrophoresis*. — 1982. — N 3. — P. 263—274.
2. *Paaglund H.* Isotachophoresis // *Sci. Tools*. — 1970. — 17, N 1. — P. 9—13.
3. *Rouls R. T.* Electrolyte systems in isotachophoresis and their application to some proteins separation. — Solna: Solna Skriv, 1971. — 137 p.
4. *Жуков М. Ю., Юдович В. И.* Математическая модель изотахофореза // *Докл. АН СССР*. — 1982. — 267, № 2. — С. 334—338.
5. *Жуков М. Ю.* Нестационарная модель изотахофореза // *Журн. вычисл. математики и мат. физики*. — 1984. — № 4. — С. 549—565.
6. *Бабский В. Г., Жуков М. Ю., Юдович В. И.* Математическая теория электрофореза. — Киев: Наук. думка, 1983. — 203 с.
7. *Корыта И., Дворжак И., Богачкова В.* Электрохимия. — М.: Мир, 1975. — 472 с.

8. Универсальная установка для жидкостного колоночного электрофореза биополимеров / Л. Е. Король, Н. И. Коньшин, Г. Ю. Ажицкий, В. И. Андриенко // Молекулярная биология. — 1984. — Вып. 36. — С. 70—71.

Рост. гос. ун-т им. М. А. Суллова
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 21.10.85

УДК 543.545

ОПЫТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ИЗОЭЛЕКТРОФОКУСИРОВАНИЯ В СВЕРХТОНКИХ БЛОКАХ ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО ГЕЛЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛМАЛИТОВ — АМФОЛИТОВ-НОСИТЕЛЕЙ *

А. В. Шурхал, Г. Т. Азимбаева, А. В. Подогаз,
К. Б. Мусабеков, В. А. Пасечник

Введение. Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) является одним из наиболее распространенных и прогрессивных методов анализа свойств биологических полимеров. Принципиальная идея метода сформулирована в работах Колина и Свенсона (Рилби) (цитировано по [1]) и заключается в том, что макромолекулы, несущие заряд, под действием электрического поля мигрируют вдоль градиента рН, пока не достигнут соответствующего значения изоэлектрической точки (рI). В настоящее время успешно развиваются вопросы общей теории ИЭФ [2] и разработан широкий диапазон его методических модификаций [3]. В качестве субстрата для формирования градиента рН используются разнообразные химические агенты, однако наибольшее распространение получили синтетические амфолиты-носители, из которых более предпочтительными являются амфолиты, известные под коммерческими названиями «амфолины» производства «ЛКВ» (Швеция); «сервалиты» и «фармалиты», выпускаемые соответствующими фирмами «Seriva» (ФРГ) и «Pharmacia» (Швеция). В Советском Союзе ранее были предприняты попытки синтезировать собственные амфолиты [4, 5]. В данном сообщении представлены результаты опытов по аналитическому ИЭФ в сверхтонких слоях полиакриламидного геля (ПААГ), где амфолитами-носителями служили препараты, синтезированные в Казахском государственном университете им. С. М. Кирова.

Материалы и методы. Амфолит-носитель синтезирован в Казахском государственном университете им. С. М. Кирова на кафедре коллоидной химии и получил название «Алмалит». Синтез проведен на основе взаимодействия промышленных смесей полиэтилениполиаминов (ПЭПА) с непредельными карбоновыми кислотами при соотношении амино- и карбоксильных групп (N/COOH) в исходных реагентах 2:1. Реакцию проводили в круглодонной колбе, снабженной мешалкой, путем взаимодействия кислоты с водным раствором ПЭПА в течение 1 ч в токе инертного газа. Для завершения реакции смесь термостатировали при 70 °С в течение 5 ч. Синтезированный продукт получали в виде 40 %-ного водного раствора. Синтезированные таким образом алмалиты были исследованы методом ИЭФ в градиенте плотности сахарозы в колонке «ЛКВ» объемом 110 мл. В ходе опыта одновременно измеряли градиент рН, электропроводность и поглощение в УФ-части спектра при 280 нм. Свойства алмалитов в режиме ИЭФ исследованы методом аналитического ИЭФ в сверхтонких гелях полиакриламида. Техника приготовления растворов гелей, содержащих алмалиты-носители, формирование сверхтонких гелевых блоков и основные параметры режима ИЭФ описаны нами ранее [6]. В опытах использованы источники питания фирмы «Desaga» «Desatronic-2000», а также источники, разработанные в СКБ БФА, ИПЭ-2000-02 с режимом стабилизации по мощности. Префокусирование и разделение проводили при 4 °С. Распределение гради-

* Амфолиты-носители синтезированы в Казахском госуниверситете.