

УДК. 57.083

Микросепарационное устройство для выделения целевого белка методом электрофореза в свободном потоке© 2018 В.А. ЛЕОНОВИЧ¹, О.Н. СОРОКИНА^{1,*}, М.А. КЛИМОВ¹, П.Г. ПРОНКИН¹, И.Г. ПЛАЩИНА¹, С.Н. ПОДОЙНИЦЫН¹¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Российская академия наук, 119334 Москва

*e-mail: alsiona@gmail.com

Поступила в редакцию 23.05.2018 г.

Принято в печать 29.08.2018 г.

Предложены конструкция упрощенного сепарационного устройства и методика сепарации для выделения целевого белка из смеси белков методом электрофореза в свободном потоке. Эффективность устройства была продемонстрирована теоретически и экспериментально на примере сепарации белков гемоглобина и сывороточного альбумина человека из их смеси. Предложенное сепарационное устройство и методика разделения отличаются простотой использования и высокой производительностью (до 1 мл/ч). Показано влияние процесса экранирования поверхностного потенциала электродов на эффективность разделения белковых смесей. Произведено компьютерное моделирование электрофоретического процесса в рамках теории Нернста–Планка для разделяемых белков.

Ключевые слова: электрофорез в свободном потоке, зонный электрофорез, электрический потенциал.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-5-67-76

Важный этап биологического анализа – выделение целевого анализата. При этом методы разделения должны быть простыми, надежными и недорогими. Одним из таких методов фракционирования и разделения анализируемых проб является электрофорез в свободном потоке (ЭФСП). В последние десятилетия принципы ЭФСП широко используются при разделении биологических систем, таких как смеси белков [1–3], ионные пары отдельных компонентов [4], клетки [5], органеллы [6], протеомы [7–11].

В процессе ЭФСП анализируемая смесь непрерывно вводится в плоскую сепарационную камеру, в которой формируется ламинарный поток. Под действием внешнего электрического поля, направленного перпендикулярно основному потоку, смесь разделяется на отдельные компоненты в соответствии с их электрофоретическими свойствами. (рис. 1).

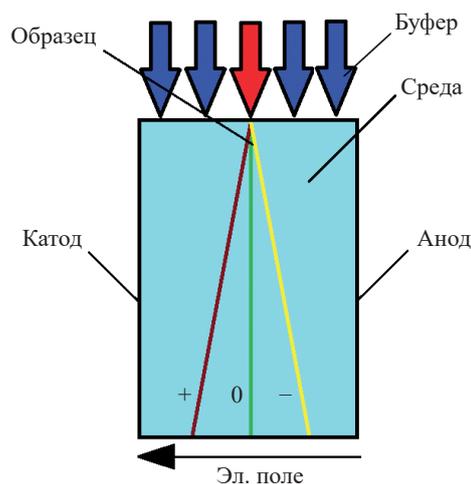


Рис. 1. Простейшая схема организации электрофореза в свободном потоке [18]

Fig. 1. The simplified scheme of free flow electrophoresis

Список сокращений: САЧ – сывороточный альбумин человека; ГГ – гемоглобин. ЗЭФ – зонный электрофорез; ЭФ – электрофорез; ЭФСП – электрофорез в свободном потоке; мк-ЭФСП – микроэлектрофорез в свободном потоке.

По сравнению с традиционными техниками сепарирования, например капиллярным электрофорезом [12], ЭФСП обладает бесспорными преимуществами, такими как высокая степень выхода исходного образца [13, 14], устойчивая биологическая активность [13–15], непрерывное разделение, низкая стоимость [14–16]. Кроме того, данный метод включает высокоэффективные инструменты жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза.

В зависимости от размеров сепарационной камеры ЭФСП можно проводить в макро- и микрообъемах (мк-ЭФСП) [14]. Макрообъемы используются на этапах препаративных процессов, когда требуются высокая пропускная способность и непрерывность сепарирования [14–17]. Для решения аналитических задач (разделение проб микрообъема и определение их состава) применяется мк-ЭФСП. Его же используют при создании устройств «лаборатории на чипе», позволяющих наблюдать за химическими процессами в режиме реального времени [18]. На сегодняшний день развитие мк-ЭФСП направлено на разработку и совершенствование устройства и методики сепарации.

В зависимости от принципов, лежащих в основе фракционирования можно выделить следующие типы мк-ЭФСП: зональный (зонный) электрофорез (ЗЭФ), изоэлектрическое фокусирование, изотахофорез.

Разделение частиц при ЗЭФ основывается на разнице в соотношении их массы и заряда. ЗЭФ проводят в однородном буферном растворе в постоянном электрическом поле. Принципы ЗЭФ используются при разделении образцов биомакромолекул [7, 18–20] в устройствах мк-ЭФСП. Однако разрешающая способность такого подхода недостаточно высока и позволяет разделять белки на фракции только с сильно отличающимися значениями рН. При этом буфер, используемый в таких системах сепарации, должен иметь низкую ионную силу (например трис-боратный буфер). Для успешного распределения потоков при разделении белков на фракции требуется объем камеры не менее 30–50 мкл. Эффективное разделение возможно только при напряжении электрического поля, подаваемого на электроды, не менее 200–300 В, так как, чтобы избежать влияния электролиза воды, электроды необходимо помещать в отдельные камеры, соединенные системой каналов с основной камерой разделения, и в результате, они оказываются на удаленном расстоянии относительно друг друга. Таким образом, изго-

товление камер пригодных для мк-ЭФСП является сложной и дорогостоящей технической задачей, для решения которой требуются средства и специальное оборудование.

Применение ЗЭФ при разделении белковых фракций более актуально для решения задач по выделению одной фракции частиц, не имеющих заряда. В этом случае рН среды подбирается таким образом, чтобы его значение совпадало с изоэлектрической точкой частиц, выделяемой фракции. В результате частицы, имеющие заряд, отклоняются от основного потока и остаются в сепарационной камере, а незаряженные частицы собираются в коллекторе через выходное отверстие. Такие принципы разделения могут применяться в случае выделения или очистки от балластных белков одного целевого анализа для создания микрофлюидных аналитических устройств по типу «лаборатории на чипе».

Цель настоящей работы – создание и последующая апробация конструкции упрощенного устройства для выделения целевого белка из смеси белков методом ЭФСП, основанная на принципах ЗЭФ.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Ячейка мк-ЭФСП

Была предложена конструкция камеры, которая предполагает ее изготовление с помощью простой механообработки компонентов устройства, при этом объем сепарационной камеры составлял около 7 мкл.

В качестве материала для изготовления корпуса использовался листовая полиметилметакрилат (оргстекло) толщиной 5 мм. Каналы для электродов формировали фрезерованием, а отверстия для ввода и вывода буфера и пробы – сверлением. В качестве электродов использовали проволоку (Pt 99,99), обладающую свойствами нерастворимого анода.

На корпусе сепарационного устройства (рис. 2) располагался подвод для разделяемой суспензии (1), соединенный с рабочей зоной сепаратора (плоская камера, размерами 20×3×0,12 мм), которая оканчивалась выводным отверстием (1⁰). Заряженные белки через проницаемые барьеры (2⁺ и 2⁻) отводились из сепарационной камеры в камеры для электродов.

Для прокачки буферного раствора в электродных камерах были сформированы отдельные вводные и выводные отверстия и каналы. Скорость прокачки буферного раствора в электродных

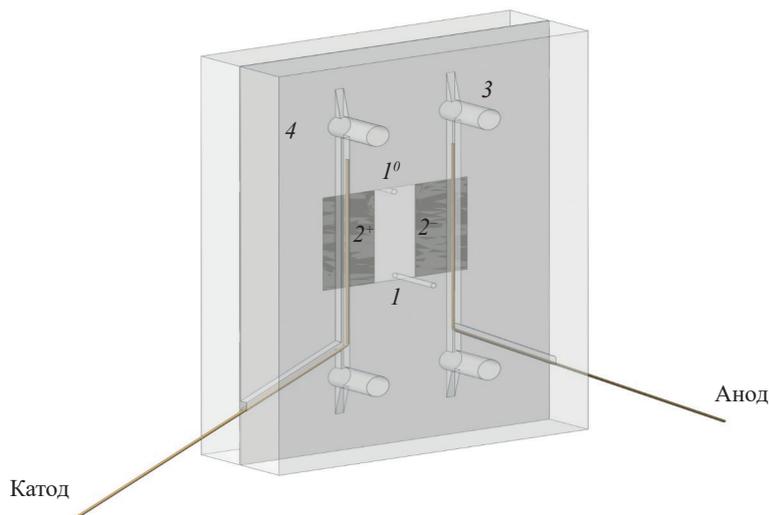


Рис. 2. 3D модель устройства мк-ЭФСП в собранном виде, где $1, 1^0$ – вводной и выводной каналы, соответственно, $2^+, 2^-$ – полупроницаемые мембраны, отделяющие камеру катода и анода соответственно, 3 – диэлектрическая прокладка, 4 – пластины корпуса

Fig. 2. 3D model of the assembly of μ -FFE device. $1, 1^0$ are the input and output respectively, $2^+, 2^-$ are the membranes for isolation of cathode and anode chambers, 3 , the dielectric spacer and 4 , the slabs of the device body

камерах многократно превосходила скорость прокачки образца в сепарационной камере. При этом потоки в камерах для электродов были изолированы от потоков в сепарационной камере с помощью ион-проницаемых барьеров.

Ион-проницаемые барьеры в сепарационной камере изготавливали из пористого ацетата целлюлозы с характеристическими параметрами пористости 80% и размерами пор 5 мкм (Millipore США) и 0,22 мкм («Владипор» Россия). Такие мембраны позволяют отделять потоки в камере электродов от потоков в сепарационной камере, при этом не изолируя электрическое поле в системе.

Электрически нейтральные белки выводятся из устройства для дальнейшего детектирования и анализа. Высокое напряжение подводится к аноду и катоду, находящимся в камерах, отделенных от сепарационной камеры с помощью ион-проницаемых барьеров (2^+ и 2^-). Сепарационная камера формируется с помощью диэлектрической прокладки (3) – пленки толщиной 120–130 мкм из полиолефинов с примесью парафина (Parafilm M).

Реализация устройств для высоковольтного мк-ЭФСП требует решения нескольких важных проблем. Во-первых, пространственное разделение электродов от сепарационной камеры не должно допускать проникновения пузырей, возникающих в результате электролиза воды, в зону

сепарации белков. Это достигается отделением электродов от сепарационной камеры мембранными прокладками. Во-вторых, наличие мембранной прокладки обеспечивает несмешивание потоков электродных буферов с буфером сепарационной камеры и ламинарность гидродинамических потоков в сепарационной камере. В-третьих, электродный буфер, омывающий электроды, препятствует джоулевскому нагреванию образца в камере.

Экспериментальный стенд

Исследуемый образец подавался в камеру по силиконовой трубке-капилляру, которая подключена к шприцу с образцом. Чтобы регулировать подачу образца в камеру использовали шприцевой насос Syringe Pump SN 50C6, позволяющий регулировать объемный расход (скорость подачи образца) в диапазоне 0,03–110 мкл/с. Буферный раствор для электродов подавали в отдельные камеры с электродами с помощью перистальтического насоса LongerPump YZ1515x.

Для подключения питающего напряжения использовали высоковольтный источник питания Б5-50 М, позволяющий подавать постоянное напряжение в диапазоне от 0 до 300 В. Контроль величины подаваемого напряжения и электрического тока, формирующегося в сепарационной камере, осуществляли с помощью двухканального мультиметра АМ-1109 («Актаком» Россия).

Модельная система

В качестве модельной системы для разделения использовали смесь следующих белков – сывороточного альбумин человека (Sigma) ($M_w=68-69$ кДа, pI 4,8–5,2) и гемоглобин человека (Serva) ($M_w=68$ кДа, pI 6,8–6,9). Эти белки имеют близкую молекулярную массу и достаточно сильно отличаются по своим изоэлектрическим точкам.

В качестве сепарационной среды, чтобы увеличить эффективность разделения за счет улучшения электрофоретических свойств разделяемых объектов, был использован 10 мМ буфер HEPES с pH 6,9, обладающий невысокой проводимостью и ионной силой 0,001. Для тестирования устройств использовались растворы белков САЧ и ГГ, а также их смесь в 10 мМ HEPES одинаковой концентрации 1 мг/мл. Смесь белков подавалась в сепарационную камеру устройства с различной скоростью прокачки при постоянной величине приложенного напряжения и с постоянной скоростью прокачки, при этом величина подаваемого напряжения изменялась. В результате эксперимента отбирали фракцию образца объемом 200 мкл из выводящего отверстия (рис. 2, 1⁰) и анализировали содержание белков ГГ и САЧ в отобранной фракции. Эффективность сепарационного процесса оценивали по относительной концентрации белка в растворе, которая представляла собой отношение оставшегося после сепарации в растворе белка к его содержанию в исходном растворе. Для оценки воспроизводимости результатов было проведено по три независимых эксперимента для каждой серии испытаний. Погрешность измерения определяли по методу Корнфельда, когда в качестве доверительного интервала использовались данные от минимального до максимального результата измерений, а рассчитывали погрешность как половину разности между максимальным и минимальным результатом измерения.

Регулирование концентрации гемоглобина и сывороточного альбумина человека

Контроль за концентрацией ГГ и САЧ проводился по спектрам поглощения и спектрам флуоресценции. Измерения спектров поглощения красителей проводились на спектрофотометре СФ-2000 (Россия), флуоресцентные измерения – на спектрофлуориметре «Флюорат-02-Панорама» (Россия) в кварцевых полумикрокуветах. Изменение концентрации ГГ определялось относительно

растворов сравнения (метод калибровочной кривой) по спектрам поглощения, регистрация спектров поглощения проводилась в видимой области – в области полосы Core ($\lambda_{abs} = 416$ нм) и в области Q-полос ($\lambda_{abs} = 540-580$ нм). Контроль относительного изменения концентрации альбумина выполнялся различными способами: по спектрам поглощения в УФ области ($\lambda_{abs} = 280$ нм, при обработке спектров учитывали поглощение гемоглобина), по собственной флуоресценции белка ($\lambda_{ex} = 290$ нм, $\lambda_{fl.} = 340$ нм). Спектры флуоресценции САЧ корректировались на спектральную характеристику канала возбуждения и на поглощение раствора.

Электрофоретическая подвижность белков

Измерение электрофоретических свойств белка проводилось на оборудовании Malvern Zetasizer Nano ZS (Великобритания) при длине волны 635 нм, оптической плотности раствора 0,1–0,4. В результате электрофоретических измерений была получена информация об электрофоретической подвижности белков в рабочем растворе и их ζ -потенциалах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным распределения ζ -потенциала и электрофоретической подвижности выбранных белков (рис. 3) видно, что при условиях эксперимента в среде 10 мМ HEPES pH 6,9 сывороточный альбумин человека обладает сравнительно высокой электрофоретической подвижностью, среднее значение которой достигает $-1,9$ мкм·см/В·с (движение к аноду), в то время как гемоглобин оказывается в условиях близких к изоэлектрической точке и среднее значение его электрофоретической подвижности оказывается близким к нулю. В случае электрофоретического разделения заряженные молекулы САЧ должны удаляться из сепарационной камеры, а гемоглобин, наоборот, проходит через микросепарационную камеру в коллектор для сбора образца.

В результате тестирования устройств нами были получены зависимости изменения относительной концентрации белков от условий разделения, а именно, от напряжения и скорости подачи образца в микросепарационную камеру (рис.4).

При увеличении напряжения на электродах сепарационного устройства наблюдается уменьшение концентрации обоих белков как САЧ, так и ГГ. При этом концентрация САЧ при максимальном напряжении 150 В уменьшается почти

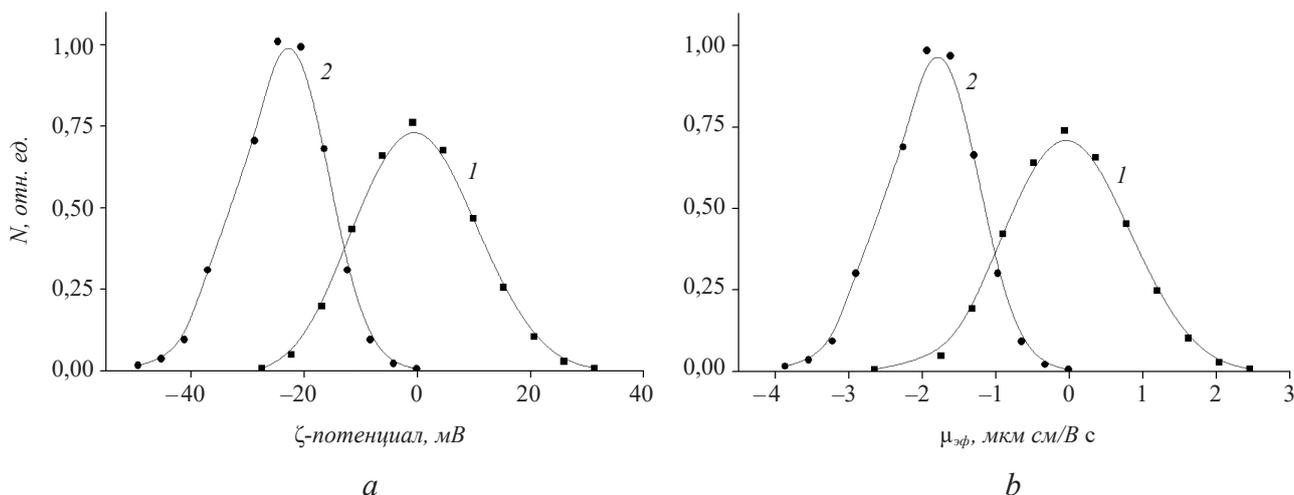


Рис. 3. Кривые распределения ζ -потенциалов (а) и распределения электрофоретической подвижности (b) белков ГГ (кривая 1) и САЧ (кривая 2) в буферном растворе 10 мМ HEPES pH 6,9. По оси ординат – нормированная к единице частота встречаемости

Fig. 3. The curves of ζ -potential (a) and electrophoretic mobility (b) distribution of Hb (curve 1) and HAS (curve 2) dissolved in 10 mM HEPES solution at pH 6,9

на 80%, в то время как уменьшение концентрации ГГ не превышает 40%. Уменьшение скорости прокачки при одинаковом напряжении приводит к увеличению количества отсепарированного белка как в случае САЧ, так и ГГ.

Способность молекулы белка к электрофорезу определяется величиной его электрофоретической

подвижности ($\mu_{эф}$), которая выражается как скорость движения заряженной молекулы (мкм/с) в электрическом поле с напряженностью $E=1$ В/см. На заряженную частицу в простейшем случае действуют две противоположно направленные силы – сила электростатического притяжения (формула (1)) и сила сопротивления

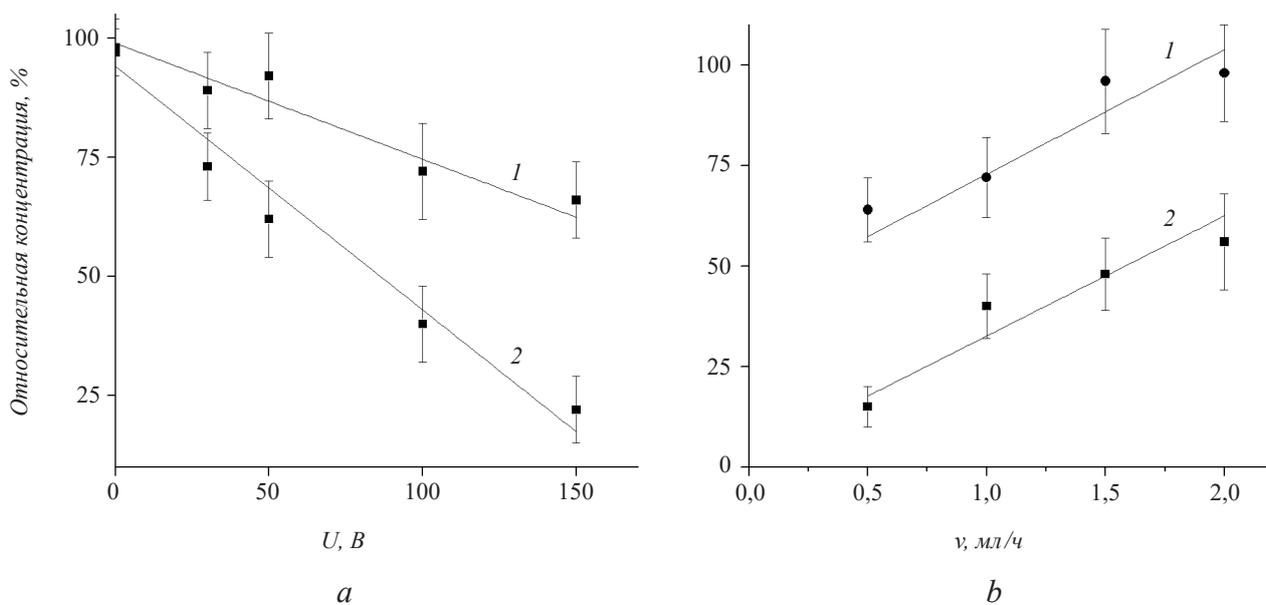


Рис. 4. Изменение относительной концентрации белков ГГ (1) и САЧ (2) в результате ЭФСП в зависимости от напряжения при постоянной скорости потока 1 мл/ч (а) и скорости подачи образца при постоянном напряжении 100 В (b)

Fig. 4. The relative concentration of Hb (1) and HAS (2) in the fractions of eluate after μ -FFE as the function of applied voltage at constant flow rate 1 mL/h (a) and of flow rate at constant voltage 100 V (b)

движению потока частицы (формула (2)).

$$F_{\text{эф}} = qE, \quad (1)$$

где q – заряд частицы, а E – напряженность электрического поля,

$$F_{\text{поток}} = 6\pi\eta r v_{\text{эф}}, \quad (2)$$

где η – вязкость среды, r – радиус частицы, $v_{\text{эф}}$ – скорость миграции частицы.

В равновесных условиях силы уравновешивают друг друга, и скорость миграции $v_{\text{эф}}$ частицы определяется выражением:

$$v_{\text{эф}} = \frac{qE}{6\pi\eta r}. \quad (3)$$

Электрофоретическая подвижность (мкм·см/В·с) определяется как отношение скорости миграции частицы к напряженности электрического поля:

$$\mu_E = \frac{v_{\text{эф}}}{E}. \quad (4)$$

Таким образом, чем выше напряженность электрического поля и электрофоретическая подвижность, тем выше будет скорость миграции частицы в постоянном электрическом поле.

Электрофоретическая подвижность белков, содержащихся в анализируемой смеси, различна, что позволяет разделить эти белки в пространстве. Электрофоретическую подвижность белка определяют следующие факторы:

- размеры (молекулярная масса), форма, электрический заряд, степень диссоциации и гидратации молекулы;
- концентрация молекул;
- свойства среды (вязкость, рН, температура, ионная сила);
- характеристика используемого электрического поля.

Эффективность сепарационного процесса может определяться как отношение количества удаленного белка (альбумина), т.е. разности исходного количества удаляемого белка и белка, не удаленного из сепарационной камеры, к его исходному количеству.

Эффективность сепарации может быть также определена экспериментально как аналогичное отношение концентраций удаляемого белка к его исходной концентрации в растворе.

Для простейшей оценки эффективности сепарационного процесса (a) важно сравнить время электрофоретической миграции заряженных частиц к одному из электродов поперек несущего

потока ($t_{\text{эф}}$) со временем нахождения этих частиц в электрическом поле до выноса их потоком ($t_{\text{поток}}$):

$$a = \frac{t_{\text{эф}}}{t_{\text{поток}}}. \quad (5)$$

Превалирование электрофоретической миграции частиц над их движением в потоке ($a < 1$), при заданных условиях, позволяет делать вывод о правильности подобранных условий для эффективной электрофоретической сепарации, т.е. теоретически за указанное время количество удаляемого белка в прошедшей фракции будет стремиться к нулю, а эффективность сепарации к единице.

В рассматриваемой ячейке для мк-ЭФСП основными параметрами, позволяющими регулировать процесс, являются подаваемое на электроды напряжение и скорость подачи образца в камеру. Варьируя эти параметры, можно подобрать условия для максимально эффективного разделения. Предварительные оценки параметров разделения проводились в предположении, что скорость электрофоретической миграции белка ($v_{\text{эф}}$), оцениваемая исходя из величины электрофоретической подвижности белка (САЧ) в нейтральной среде (рН 6,9) и ионной силой 0,001, равной 1,9 мкм·см/В·с при разности потенциалов $U=100$ В, прикладываемой на расстоянии 5 мм, составляет $\sim 0,4$ мм/с (уравнение (3)). При ширине канала сепарационной камеры $W=3$ мм и для разности потенциалов $U=100$ В время пересечения канала молекулой альбумина составит менее 10 с. Заполнение камеры объемом 7 мкл за 10 с осуществляется при средней скорости прокачки 0,7 мкл/с (2,5 мл/ч). Принимая во внимание, что при ламинарном потоке профиль скорости потока представляет собой параболу (течение Пуазейля) с максимумом в центре канала и нулевой скоростью у стенок, а максимальная скорость превосходит среднюю линейную скорость прокачки \sim в 2 раза, для эффективной сепарации скорость подачи образца следует уменьшить так же вдвое.

Таким образом, в рассматриваемой системе при подаче напряжения 100 В на электроды скорость прокачки должна составлять около 0,3 мкл/с (1 мл/ч) для осуществления эффективного разделения смеси САЧ и ГГ, т.к. среднее значение электрофоретической подвижности ГГ близка к 0 и при проведении сепарационного процесса молекулы ГГ не должны вымываться из камеры.

В проведенных экспериментах по электрофорезу белков наблюдалось уменьшение концентрации как САЧ (более чем на 80%), так и менее

существенное уменьшение концентрации ГГ. Результаты измерения ζ -потенциала показали довольно широкое распределение по величине для ГГ, что, вероятно, связано с наличием нескольких изоформ молекулы ГГ, которые могут оказаться заряженными в условиях эксперимента. Кроме того, сам буфер NEPES, являясь цвиттер-ионным буфером, обладает своей собственной подвижностью при pH 6,9. Известно [21], что в диапазоне pH 5,5–9,5 молекулы NEPES в среднем имеют небольшой отрицательный заряд от 0,99 до 0,01 и, следовательно, создают дополнительное смещение незаряженных частиц в потоке самого буфера. Эти факторы могут способствовать уменьшению концентрации ГГ при ЭФ в рассматриваемых условиях.

На эффективность разделения существенно влияет процесс экранирования электрического потенциала самими заряженными молекулами белка, оседающими на поверхности электрода или разделительном барьере. Так, например, в экспериментальных ячейках, в которых проницаемые барьеры в сепарационной камере изготавливали из пористого ацетат целлюлозы с размерами пор 0,22 мкм («Владипор») электрофоретическое разделение белков не наблюдалось. Наиболее вероятной причиной непригодности данных мембран с малым размером пор для сепарации белков может быть экранирование потенциала электрода заряженными молекулами белка, налипающими на волокна мембраны. Для мембран с большим размером пор 5 мкм (Millipore) такой эффект не наблюдался, т.к. благодаря более крупным порам молекулы белка свободно преодолевали область проницаемого барьера и выходили с потоком буфера для электродов из сепарационной камеры.

Эффекты экранирования потенциала электрода заряженными молекулами белка также подтверждаются проведенными экспериментами по низковольтному электрофорезу в свободном потоке. Низковольтный ЭФСП реализовывался на специальных ячейках, в которых электроды из нержавеющей стали были удалены на расстояние 0,1–0,2 мм друг от друга, а прикладываемое напряжение не превышало 1,5 В, чтобы избежать процесса электролиза воды, который начинается при разности потенциалов 1,8 В. Общая напряженность электрического поля в таких системах достигала 1500 В/см, что является достаточным для активного электрофоретического разделения белков. Экспериментальные результаты показали отсутствие какого-либо значимого разделения или задерживания белков в потоке. Осаждение заряженных

молекул белка на электродах приводило к экранированию приложенного рабочего потенциала между электродами, и, как следствие, к отсутствию электрофореза и сепарации заряженных белков.

Оценка величины экранирующего потенциала, создаваемого белком, может быть проведена через сравнение поверхностного заряда на электродах с зарядом белка. Поверхностную плотность заряда σ на электродах можно рассчитать, используя выражение для плоского конденсатора:

$$U = \frac{\sigma d}{\epsilon \epsilon_0}, \quad (6)$$

где U – разность потенциалов между обкладками, d – расстояние между обкладками, ϵ – диэлектрическая проницаемость среды, ϵ_0 – диэлектрическая константа $8,85 \cdot 10^{-12}$ Ф/м.

При разности потенциалов 1,5 В и расстоянии между электродами 0,1 мм поверхностная плотность заряда составит $1,0 \cdot 10^{-5}$ Кл/м². При площади поверхности каждого электрода не более 10 мм² заряд на электроде – не более $1,0 \cdot 10^{-10}$ Кл. Для сравнения, заряд одной молекулы САЧ при pH 6,9 равен $1,6 \cdot 10^{-18}$ Кл. Таким образом, для полного экранирования заряда $1,0 \cdot 10^{-10}$ Кл достаточно всего $7 \cdot 10^7$ (10^{-16} моль) молекул альбумина. В условиях эксперимента, когда проводится разделение раствора белка с концентрацией $1,5 \cdot 10^{-8}$ моль/мл, количество белка достаточное для экранирования потенциала пренебрежимо мало, по сравнению с его общим количеством в пробе.

Частичным экранированием потенциала может быть объяснено уменьшение, по сравнению с теоретической, эффективности разделения смеси белков в устройстве с максимально проницаемыми барьерами, когда использовались высокопористые мембраны с размерами пор 5 мкм.

Движение ионов, белков и любых наночастиц в электрическое поле определяется уравнениями Нернста–Планка. В данном случае электрическое поле можно считать постоянным и направленным вдоль одной оси. Поэтому изменение концентрации белков во времени ($\partial c / \partial t$) может быть описано следующим уравнением:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - v_{\text{эф}} \frac{\partial c}{\partial x}, \quad (7)$$

где D – коэффициент диффузии частицы, $v_{\text{эф}}$ – скорость миграции частицы в электрическом поле (уравнение (3)).

Однако в реальных системах необходимо учитывать множество факторов, связанных с диссоциативным равновесием слабых кислот,

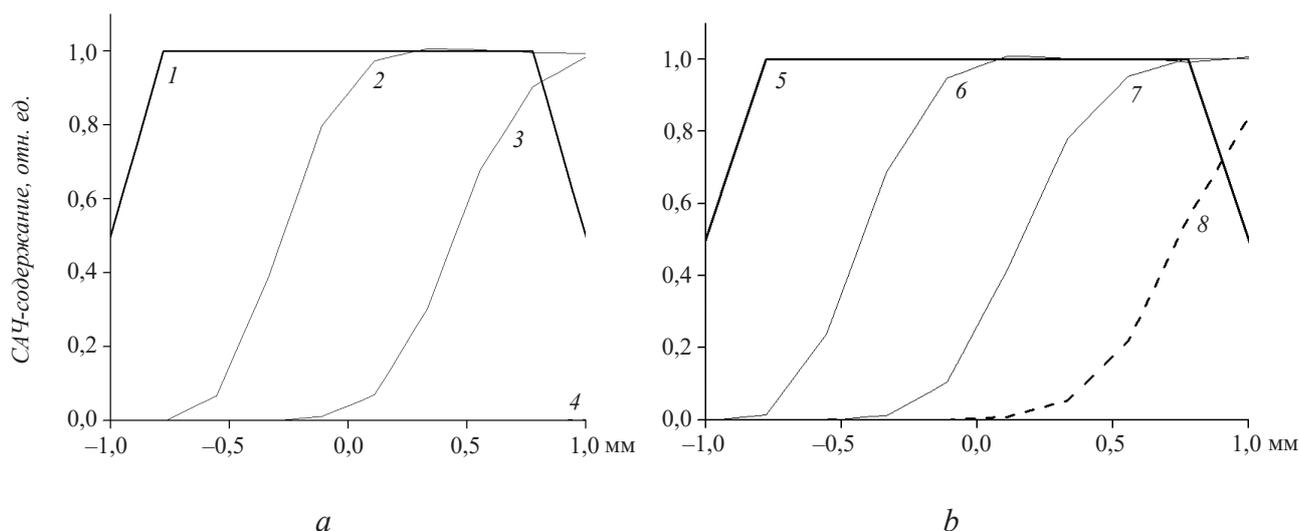


Рис. 5. Моделирование пространственного распределения концентрации альбумина в центральном канале при напряжениях 100 В (а) и 40 В (б). 1, 5 – начальный момент времени; 2 – через 2 с, 3 и 6 – через 4 с, 4 – через 6 с, 7 – через 8 с и 8 – через 12 с. Ось X – линия поперечного сечения центрального канала сепарационной камеры

Fig. 5. Numerical modeling of spatial distribution of albumin concentration in the central channel at the voltage of 100 V (a) and 40 V (b) at time $t = 0$ s (curves 1 and 5), 2 s (curve 2), 4 s (curves 3 and 6), 6 s (curve 4), 8 s (curve 7), and 12 s (curve 8). X-axis – cross-section line of the central channel of the separation camera

оснований и амфолитов, а также с реакцией автоионизации воды. Учесть все эти факторы и получить достаточно точное решение можно только при компьютерном моделировании процесса.

Расчет зависимости относительной концентрации альбумина от координаты, совпадающей с направлением напряженности электрического поля, был проведен в программе COMSOL Multiphysics для одномерной задачи. Рассматривали процесс изменения во времени концентрации альбумина и гемоглобина в центральном канале сепарационной камеры в среде амфолитного 10 мМ буфера с рН 6,9. Коэффициенты диффузии белков принимали равными $5 \cdot 10^{-12}$ м²/с, заряд молекулы сывороточного альбумина человека в нейтральной среде составляет -15 [22], гемоглобина – 0.

На рис. 5 представлено расчетное пространственное распределение относительной концентрации альбумина в центральном канале для последовательной длительности электрофореза и при приложенном напряжении 100 В и 40 В. Площадь под каждой кривой распределения концентрации в определенный момент времени будет соответствовать количеству альбумина, оставшегося в сепарационной камере. Чем меньше указанная площадь, тем выше эффективность сепарации. Очевидно, что теоретически можно получить близкую к единице эффективность сепарации при определенных значениях приложенного напряжения и времени сепарации. Так, согласно теоретической модели, при напряжении 100 В уже через 6 с содержание альбумина в сепарационной камере становится близким к 0 (рис. 5а кривая 4), концентрация гемоглобина при этом практически не изменяется.

Однако в экспериментах не удавалось получить такой эффективности разделения, из-за экранирующего потенциала, который способен существенно понижать напряженность электрического поля в сепарационной камере. Фактически необходимо признать, что разность приложенного и экранирующего потенциала будет составлять действующий потенциал, который существенно меньше приложенного потенциала (см. рис 5б). При понижении потенциала до 40 В даже после 12 с экспозиции объекта в электрическом поле часть альбумина все еще остается в канале сепарационной камеры (рис 5б, кривая 8).

К сожалению, заранее определить или предсказать действующий потенциал не представляется возможным. Фактическая эффективность сепарации всегда будет ниже теоретической. Для повышения эффективности сепарации большое значение имеет подбор материалов мембранной прокладки с минимальной адгезией к белкам и другим ионным компонентам сепарируемой суспензии.

Важным аспектом эффективного функционирования устройств для зонного электрофореза в свободном потоке является сохранение потенциала, подаваемого на электроды устройства. Экранирование потенциала заряженными молекулами может приводить к снижению эффективности сепарационного процесса или к его полному прекращению.

Предлагаемое в работе сепарационное устройство показало свою эффективность для разделения смесей белков по их электрофизическим свойствам методом зонного электрофореза в свободном потоке. Такие упрощенные устройства могут быть частью более сложных устройств, предназначенных в дальнейшем для решения аналитических задач, связанных с выделением и идентификацией целевого анализа.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 16-08-000704.

ЛИТЕРАТУРА

- Hoffmann P., Ji H., Moritz R.L. Continuous free-flow electrophoresis separation of cytosolic proteins from the human colon carcinoma cell line LIM 1215: a non-two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis strategy. *Proteomics*, 2001, 1, 807–818. doi: 10.1002/1615-9861(200107)1:7<807::AID-PROT807>3.0.CO;2-6
- Maida R., Krieger J., Gebauer T. Three pheromone-binding proteins in olfactory sensilla of the two silkworm species *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi*. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, 2899–2908. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01303.x
- Wang Y., Hancock W.S., Weber G. Free flow electrophoresis coupled with liquid chromatography–mass spectrometry for a proteomic study of human cell line. *J. Chromatogr.* 2004, 1053(A), 269–278. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.164
- Kessler R., Manz H.J., Székely G. Use of free-flow electrophoresis for the purification of components separated by ion-pair chromatography. *J. Chromatogr.* 1989, 469, 444–447. doi: 10.1016/S0021-9673(01)96485-4
- Hansen E., Hannig K. Antigen-Specific Electrophoretic Cell Separation (ASECS): isolation of human T and B lymphocyte subpopulations by free-flow electrophoresis after reaction with antibodies. *J. Immunol. Methods*, 1982, 51, 197–208.
- Eubel H., Lee C.P., Kuo J. Technical Advance: free-flow electrophoresis for purification of plant mitochondria by surface charge. *Plant J.* 2007, 52, 583–594. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03253.x
- Zhang C., Manz A. High-speed free-flow electrophoresis on chip. *Anal. Chem.*, 2003, 75, 5759–5766. doi: 10.1021/ac0345190
- Nissum M., Shehab M. A. Functional and Complementary Phosphorylation State Attributes of Human Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-1 (IGFBP-1) Isoforms Resolved by Free Flow Electrophoresis. *Mol. Cell. Proteomics*, 2009, 8, 1424–1435. doi: 10.1074/mcp.M800571-MCP200
- Islinger M., Li K. W., Maarten Loos M., Liebler S., Angermuller S. Peroxisomes from the heavy mitochondrial fraction: isolation by zonal free flow electrophoresis and quantitative mass spectrometrical characterization. *J. Proteome Res.*, 2010, 9, 113–124. doi: 10.1021/pr9004663
- Ouvry-Patat S. A., Torres M. P., Quek H. H. Free-flow electrophoresis for top-down proteomics by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Proteomics*, 2008, 8, 2798–2808. doi: 10.1002/pmic.200800079
- Moritz R., Ji H., Schutz F. A Proteome strategy for fractionating proteins and peptides using continuous free-flow electrophoresis coupled off-line to reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 2004, 76, 4811–4824. doi: 10.1021/ac0497171
- Новикова А.Е., Ямпольская Т.А., Гусятинер М.М. Использование капиллярного электрофореза для определения N-ацетилглутамата, аргининсукцината и карбамилфосфата при измерении активности ферментов пути биосинтеза аргинина. *Биотехнология*. 2004. № 3. С. 78–86. Перевод
- Malmstrom J., Lee H., Nesvizhskii A., Shteynberg D.J. Advances in proteomic workflows for systems biology. *Proteome Res.*, 2006, 5, 2241–2249. doi: 10.1016/j.copbio.2007.07.005
- Raymond D.E., Manz A., Widmer H.M. Continuous sample pretreatment using a Free-Flow electrophoresis device integrated onto a silicon chip. *Anal. Chem.*, 1994, 66, 2858–2865. doi: 10.1021/ac00090a011
- Fonslow B.R., Barocas V.H., Bowser M.T. Using channel depth to isolate and control flow in a micro Free-Flow electrophoresis device. *Anal. Chem.*, 2006, 78, P. 5369–5374. doi: 10.1021/ac060290n
- Geng J., Shao J., Yang J. Reassemblable quasi-chip free-flow electrophoresis with simple heating dispersion for rapid micropreparation of trypsin in crude porcine pancreatin. *Electrophoresis*, 2011, 32, 3248–3256. doi: 10.1002/elps.201100358
- Kasicka V. From micro to macro: conversion of capillary electrophoretic separations of biomolecules and bioparticles to preparative free-flow electrophoresis scale. *Electrophoresis*, 2009, 30, 40–52. doi: 10.1002/elps.200900156
- Raymond D., Manz A., Widmer H.M. Continuous separation of high molecular weight compounds using a microliter volume free-flow electrophoresis microstructure. *Anal. Chem.*, 1996, 68, 2515–2522. doi: 10.1021/ac950766v

19. Kobayashi H., Shimamura K., Akaida T. Free-flow electrophoresis in a microfabricated chamber with a micro-module fraction separator: continuous separation of proteins. *J. Chromatogr.*, 2003, 990 (A), 169–178. doi: 10.1016/S0021-9673(02)01964-7
20. Fonslow B.R., Bowser M.T. Free-flow electrophoresis on an anodic bonded glass microchip. *Anal. Chem.*, 2005, 77, 5706–5710. doi: 10.1021/ac050766n
21. Medhat A. Al-Ghobashy. Electrophoretic behavior of charge regulated zwitter ionic buffers in covalently and dynamically coated fused silica capillaries. *Bulletin Faculty Pharmacy, Cairo University*, 2014, 52, 71–78. doi: 10.1016/j.bfopcu.2014.03.001
22. Fogh-Andersen N., Bjerrum P.J., Siggaard-Andersen O. Ionic binding, net charge, and Donnan effect of human serum albumin as a function of pH. *Clinical Chemistry*, 1993, 39 (1) 48–52.

Microseparation device for the separation of target protein by free flow electrophoresis

V.A. LEONOVICH¹, O.N. SOROKINA^{1,*}, M.A. KLIMOV¹, P.G. PRONKIN¹, I.G. PLASHCHINA¹, S.N. PODOYNITSYN¹

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy Sciences, Moscow 119334*

**e-mail*: alsiona@gmail.com

Received May 23, 2018

Accepted August 29, 2018

Abstract—A simplified separation device design is proposed, and a separation technique for separation of the target protein from their mixture by free-flow electrophoresis. The effectiveness of the device was demonstrated theoretically and experimentally on the example of separation of hemoglobin and human serum albumin from their mixture. The proposed separating device and separation technique are characterized by ease of use and good performance (1 mL/hour). The effect of the surface potential shielding of electrodes on the efficiency of separation of protein mixtures is shown. A computer simulation of the electrophoretic process was carried out within the framework of the Nernst-Planck theory for the separated proteins.

Key words: free flow electrophoresis, zone electrophoresis, electric potential.

Acknowledgements—The work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project № 16-08-000704).

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-5-67-76