

МИКРОСЕПАРАЦИОННАЯ ЯЧЕЙКА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЦЕЛЕВОГО БЕЛКА МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА В СВОБОДНОМ ПОТОКЕ

Леонович В.А., Сорокина О.Н., Климов М.А., Пронкин П.Г., Плащина И.Г.,
Подойницын С.Н.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, РФ; e-mail: alsiona@gmail.com

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Предложена конструкция упрощенного сепарационного устройства и методики для выделения целевого белка из смеси методом зонного электрофореза в свободном потоке. Эффективность устройства была продемонстрирована теоретически и экспериментально на примере сепарации белков гемоглобина и сывороточного альбумина человека. Предложенный метод сепарации отличается простотой использования и хорошей производительностью.

Ключевые слова: микросепарационная ячейка, электрофорез.

ВВЕДЕНИЕ

Выделение целевого компонента является важным этапом биологического анализа, для реализации которого требуются простые, надежные и недорогие методы разделения. Одним из методов фракционирования и разделения анализируемых проб является электрофорез в свободном потоке (ЭФСП). В последние десятилетия принципы ЭФСП нашли свое применение при разделении таких биологических систем, как смеси белков [1-3], ионные пары отдельных компонентов [4], клетки [5], органеллы [6], протеомы [7-11].

При реализации ЭФСП поток анализируемой смеси, содержащей заряженные частицы, непрерывно поступает в сепарационную камеру в виде тонкого ламинарного течения, и разделяется под действием внешнего электрического поля, перпендикулярного основному потоку, на отдельные компоненты в соответствии с их электрофоретическими свойствами. ЭФСП обладает уникальными особенностями и преимуществами по сравнению с традиционными техниками сепарирования, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография или капиллярный электрофорез. К достоинствам ЭФСП можно отнести: высокую степень выхода исходного образца [12, 13], хорошее сохранение биологической активности [12-14], непрерывное разделение, низкую стоимость [13-15].

В зависимости от размеров сепарационной камеры ЭФСП можно разделить на: ЭФСП макро- и микрообъемов [13]. Макро-ЭФСП используется как этап препаративных технологий благодаря высокой пропускной способности и непрерывности сепарирования [13-16]. μ -ЭФСП применяется для решения аналитических задач по разделению проб микрообъема и определению их состава. μ -ЭФСП может использоваться при создании устройств «лаборатории на чипе» позволяющих наблюдать за химическими процессами в режиме реального времени [17]. На сегодняшний день развитие μ -ЭФСП сосредоточено на разработке и совершенствовании устройства и методики сепарации.

В зависимости от принципов, лежащих в основе фракционирования можно выделить следующие типы μ -ЭФСП: зональный (зонный) электрофорез (ЗЭФ), изоэлектрическое фокусирование, изотахофорез. Наиболее простая реализация устройства μ -ЭФСП характерна для ЗЭФ (рис. 1).

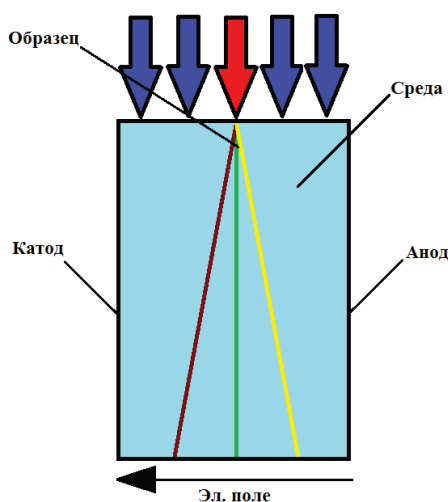


Рисунок 1. Простейшая схема организации электрофореза в свободном потоке [18]

Зональный электрофорез. 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 используется при разделении образцов биомакромолекул [18-20] в устройствах μ -ЭФС. Однако разрешающая способность такого подхода не достаточно высока и позволяет разделять белки на фракции с сильно отличающимися значениями рН. При этом буфер, используемый в таких системах сепарации, должен иметь низкую ионную силу (например, Трис-боратный буфер). Разделение белков на фракции требует достаточно большой площади, для распределения потоков из-за чего объем камеры составляет не менее 30-50 мкл. Напряжение электрического поля, подаваемое на электроды, в таких системах должно составлять не менее 200-300 В для эффективного разделения из-за достаточного удаления электродов друг относительно друга. Из-за чего электроды необходимо помещать в отдельные камеры, соединенные системой каналов с основной камерой разделения, что бы избежать влияния электролиза воды. В результате изготовление камер пригодных для μ -ЭФС становится сложной и дорогостоящей технической задачей, для решения которой требуется специальное оборудование.

Применение ЗЭФ для разделения белковых фракций более актуально для решения задач по выделению одной фракции частиц, не имеющих заряда. В этом случае кислотность среды (рН) подбирается таким образом, что бы ее величина совпадала с изоэлектрической точкой частиц, выделяемой фракции. В результате частицы, имеющие заряд, отклоняются от основного потока и остаются в сепарационной камере, а незаряженные частицы собирают в коллекторе через выходное отверстие. Такие принципы разделения могут применяться для создания микрофлюидных аналитических устройств по типу «лаборатории на чипе», где важно выделить или очистить от балластных белков один целевой аналит.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ячейка μ -ЭФС. Реализация устройств для высоковольтного μ -ЭФС требует решения важных проблем, таких как пространственное разделение электродов от сепарационной камеры, что бы не допустить проникновения пузырей, возникающих в результате электролиза воды; джоулевское нагревание образца в камере в результате воздействия высоковольтного электрического тока; смешивание потоков электродных буферов с буфером сепарационной камеры; неоднородность гидродинамических потоков при разделении на несколько фракций и др. На рисунке 2 представлена 3D модель устройства для высоковольтного однокомпонентного μ -ЭФС, в котором решены данные проблемы. Была предложена простая конструкция камеры, изготовление которой проводится с помощью простой механообработки компонентов устройства, при этом объем сепарационной камеры не превышает 7 мкл.

В качестве материала для изготовления корпуса использовался листовый полиметилметакрилат (оргстекло) толщиной 5 мм. Каналы для электродов формируют фрезеровкой, отверстия для ввода и вывода буфера и пробы сверлением. В качестве электродов использовали анодонерастворимую проволоку (Pt 99,99).

На корпусе сепарационного устройства (рис. 2) располагается подвод для разделяемой суспензии (1), соединенный с рабочей зоной сепаратора (плоская камера размерами $20 \times 3 \times 0.12$ мм), которая оканчивается выводным отверстием (1^0). Заряженные белки через полупроницаемые мембраны (2^+ и 2^-) отводятся из сепарационной камеры в камеры для электродов.

Проницаемые барьеры в сепарационной камере изготавливали из пористого ацетат целлюлозы с характеристическими параметрами пористости 80 % и размерами пор 5 мкм («Millepore») и 0,22 мкм («Владипор»).

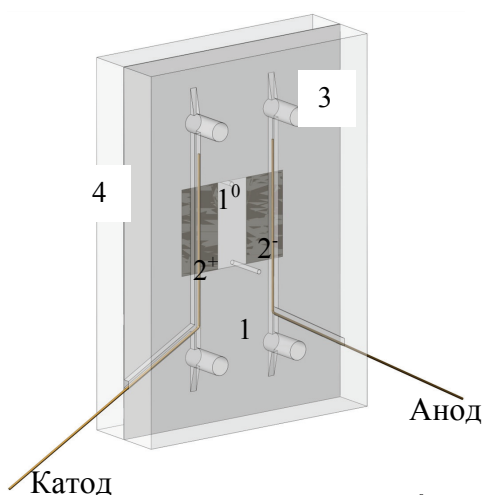


Рисунок 2. 3D модель устройства μ -ЭФС в собранном виде, где $1-1^0$ – вводной и выводной каналы, соответственно, 2^+-2^- – полупроницаемые мембраны, отделяющие камеру катода и анода соответственно, 3 – диэлектрическая прокладка, 4 – пластины корпуса

Для прокачки буферного раствора в электродных камерах были сделаны отдельные вводные и выводные отверстия и каналы. Скорость прокачки буферного раствора в электродных камерах многократно превосходила скорость прокачки образца в сепарационной камере.

Электрически нейтральные белки выводятся из устройства для дальнейшего детектирования и анализа. Высокое напряжение подводится к аноду и катоду, находящимися в отдельных камерах, отделенных от сепарационной камеры с помощью полупроницаемых мембран (2^+ и 2^-). Сепарационная камера формируется с помощью диэлектрической прокладки (3) – полиэтилен низкого давления (Parafilm). Толщина прокладки около 120 – 130 мкм.

Для подключения питающего напряжения используется 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 альбумина человека (САЧ) ($M_w = 68-69$ кДа, pI 4.8-5.2, Sigma) и гемоглобин человека (ГГ) ($M_w = 68$ кДа, pI 6,8-6,9, Serva, 24450). Эти белки имеют близкую молекулярную массу и достаточно сильно отличаются по своим изоэлектрическим точкам.

В качестве сепарационной среды, что бы 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 в 10 мМ HEPES одинаковой концентрации 1мг/мл.

Контроль концентрации 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 полумикрокуветках. 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.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения эксперимента нам необходимо было знать электрофоретические свойства белков ГГ и САЧ в буферном растворе HEPES. На рисунке 3 представлены кривые распределения ζ -потенциала и электрофоретической подвижности выбранных белков, соответственно.

Из данных по ζ -потенциалу и электрофоретической подвижности выбранных белков 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 0.

Таким образом, 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 концентрации белков САЧ и ГГ от напряжения на электродах сепарационного устройства (рис. 4).

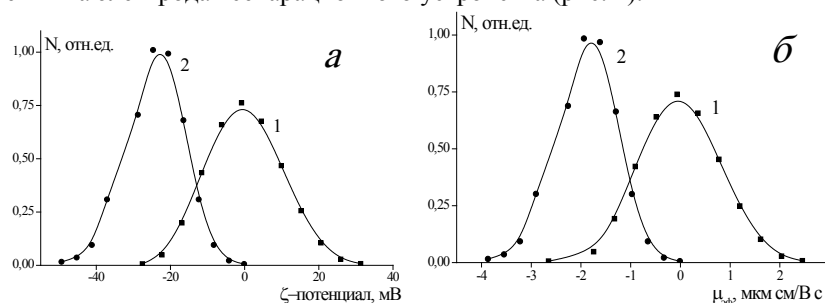


Рисунок 3. Кривые распределения дзета-потенциалов (а) и распределения электрофоретической подвижности (б) белков ГГ (кривая 1) и САЧ (кривая 2) в буферном растворе 10 мМ HEPES pH 6,9

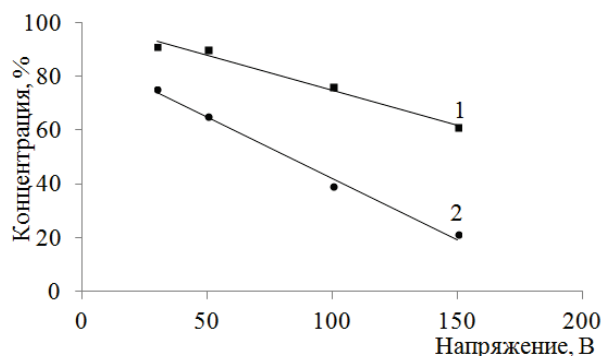


Рисунок 4. Изменение концентрации белков, получаемое в результате ЭФСП ГГ (1) и САЧ (2) от напряжения при постоянной скорости потока 1 мл/ч

Из рис. 4 видно, что 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 на 80 %, в то время как уменьшение концентрации ГГ не превышает 40 %.

Предлагаемое в работе сепарационное устройство показывает 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.

Список литературы / References:

- 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, vol. 1, pp. 807-818.
- 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, vol. 267, pp. 2899-2908.
- Wang Y., Hancock W.S., Weber G. Free flow electrophoresis coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for a proteomic study of a human cell line. *J. Chromatogr.*, 2004, vol. 1053(A), pp. 269-278.
- 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, vol. 469, pp. 444-447.
- 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, vol. 51, pp. 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, vol. 52, pp. 583-594.
- Zhang C., Manz A. High-speed free-flow electrophoresis on chip. *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75, pp. 5759-5766.
- Nissim 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, vol. 8, pp. 1424-1435.
- 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, vol. 9, pp. 113-124.
- 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, vol. 8, pp. 2798-2808.
- 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, vol. 76, pp. 4811-4824.
- Malmstrom J., Lee H., Nesvizhskii A., Shteynberg D.J. Advances in proteomic workflows for systems biology. *Proteome Res.*, 2006, vol. 5, pp. 2241-2249.
- 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, vol. 66, pp. 2858-2865.
- 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, vol. 78, pp. 5369-5374.
- 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, vol. 32, pp. 3248-3256.

16. Kasička V. From micro to macro: conversion of capillary electrophoretic separations of biomolecules and bioparticles to preparative free-flow electrophoresis scale. *Electrophoresis*, 2009, vol. 30, pp. 40-52.
17. 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, vol. 68, pp. 2515-2522.
18. Kwon J.S., Bowser M.T. Micro Free-Flow Electrophoresis. *Encyclopedia of Nanotechnology*, 2015, vol. 28, pp. 1-15.
19. Kobayashi H., Shimamura K., Akaida T. Free-flow electrophoresis in a microfabricated chamber with a micromodule fraction separator: continuous separation of proteins. *J. Chromatogr.*, 2003, vol. 990 (A), pp. 169-178.
20. Zhang C.-X., Manz A. High-speed free-flow electrophoresis on chip. *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75, pp. 5759-5766.
21. Fonslow B.R., Bowser M.T. Free-flow electrophoresis on an anodic bonded glass microchip. *Anal. Chem.*, 2005, vol. 77, pp. 5706-5710.
22. Medhat A. Al-Ghobashy Electrophoretic behavior of charge regulated zwitter ionic buffers in covalently and dynamically coated fused silica capillaries. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 2014, vol. 52, pp. 71-78.

MICROSEPARATION CELL FOR FREE-FLOW ELECTROPHORESIS OF THE TARGET PROTEIN

Leonovich V.A., Sorokina O.N., Klimov M.A., Pronkin P.G., Plashchina I.G.,
Podoyntsyn S.N.

N.M. Emanuel Institute for Biochemical Physics RAS
Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: alsiona@gmail.com

Abstract. The construction of a simplified separation device and a method for isolating the target protein from a mixture of proteins by a free-flow electrophoresis method is proposed. The effectiveness of the device was theoretically and experimentally demonstrated on the example of separation of hemoglobin protein and human serum albumin. This method of separation is characterized by ease of use and good productivity.

Key words: *microsection cell, electrophoresis.*