

УДК 543.545.088.8

ПРЕПАРАТИВНАЯ СЕКЦИОННАЯ КОЛОНКА ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

В. Л. ВОЛЖИН, Д. Г. СТУРУА, Б. П. ПЛЕШКОВ

(Кафедра агрономической и биологической химии)

Выделение и очистка биополимеров электрофоретическим способом — эффективный метод, позволяющий избежать ряда трудоемких операций, а в ряде случаев — единственно возможный. Однако до настоящего времени наша промышленность не производит таких элюирующих устройств, позволяющих получать препараты по полностью автоматизированной схеме. Импортные приборы (например, «Унифор» фирмы LKB, Швеция) относятся к микропрепаративным. Полезная площадь колонок у них менее 10 см^2 , и поэтому условная нагрузка по белку меньше 100 мг. Ранее мы отмечали [1, 3], что такое положение определяется использованием в конструкциях проточных кювет несовершенных схем элюирования.

Еще в 1968 г. одним из авторов был предложен способ препаративного электрофореза, по которому отвод фракций в потоке буфера осуществляется прерывисто в сочетании с прерывистым режимом электрофореза (время отключения тока составляет менее 5% от общего) [2]. Выпуск порции элюата из подмембранной части проточной кюветы происходит синхронно с отключением тока или с небольшим опережением. В результате в фазу элюирования (1—2 с) на заряженные макроионы перестает действовать сила, притягивающая их к мембране электродного мостика. Такой эффект обеспечивает блок прерывистого режима (БПР).

Достаточно простой и надежный в работе, БПР может быть создан на базе электродвигателя типа СД, имеющего скорость вращения оси 2 об/мин.

Схема такого типа элюирования с осевым расположением отборника элюата позволяет увеличить количество исследуемого материала примерно на порядок. Это определяется прежде всего тем, что степень разбавления препаратов может быть значительной. Последнее весьма существенно при низком удельном содержании компонентов в экстрактах.

Дальнейшее увеличение полезной площади носителя в электрофоретических колонках или блоках различной конфигурации для устройств с проточной кюветой нам представляется возможным по схеме, в которой есть делитель потока элюата, выравнивающий путь макроионов по проточной кювете [4].

Разработанная нами конструкция, предлагаемая вниманию практиков и конструкторских организаций, дает возможность использовать разные объемы наносимого на колонку экстракта, эффективно отводить тепло из носителя и создавать оптимальный режим электрофореза. Меняющаяся по площади колонки, она расчленена на 4 секции. Основные элементы прибора — секционная колонка, БПР — могут быть изготовлены в лабораторных условиях. Для обеспечения

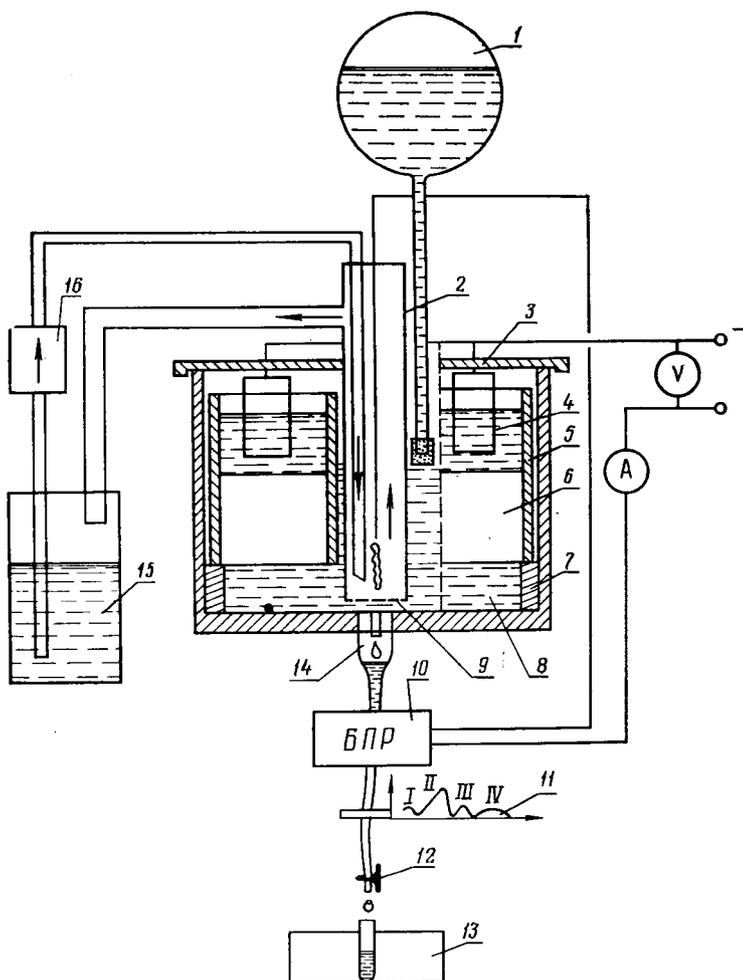


Рис. 1. Схема прибора для препаративного электрофореза в секционной колонке (обозначения см. в тексте).

автономной работы их можно дополнить проточным спектрофотометром и коллектором сбора фракций.

Размеры секционной колонки соответствуют полезной площади сечения носителя 50—60 см², что позволит эффективно работать с выпрямителями типа УИП. Скорость процесса оптимизируется системой, поддерживающей ток в зависимости от температуры носителя или элюата под электродным мостиком.

Ниже мы остановимся на конструкции основных элементов прибора и особенностях их работы.

Электрофоретическое фракционирование осуществляется в секционной колонке (рис. 1, 5), нижнюю часть которой заполняет носитель 6. Высота носителя (например, ПАГ) выбирается в зависимости от цели разделения и практически может варьировать от 20 до 60 мм. В случае, когда механическая прочность носителя низкая, секции снизу необходимо затянуть инертным фильтрующим материалом (капрон и т. п.).

Секции колонки 5 устанавливаются в электрофоретическую ванну 8 (может быть изготовлена из полимерной кружки диаметром около 110 мм) на опорное кольцо 7. Высота уровня элюирующего буфера в ванне 8 должна составлять около половины высоты колонки. В этих условиях элюирующий буфер создает давление на нижнюю кромку носителя несколько меньшее, чем столб буфера в секциях. Для плавного поступления запаса буфера из банки 1 конец питающей трубки может быть заключен в микропористую фильтрующую рубашку.

На корпус электрофоретической ванны 8 устанавливается крышка 3, в которую монтируются по ее оси трубки электродного мостика 2 и электродов 4 серповидной формы. Электродный мостик 2 ограничен целлофановой мембраной 9, закрепляющейся резиновым кольцом.

В дно ванны 8 по ее оси установлен отборник элюата с капельницей 14. Объем воздуха под капельницей в процессе запол-

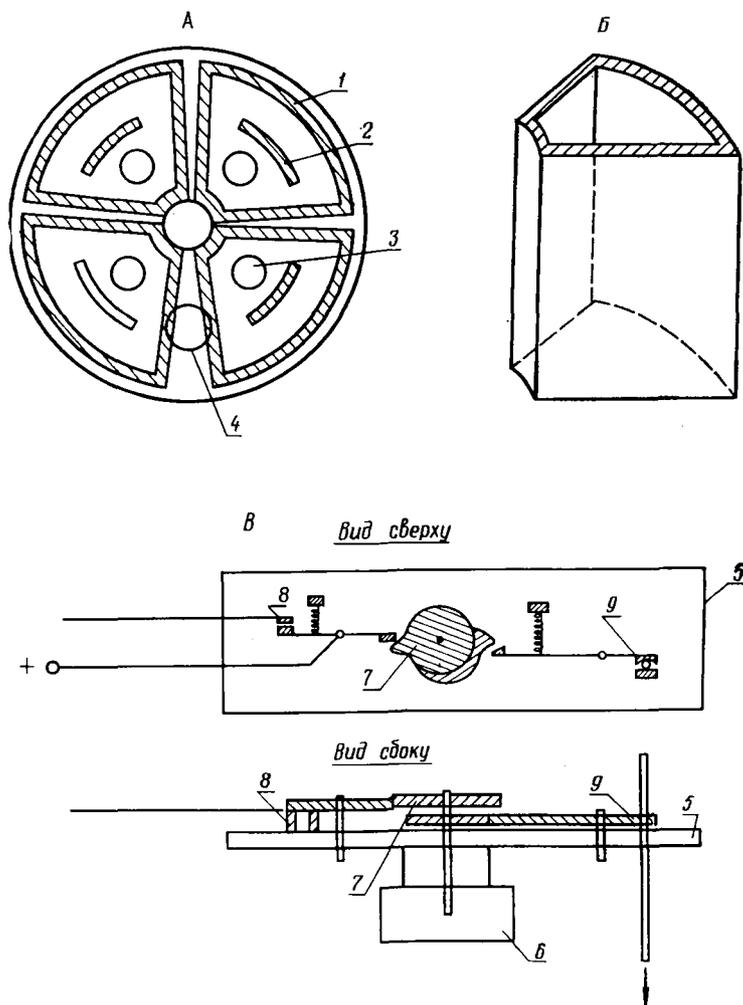


Рис. 2. Расположение секций в колонке (А); отдельная секция (Б) и блок прерывистого режима (В).

1 — секция колонки; 2 — электрод; 3 — заправочное отверстие; 4 — отверстие для трубки банки буфера; 5 — монтажная пластина; 6 — двигатель; 7 — кулачки; 8 — контакт электрода; 9 — зажим ниппельной резинки.

нения проточной кюветы должен быть достаточным для скапывания, т. е. быть больше объема капли в 2—3 раза. Поток элюата от отборника 14 поступает по эластичной трубке (нипельная резинка) через БПР 10 в проточный спектрофотометр 11 или непосредственно в приемную пробирку фракционного коллектора 13. Винтовым зажимом 12 осуществляется плавная регулировка скорости элюирования.

Важным элементом работы являются активный отвод тепла и промывка буфером электродного мостика 2. Из емкости 15 на 3—5 л свежий и охлажденный буфер поступает в мостик самотеком или подается насосом 16 со скоростью 5 л/ч. В процессе работы иногда возникает необходимость обновлять часть запаса буфера или весь запас из-за большего сдвига рН, чем это допустимо в конкретных параметрах электрофореза.

На рис. 2 показаны расположение электрофоретических секций (вид сверху через крышку) А, отдельная секция колонки Б и элементы блока прерывистого режима В (вид сверху и сбоку).

Под крышку подклеиваются серповидные полоски органического стекла 2, на которые натягивается электродная проволока. Концы проволоки от четырех секций объединяются на одной клемме. Для заправки секций пробой в крышке имеются четыре отверстия 3.

Отверстия для трубки банки буфера 4 (рис. 1, 1) могут быть ближе к оси крышки или к периферии. Трубочка банки вставляется между секциями или в специально сделанный зазор.

Отдельная секция колонки Б изготовлена сгибом нагретой заготовки из органического стекла по шаблону (может быть склеена из отдельных стенок). Примерный диа-

метр колонки 100 мм, трубки электродного мостика — 15—20 мм.

Синтез носителя в отдельных секциях должен выполняться одновременно и в одинаковых условиях. Для этого их следует установить вместе в химический стакан, на дно которого кладется кружок пленки и заливается раствор для синтеза носителя. Такой прием обеспечивает одинаковую высоту носителя во всех секциях.

Элементы блока прерывистого режима В монтируются на пластине органического стекла 1. Автоматический режим поддерживается вращением двигателя 2 типа СД (127 или 220 В), на оси которого имеются

два кулачка 3, расположенные на разной высоте. Верхний отжимает контакт питания электрода 4, нижний — зажим ниппельной резинки 5. Передача усилия на контакт и зажим выполнена в виде рычагов.

Конструкции БПР могут быть различными, например с использованием реле времени. В процессе работы нельзя допускать попадания влаги на контакты электрода, иначе они подгорают. При работе с большими напряжениями (свыше 1 000 В) следует ввести в схему магнитный пускатель, срабатывание которого происходит при постоянном напряжении от сети, а разрыв высоковольтных электродов на его клеммах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волжин В. Л. Препаративный колоночный электрофорез с осевым элюированием в прерывистом режиме. — Изв. ТСХА, вып. 3, 1969, с. 125—130. — 2. Волжин В. Л. Способ препаративного электрофореза. Авт. свид. № 260953, 1969. — 3. Волжин В. Л., Плеш-

ко А. С., Аистова Л. В. Устройство для препаративного электрофореза. — Изв. ТСХА, вып. 4, 1974, с. 102—107. — 4. Волжин В. Л., Плешков Б. П., Плешков А. С. Устройство для препаративного электрофореза. Авт. свид. № 544898, 1976.

Статья поступила 16 ноября 1978 г.

SUMMARY

Because the effective area of the existing preparative devices for electrophoresis is small ($<10 \text{ cm}^2$), it is impossible to use this efficient method of fractionation and purification of biopolymers more widely. We present the description of constructive elements of the device and of the sectional column with effective area of $50\text{--}60 \text{ cm}^2$. Its utilization allows to better lead the heat away from the carrier, to make the process optimal, and to increase the amount of the investigated preparation.