



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 2 \* № 7 \* 1976

## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.25

### ИЗОТАХОФОРЕЗ КАК МЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Стронгин А. Я., Левин Е. Д., Степанов В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

В обзоре рассмотрены теоретические и практические аспекты изотахофоретического разделения биополимеров. Обсуждаются препаративные и аналитические модификации этого метода. Охарактеризованы свойства амфотерных амфолитов — «амфолинов», применяемых при изотахофорезе в качестве «разделяющих» ионов. Приведены примеры использования этого метода для разделения и исследования белков и лептидов.

В последние годы достигнут значительный прогресс в разработке теории и практическом использовании одного из перспективных методов разделения и исследования биополимеров — изотахофореза [1—10]. Этот метод достаточно прост, обладает высокой чувствительностью, и с его помощью можно разделять большие количества образцов [11]. В частности, препаративным изотахофорезом удалось разделить около 1 г сывороточных белков и несколько граммов гемоглобина и получить при этом некоторые компоненты в гомогенном виде [12]. Причем показано, что даже при большой нагрузке по разрешающей силе препаративный изотахофорез не уступает такому широко используемому методу разделения, как изоэлектрофокусирование в градиенте pH [13].

Изотахофорез нашел применение и в космических исследованиях: с его помощью наряду с другими способами фракционирования получали чистые образцы биополимеров в условиях невесомости. Подобные эксперименты проводились, например, на американской космической станции «Skylab» [14].

При описании изотахофоретических процессов обычно пользуются следующими терминами, являющимися, по сути дела, синонимами: steady-state-stacking [15, 16], transphoresis [14, 17], displacement electrophoresis [18], cons electrophoresis [19, 20] и, наконец, isotachophoresis — изотахофорез [2]. Наиболее удачен и наиболее распространен последний термин, означающий «электрофорез при равной скорости» (миграция ионов).

#### Принцип метода

Изотахофорез — электрофоретический метод, при котором заряженные ионы сначала разделяются в соответствии с величинами их заряда и подвижности, а затем двигаются в электрическом поле с одинаковыми и постоянными в данном опыте скоростями. Характер движения ионов во время изотахофоретического разделения описывается уравнением

Кольрауша [21], которое в простейшем варианте имеет вид

$$\frac{C_A}{C_B} = \frac{U_A}{(U_A + U_R)} \cdot \frac{(U_B + U_R)}{U_B} \cdot \frac{L_A}{L_B},$$

где  $U_A$  и  $U_B$  — подвижность ионов  $A^-$  и  $B^-$  ( $\text{см}^2/\text{В}\cdot\text{с}$ );  $C_A$  и  $C_B$  — концентрация ионов  $A^-$  и  $B^-$ ;  $L_A$  и  $L_B$  — величина электрического заряда ионов  $A^-$  и  $B^-$ . В таком виде уравнение отражает процессы, протекающие на движущейся к аноду границе, разделяющей растворы двух солей  $A^-R^+$  и  $B^-R^+$ , имеющих общий противоион  $R^+$ . Физический смысл уравнения Кольрауша состоит в том, что изменение концентрации одного из ионов в каком-либо участке трубки, в которой происходит изотахофоретическая миграция ионов, приводит к такому изменению концентрации других ионов, что сумма отношений  $C/U$  для всех ионов остается постоянной. Поскольку подвижность ионов  $U$  определяется отношением скорости миграции иона при свободном электрофорезе  $V$  к напряженности поля  $E$  ( $U = V/E$ ), уравнение Кольрауша описывает соотношение между напряженностью электрического поля, концентрацией иона и его подвижностью.

При проведении эксперимента образец, подлежащий исследованию, вводят между ведущим электролитом (содержащим ведущий ион с подвижностью большей, чем подвижность ионов образца) и замыкающим электролитом (содержащим замыкающий ион с подвижностью меньшей, чем подвижность ионов образца) [22]. Ионы образца, замыкающего и ведущего электролитов должны иметь заряд одного и того же знака (в данном случае все эти ионы имеют отрицательный заряд). Для создания необходимого значения рН и буферной емкости растворы образца, ведущего и замыкающего электролитов должны содержать одинаковый противоион, обладающий буферными свойствами (рис. 1, а).

После приложения к системе разности потенциалов все отрицательно заряженные ионы сначала движутся со-скоростями, определяемыми напряженностью поля и величинами заряда и подвижности. Ведущие ионы, обладающие высокой подвижностью, с большой скоростью движутся к аноду. По мере ухода ведущих ионов снижается общая концентрация ионов в системе и в соответствии с уменьшением электропроводности возрастает напряженность поля. Вслед за ведущими ионами к аноду мигрируют ионы образца. Напряженность поля в зоне образца также резко повышается, что приводит к увеличению скорости их миграции и обеспечивает равенство скоростей миграции ионов образца и ведущих ионов. Тем не менее «проникнуть» в зону ведущих ионов ионы образца не могут. Если же какая-то часть ионов образца попадет в зону ведущего иона (характеризующуюся низкой напряженностью поля из-за присутствия большого количества ведущих ионов с высокой подвижностью), то скорость их миграции резко снизится, они отстанут от движущихся к аноду ведущих ионов и окажутся в «своей» зоне. Если же ведущие ионы попадут в зону ионов образца, то за счет высокой напряженности поля в этой зоне скорость их движения резко увеличится, и они будут «выброшены» обратно в свою зону, где скорость их движения опять нормализуется. Таким образом, образуется «самостабилизирующаяся», идущая к аноду граница (фронт), по одну сторону которой находятся ведущие ионы, а по другую — ионы образца. Зона ведущих ионов характеризуется большой концентрацией ионов с высокой подвижностью и соответственно низкой напряженностью электрического поля. Из-за низкой напряженности поля выделение тепла в этой зоне будет незначительным, и она будет характеризоваться невысокой температурой. Эта зона обладает наиболее низким значением рН. Зона образца характеризуется меньшей концентрацией ионов со значительно меньшей, чем у ведущих ионов, подвижностью, но большей напряженностью поля и более высоким значением рН и, вследствие этого, более сильным выделением тепла.

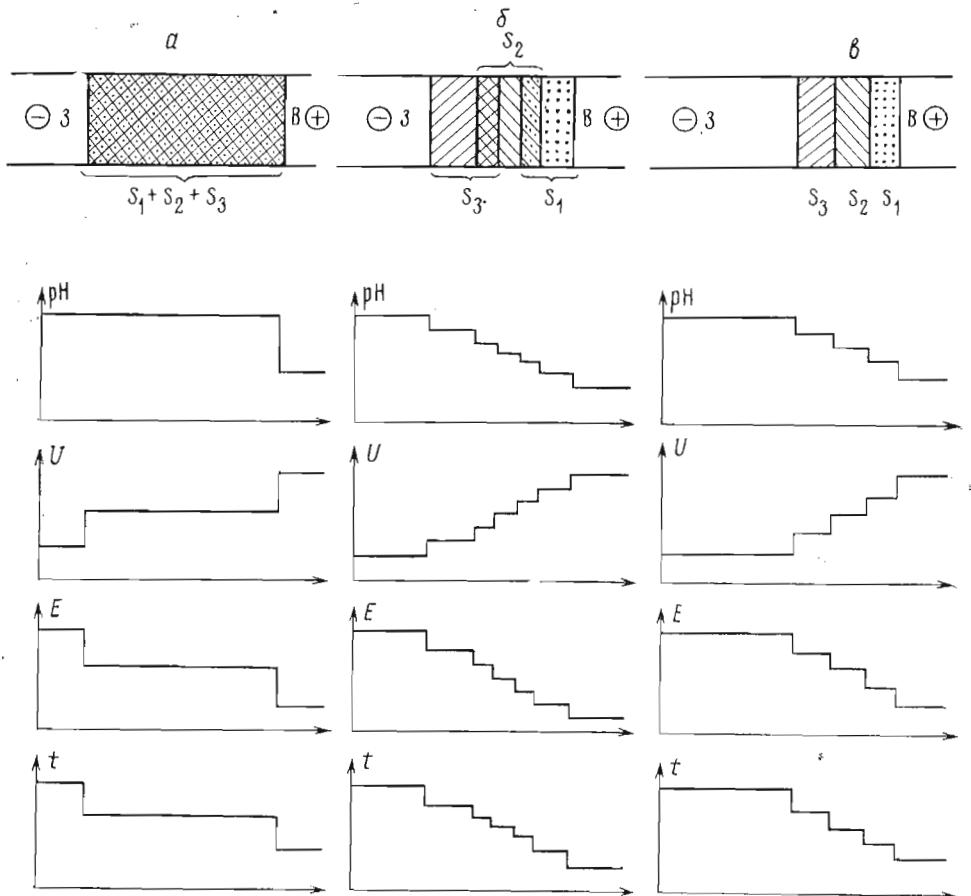


Рис. 1. Схематическое изображение изменений рН, подвижности ( $U$ ), температуры ( $t$ ) и напряженности поля ( $E$ ) в анионной изотахофоретической системе:  $a$  — начальные условия эксперимента — рН, подвижности, напряженность электрического поля и температура в зоне образца одинаковы;  $b$  — через определенный момент времени компоненты образца  $S_1$ ,  $S_2$  и  $S_3$  частично разделились и образовались ступенчатые градиенты рН, подвижности, напряженности поля и температуры;  $c$  — в системе достигнуто равновесие, характеризующееся полным разделением компонентов образца, четкими границами между ними, образованием стабильных во времени ступенчатых градиентов рН, подвижности, напряженности поля и температуры, при достижении всеми компонентами системы одинаковой скорости движения. В — ведущий электролит, З — замыкающий электролит

Вслед за ионами образца располагаются замыкающие ионы, обладающие еще меньшими зарядом и подвижностью. Они не могут опередить ионы образца, которые для них выступают в роли ведущих. В трубку, где движутся ионы, все время поступают добавочные количества замыкающих ионов из электродного замыкающего электролита. Из-за этого их концентрация в трубке остается постоянной. Вот почему после приложения к системе разности потенциалов концентрируются именно ионы образца и тем самым обеспечивается равенство суммы отклонений  $C/U$  согласно уравнению Кольрауша, что приводит к сужению зоны образца и к резкому росту его концентрации в этой зоне. По мере сужения зоны образца концентрация ионов в ней увеличивается, соответственно возрастает электропроводность и падает напряженность поля в этой зоне до тех пор, пока скорости миграции всех трех видов ионов — ведущего, замыкающего и ионов образца — не окажутся равными. После установления равной и постоянной скорости движения всех ионов система стабилизируется. Ионы образца оказываются «сжатыми» между ведущими и

замыкающими ионами в узкую зону. Ширина этой зоны и концентрация ионов в ней в значительной степени определяется концентрацией и подвижностью ведущего иона. Чем выше подвижность и концентрация ведущего иона, тем в более узкую зону с большей концентрацией будут сжаты ионы образца. С другой стороны, при введении в систему большего количества ионов образца будет увеличиваться ширина занимаемой ими зоны, но их концентрация в этой зоне изменяться не будет, так как она задается для системы разделения концентрацией и подвижностью ведущего иона. Таким образом, разрешающая способность изотахофореза не ухудшается при повышении нагрузки, что является одним из существенных достоинств метода.

Если в образце имеется несколько видов ионов с различными подвижностями, то они будут располагаться между замыкающими и ведущими ионами в порядке убывания их подвижностей в виде непосредственно контактирующих дискретных зон, состоящих из ионов только одного вида. После достижения равновесия и разделения изотахофоретически мигрирующих ионов в системе образуется градиент напряженности поля, pH и температуры (рис. 1, б, в).

Если в систему ввести значительные количества дополнительных ионов, обладающих подвижностями, промежуточными между подвижностями ионов образца, то при изотахофоретическом разделении такие ионы займут место между ионами образца и тем самым «раздвинут» их. Такие добавочно вводимые в систему ионы называют спейсерными (раздвигающими или разделяющими ионами) [23]. Если соответствующим образом подобрать концентрации и подвижности таких ионов, то ионы образца будут отстоять друг от друга, разграниченные разделяющими ионами (занимающими ввиду их большой концентрации значительное пространство) (см. ниже). Естественно, что разделяющие ионы должны по своей природе отличаться от ионов образца, подлежащих разделению. В качестве разделяющих ионов чаще всего используются стандартные смеси полиамино-поликарбоновых кислот, выпускаемых фирмой LKB (Швеция) и называемых амфолинами.

На практике некоторые виды ионов образца могут иметь подвижности меньшие, чем подвижность замыкающих ионов. Такие ионы называют трайлерными, «хвостовыми». Они движутся позади переднего фронта замыкающих ионов в зоне с постоянными значениями pH, напряженности поля и температуры, определяемыми непрерывным поступлением в систему из замыкающего электролита замыкающих ионов. Трайлерные ионы в изотахофоретическом процессе не участвуют, и их разделение происходит как в обычном зональном электрофорезе, т. е. в соответствии с их подвижностями [2].

Примером изотахофореза биополимеров являются процессы, происходящие в верхнем полиакриламидном геле при дикс-электрофорезе и приводящие к концентрированию образца, который затем разделяется в нижнем мелкопористом геле по принципу зонального электрофореза [15, 16, 24].

## Амфолины

Как уже отмечалось выше, для улучшения разделения компонентов образца разделяющие ионы должны иметь подвижности, промежуточные между подвижностями этих компонентов. Иными словами, изоэлектрические точки разделяющих ионов должны быть близки к изоэлектрическим точкам разделяемых компонентов [2, 25].

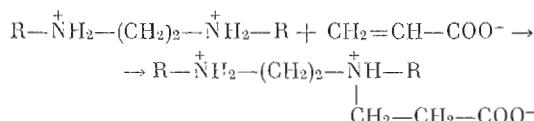
В качестве разделяющих ионов, особенно при изотахофоретическом анализе образцов белковой природы, часто используются амфолины.

В отечественной литературе свойства, синтез и состав амфолинов пока не были описаны. Поскольку амфолины используются не только при изо-

такофорезе, но и при изоэлектрофокусировании для создания градиентов значений pH, их свойства, по нашему мнению, следует рассмотреть более подробно.

Синтез амфолинов, пригодных как для изотакофоретического, так и для изоэлектрического разделения биополимеров в градиенте pH, был впервые осуществлен в середине 60-х годов [26, 27]. Амфолины содержат набор полiamинополикарбоновых кислот, обладающих значительной буферной емкостью и изоэлектрическими точками в диапазоне pH 2,5–11 [28, 29].

#### Схема синтеза амфолинов



где R — H или алифатический радикал с дополнительными NH<sub>2</sub>-группами.

Синтез амфолинов включает в себя алкилирование различных полиэтиленполиаминов в водном растворе акриловой кислотой при 70° в течение нескольких часов до полного израсходования кислоты [1]. Образуется набор фракций продуктов с близкими значениями рK и рI. Полученные соединения различаются как количеством, так и распределением ионогенных групп в молекуле. Это дает широкий спектр производных, обладающих близкими изотакофоретическими подвижностями и изоэлектрическими точками. Фракционирование смеси амфолинов с изоэлектрическими точками от 2,5 до 11, полученной в результате синтеза, с целью выделения фракций продуктов с более узким диапазоном изоэлектрических точек (до 0,5 единицы pH) проводят в многосекционном электродиализаторе [26].

В настоящее время амфолины выпускаются фирмой LKB в виде 40%-ных водных растворов в следующих диапазонах pH: 2,5–4,0; 3,0–5,0; 3,0–6,0; 4,0–6,0; 5,0–7,0; 5,0–8,0; 6,0–8,0; 7,0–9,0; 8,0–10,0; 9,0–11,0; 3,5–5,0; 3,5–10,0; 3,0–10,0. Выпускаются также типы амфолинов, дающие градиент pH в диапазоне 0,5 единицы pH — например, 4,0–4,5; 4,5–5,0 и т. д.

Чтобы избежать разложения амфолинов и загрязнения их микроорганизмами, их следует хранить в темноте при температуре не выше 6° [29].

Недавно фирма «Serva» (ФРГ) начала производство «серволитов», представляющих собой полiamины, содержащие в качестве анионных групп остатки серной и фосфорной кислот и карбоксильные группы. Серволиты также могут быть использованы для создания градиентов pH в диапазоне 2,0–11,0 и применяться в качестве разделяющих ионов при изотакофорезе.

Ввиду гетерогенности амфолины четко химически не охарактеризованы. Максимальный молекулярный вес (*M*) амфолинов «pH 3,5–10,0» достигает 5000. Амфолины с *M* > 4000 составляют около 0,03% общего количества амфолинов, с *M* > 1000—0,7%, с *M* > 600—6%. Большая часть амфолинов имеет *M* ~ 400 [30] (рис. 2).

Амфолины не врашают плоскость поляризации света. Среднее число —NH<sub>2</sub> (или =NH) групп варьирует от 3,3 (для амфолинов диапазона 3,5–5,0) до 5,3 моль (для амфолинов диапазона pH 9,0–11,0) в расчете на 1 моль амфолинов с *M* 400. Среднее число карбоксильных групп варьи-

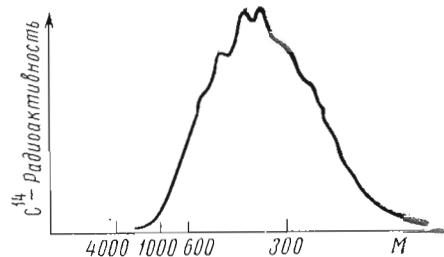


Рис. 2. Распределение <sup>[14]C</sup>амфолинов «pH 3,5–10» при гель-фильтрации на сефадексе G-25 [30]

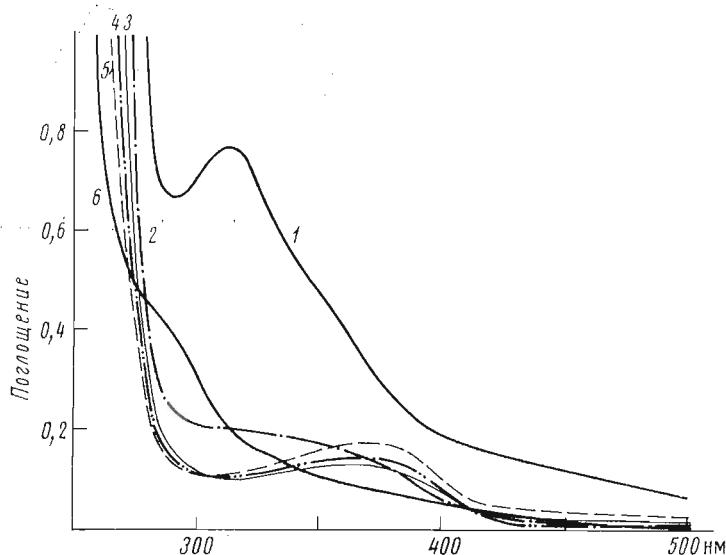


Рис. 3. Спектры амфолинов диапазона рН 3,5–5 (1), 5–7 (2), 6–8 (3), 8–9,5 (4), 3,5–10 (5) и 9–11 (6). Спектры сняты с использованием 4%-ных растворов соответствующих амфолинов и кюветы с оптическим путем 3 см [38]

рует от 4 (для амфолинов диапазона рН 3,5–5,0) до 2,6 моль (для амфолинов диапазона рН 9,0–11,0) на 1 моль амфолинов [31].

Среди свойств амфолинов следует отметить их способность реагировать с нингидрином, биуретом, реактивом Фолина [1, 28]. Они необратимо окрашиваются красителями для белков — амидошварцем, кумасси голубым и т. д. [32–34], образуют хелатные комплексы с металлами. Несмотря на то что способность к образованию комплексов с двухвалентными ионами  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  у амфолинов в 20–200 раз слабее, чем у этилендиаминететрауксусной кислоты [31], они способны вызвать полное ингибирование ряда металлоферментов. Так, например, по нашим данным, амфолины диапазона рН 5–8 вызывают практически полное и необратимое ингибирование нейтральной металлопротеиназы из *Bacillus subtilis*. Активность лейцинамилопептидазы из *Aspergillus oryzae* после взаимодействия с амфолинами диапазона рН 3–5 падает на 90%. Однако после добавления ионов цинка она частично восстанавливается.

Присутствие амфолинов не мешает протеканию иммунологических реакций, таких, как иммунопреципитация или реакция фиксации комплемента. Показано, что токсичность амфолинов крайне незначительна и иммунизация животных смесью белка с амфолинами не вызывает побочных реакций [35].

Поглощение амфолинов при 280 нм невелико ( $E_{1\text{ см}}^{1\%}$  0,01), но быстро возрастает с уменьшением длины волны — при 250 нм  $E_{1\text{ см}}^{1\%}$  составляет величину 0,15–0,5 (с повышением значений диапазона рН амфолинов их поглощение в ультрафиолетовом свете, как правило, увеличивается [1]). Определение белков при 220 нм в присутствии амфолинов невозможно из-за сильного поглощения последних. Амфолины имеют характерные максимумы поглощения в видимом свете, которые следует учитывать при спектрофотометрическом изучении смеси белков с амфолинами [36] (рис. 3).

По нашим данным, амфолины сильно затрудняют определение N-концевых аминокислотных остатков белков или пептидов методом дансилирования и мешают точному проведению аминокислотного анализа, особенно

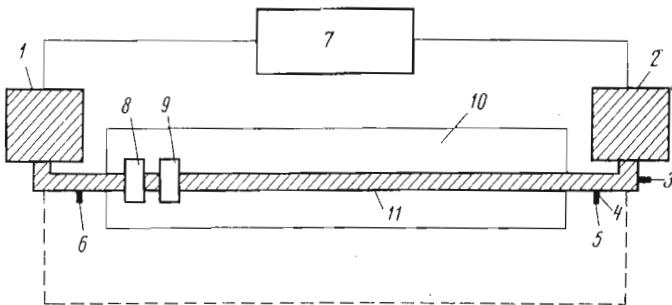


Рис. 4. Принципиальная схема аппарата «Tachophor» для изотахофореза в капиллярах [60]: 1 — ведущий электролит, 2 — за-мыкающий электролит, 3 — ввод образца, 4 — клапан, 5 — элю-ционное отверстие, 6 — противоток, 7 — источник постоянного тока, 8 и 9 — температурный и УФ-детекторы, 10 — термостати-рованная ячейка, 11 — капилляр

мешая идентификации  $\beta$ -аланина, таурина, фосфосерина, цистеиновой и аспарагиновой кислот.

Присутствие амфолинов не вызывает денатурацию белков, а иногда даже стабилизирует их [29]. Принято считать, что амфолины не связываются с белками, однако для некоторых белков, например альбумина, описано незначительное комплексообразование с амфолинами [37—39]. Тем не менее отделение белков, особенно низкомолекулярных белков и пептидов, от амфолинов — очень трудоемкая и в то же время важная процедура. Для этой цели используют продолжительный диализ, гель-фильтрацию на сефадексах G-25 и G-50, многократное переосаждение белков сульфатом аммония, ионообменную хроматографию, ультрацентрифугирование, ультрафильтрование [1, 13, 40, 41]. Имеются данные, что невозможно провести полное отделение белков с молекулярным весом 20 000—30 000 от амфолинов методом гель-фильтрации на сефадексах [42]. Естественно, что для пептидов или белков с меньшим молекулярным весом трудности отделения от амфолинов увеличиваются.

### Аналитический изотахофорез в капиллярах

Аналитический изотахофорез, проводимый в капиллярах, чаще всего используется для анализа низкомолекулярных ионов: металлов [43, 44], аминокислот [45, 46], метаболитов [47], нуклеотидов [48, 49], но он может быть применен также для анализа белков и пептидов [46, 50—52].

Чаще всего эксперимент осуществляют на приборе «Tachophor» (LKB, Швеция) в капиллярах из стекла или тефлона с внутренним диаметром 0,4—0,6 мм и длиной 10—100 см при напряжении до 30 кВ и силе тока до 300 мкА [53—56] (рис. 4). Образцы вводят в капилляр при помощи специального микрошприца. Объем образца может варьировать от 0,1 до 50 мкл, причем чаще всего предварительной обработки образцов, даже содержащих значительные количества солей, не требуется. Процесс разделения занимает 10—40 мин. Зоны разделившихся веществ локализуют с помощью скользящего вдоль капилляра в процессе опыта УФ- или температурного детекторов, отличающихся высокой чувствительностью [57, 58]. Температурный детектор регистрирует не только абсолютную температуру капилляра, но и разность температур между отдельными участками его. Введение в состав растворов 0,5% метилцеллулозы повышает их плотность и стабилизирует разделившиеся фракции [59].

В качестве разделяющих ионов чаще всего применяются соответствующие амфолины или же такие соединения, как  $\beta$ -аланин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота, валин и т. д. [51].

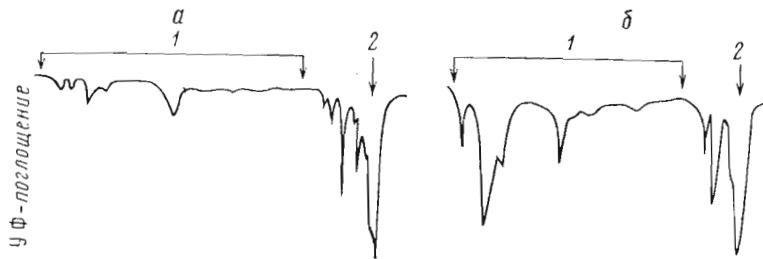


Рис. 5. Анализ цереброспинальной жидкости здорового человека (*a*) и больного множественным склерозом (*b*) на аппарате «Tachophor» [51] (длина капилляра 23 см,  $t$  12°, 80 мкА, 30 мин): 1 — район гамма-глобулинов, 2 — альбумин. Состав проб: 6 мкл цереброспинальной жидкости (предварительно сконцентрированной в 10 раз), 1 мкл 1%-ного раствора амфолинов  $\text{pH}$  9,0—9,5, 3 мкл смеси 2 мМ  $\beta$ -аланина и 1 мМ  $\gamma$ -амино-аспартовой кислоты

Для разделения ионов, подвижности которых в водной среде близки друг к другу, могут быть применены неводные растворители. Например, подвижности  $\text{K}^+$  и  $\text{NH}_4^+$  почти идентичны в воде, но в метаноле различаются на 10% [43].

С использованием описанной выше схемы аналитического изотахофореза представляется возможность разделять и исследовать несколько наномоль вещества.

Вызывает интерес использование изотахофореза для целей аминокислотного анализа. Так, например, определение состава тетрадекапептида соматостатина, синтезированного по методу Меррифилда, было осуществлено на аппарате «Tachophor» в течение 40 мин, причем для анализа оказалось достаточным иметь по 5 нмоль каждой аминокислоты [45, 46].

Проведено аналитическое изотахофоретическое разделение некоторых белков, например гемоглобинов и лейкоагглютининов из бобов сои [50, 59]. Для анализа использовали 50 мкг белков, продолжительность разделения не превышала 45 мин. Отмечено, что разрешающая способность изотахофореза выше разрешающей способности изоэлектрофокусирования в градиенте  $\text{pH}$ . Так, после изотахофореза выявились неоднородность каждой из четырех фракций гемоглобинов, гомогенных по данным изоэлектрофокусирования. К сожалению, пока неясны причины такой микрогетерогенности.

Очень важным может оказаться применение этого вида изотахофореза в клинических целях. Уже сейчас аналитический изотахофорез был применен для анализа такой сложной белковой смеси, как цереброспинальная жидкость человека [51]. С помощью этого метода были найдены существенные отличия состава жидкости здоровых людей от состава цереброспинальной жидкости, взятой от больных хроническим менингоэнцефалитом или множественным склерозом (рис. 5, *a*, *b*).

### Изотахофорез в полиакриламидном геле (рис. 6)

Изотахофорез может применяться и в препартивных целях, причем он имеет некоторые преимущества перед препартивным зональным электрофорезом.

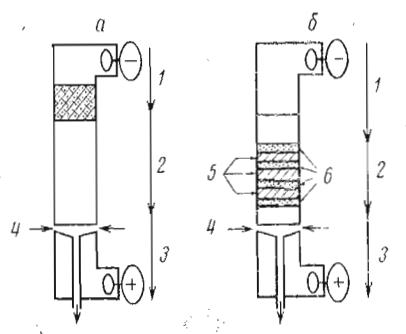
Препартивный зональный электрофорез в полиакриламидном геле [61, 62], достаточно широко применяемый в настоящее время, имеет ряд недостатков, на которых мы кратко остановимся.

При зональном электрофорезе компоненты образца разделяются в соответствии с их электрофоретическими подвижностями, двигаясь в геле

с различной скоростью. Фракции, выходя с геля, элюируются одна за другой с помощью специальной элюционной камеры, после чего попадают на коллектор фракций и регистрируются по УФ-поглощению, функциональной активности, иммунологическими методами и т. д. [63, 64]. Для уменьшения разбавления элюируемых фракций устанавливают невысокую скорость протока буфера через элюционную камеру (обычно 10—20 мл/ч) и скорость протока в течение опыта оставляют постоянной. Это приводит к сильному разбавлению медленно движущихся фракций, что затрудняет их идентификацию и дальнейшее исследование [65] (рис. 7, а). Кроме того, в препаративном зональном электрофорезе затруднено разделение фракций, близких по подвижности. Например, нагрузка для фракций, различающихся по  $R_f$  на 0,1, не должна превышать 1—2 мг/см<sup>2</sup> геля [66].

Неодинаковое разбавление фракций отсутствует при изотахофорезе, так как все компоненты образца после установления равновесия передви-

Рис. 6. Схема препаративного изотахофореза в аппарате «Uniphor» [22]: а — начальные условия эксперимента, б — условия при достижении равновесия в системе. 1 — катодный буфер (замыкающий электролит), 2 — гелевый буфер (ведущий электролит), 3 — анодный буфер, 4 — элюционный буфер, 5 — разделяющие ионы, 6 — компоненты образца



таются в геле с одинаковой скоростью (рис. 7, б). При изотахофоретическом разделении нагрузка может быть значительно больше. Например, теоретически концентрация белка с  $M = 60\,000$  в изотахофоретически мигрирующей зоне (трикс-глициновая буферная система) может достигать 200 мг/мл [67—69]. На практике достижение подобных концентраций ограничено растворимостью белков. Чаще всего с помощью изотахофореза разделяют несколько десятков миллиграммов белкового препарата. Тем не менее описаны опыты, в которых изотахофорезом разделяли до нескольких граммов белков за опыт. Так, удалось провести препаративное разделение 5 г гемоглобинов в ходе одного изотахофоретического эксперимента [70, 71].

Теоретически показано, что изотахофоретическое разделение биополимеров в поликарбамидном геле возможно при pH от 2,5 до 11 при температурах 0—25° в различных буферных системах. С помощью ЭВМ рассчитаны параметры 4269 таких буферных систем, пригодных для анализа широкого круга биополимеров [72—74].

Обычно для изотахофоретического разделения выбирают тот размер пор и, следовательно, концентрацию геля, при которой отсутствует эффект «молекулярного сита». Однако концентрация геля не должна быть чрезмерно низкой. В противном случае разделение ухудшится из-за диффузии низкомолекулярных компонентов [75—80].

Необходимо также выбирать такие буферные системы, в которых все интересующие компоненты образца имели бы подвижность не ниже подвижности замыкающего иона, т. е. не давали бы трайлерных ионов [76, 79, 81], отстающих от электрофоретического фронта (подвижной, идущей к аноду границы разделяющей зоны ведущего и замыкающего ионов), при отсутствии раздвигающих ионов. Положение электрофоретического фронта обычно определяют по положению окрашенного низкомолекулярного маркера — метиленового синего, метилен-

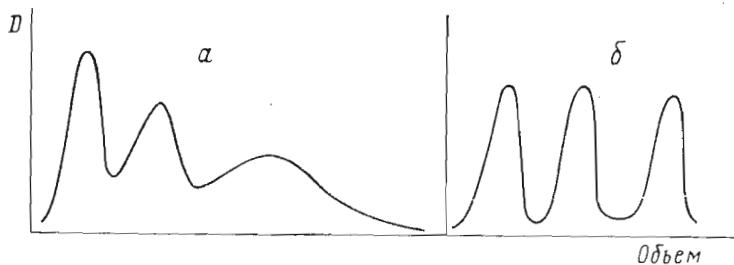


Рис. 7. Профили элюции разделившихся фракций при препаративном зональном электрофорезе (а) и препаративном изотахофорезе (б)

нового зеленого, бромфенолового синего и т. д., по изменению рН геля, по границе, преломляющей свет, а также с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии [72, 76, 82].

Пока полиакриламидный гель является единственной доступной стабилизирующей средой, в которой может быть получено четкое изотахоферетическое разделение образцов белковой природы. Гели на основе агара, агарозы и сефадексов непригодны для изотахофореза из-за большой величины электроосмоса [76, 79].

Мы не считаем целесообразным останавливаться на физико-химических свойствах полиакриламидного геля и подготовке гелей для эксперимента, так как эти вопросы рассмотрены в соответствующих обзорах по диск-электрофорезу [11, 24, 72, 83].

Концентрацию полиакриламидного геля удобно характеризовать параметрами Т (%) и С (%). Т — это суммарная концентрация акриламида и метиленбисакриламида в граммах на 100 мл полимеризуемой смеси, а С — отношение содержания метиленбисакриламида и акриламида на 100 мл полимеризуемой смеси [84]. Чаще всего для изотахофореза выбирают гели с Т = 2—5% и С = 1—5%, в которых эффект молекулярного сита ничтожен для белков с молекулярным весом 40 000—60 000 [82]. При таких концентрациях гели механически непрочны, поэтому иногда для повышения прочности в гель вводят агарозу [85] или увеличивают параметр С до 20—50% [80].

Для предотвращения комплексообразования белков или пептидов в гель добавляют мочевину, неионные детергенты: Твин, Тритон X-100 и т. д. [70, 72]. В принципе в гель можно вводить любые неионные добавки, в том числе лиганды, субстраты, кофакторы, SH-соединения и т. п. [72].

Выбор оптимальных концентраций геля, систем буферов и количеств разделяющих ионов (амфолинов) в каждом отдельном случае производится экспериментальным путем с учетом известных свойств интересующих фракций — молекулярного веса, изоэлектрических точек, рН-стабильности и т. д. Обычно аналитический изотахофорез в полиакриламидном геле проводят в приборах для диск-электрофореза или изоэлектрофокусирования в геле, препаративный изотахофорез в геле — чаще всего в приборах «Uniphor» (LKB, Швеция), лучше других приспособленных к особенностям изотахоферетического разделения и оснащенных пластмассовыми колонками, к которым гель практически не прилипает [86]. Использование стеклянных колонок нежелательно, поскольку из-за прочного прилипания геля к стеклу увеличение объема геля, иногда происходящее при изотахофорезе, может исказить поверхность геля и ухудшить разделение.

Отмечено несколько взаимосвязанных факторов, влияющих на изотахоферетическое разделение биополимеров в полиакриламидном геле [1, 75, 76].

1. Количество вводимых амфолинов и диапазон их рН (рI). При постепенном увеличении этого количества наблюдается улучшение разделения

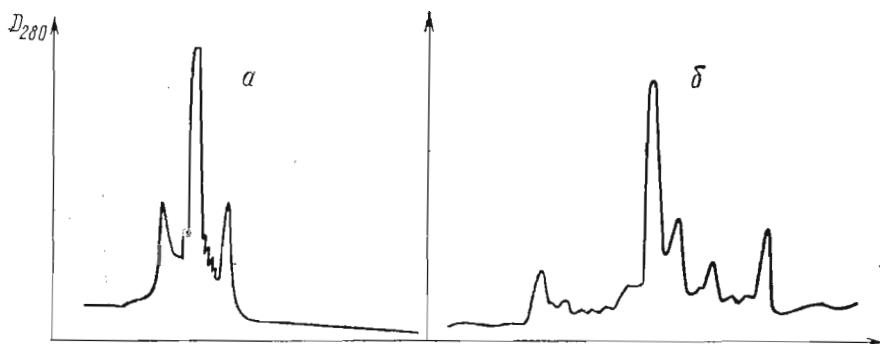


Рис. 8. Препаративное изотахофоретическое разделение 30 мг гемоглобина человека с использованием 0,4 мл (а) и 1,6 мл (б) 40%-ного раствора амфолинов «рН 6—8» [86]

(рис. 8, а, б). Однако при чрезмерно высоком содержании амфолинов разрешение резко падает, и разделяемые фракции становятся крайне широкими и диффузными. Это происходит из-за проникновения компонентов образца в зоны разделяющих ионов, так как амфолины часто имеют подвижности очень близкие или совпадающие с подвижностями разделяемых фракций. Диапазон pH амфолинов должен охватывать значения рI разделяемых фракций, представляющих интерес. Например, для исследования белка с рI 5,0 наиболее логично использовать амфолины «рН 4,0—6,0». Выбирая амфолины соответствующих диапазонов pH, можно разделять лишь интересующие компоненты образца. При этом остальные компоненты образца будут двигаться как трайлерные ионы. Так, для фракционирования основных компонентов сыворотки подобраны следующие оптимальные условия:  $T = 4—7\%$ ,  $C = 3—5\%$ , 50 мкл амфолинов «рН 6,0—8,0» или «рН 7,0—10,0» на 1 мг белка. При уменьшении количества разделяемой белковой смеси соответственно уменьшают и количество вводимых в разделение амфолинов [75, 76].

2. Концентрация ведущего иона. Увеличение концентрации, с одной стороны, приводит к лучшему разделению, но с другой — происходящее при этом увеличение силы тока усиливает нагревание геля, особенно в области разделяемых фракций, близких к зоне замыкающего иона. Чрезмерное разогревание часто искачет результаты разделения.

3. pH ведущего электролита. Чем ближе величина pH ведущего электролита к значению рI разделяемых фракций, тем сильнее начинают сказываться различия в рI этих фракций, положительно влияя на разделение. Но при чрезмерной близости этих величин может заметно упасть скорость их миграции, что вызовет необходимость в увеличении продолжительности опыта.

4. Природа ведущего и замыкающего ионов. При увеличении разницы в подвижностях ведущего и замыкающего ионов наблюдается улучшение разделения. Однако чрезмерное различие подвижностей может привести к излишне широким зонам разделяемых фракций.

5. Сила тока. Увеличение силы тока приводит к лучшему разделению. Чрезмерное увеличение тем не менее вызывает, как уже отмечалось (см. п. 2), нежелательное разогревание гелей. Обычно используют силу тока 15—20 mA/cm<sup>2</sup> геля в аналитических опытах (с гелями диаметром 6—7 мм) и 3—5 mA/cm<sup>2</sup> геля — в препаративных (с гелями диаметром более 20 мм).

6. Продолжительность эксперимента. Она должна быть достаточной для достижения в системе изотахофоретического равновесия, т. е. установления одинаковой скорости движения всех разделяемых фракций. Поэтому иногда необходимо использовать гели до 15—20 см длиной, так как в более коротких гелях фракции достигают нижнего края геля до

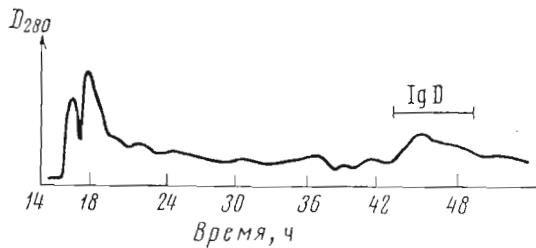


Рис. 9

Рис. 9. Препаративное изотахофоретическое разделение 10 мл сыворотки человека, предпринятое для выделения IgD [12]

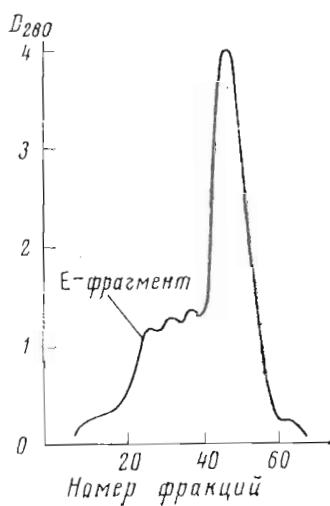


Рис. 10

Рис. 10. Препаративное изотахофоретическое разделение гидролизата 250 мг фибриногена, предпринятое для выделения Е-фрагмента [64]

наступления равновесия [87]. Обычно время разделения не превышает 1 ч в аналитических опытах и 20–30 ч — в препаративных [88, 89].

Белковые фракции, разделенные изотахофорезом в геле, в аналитических опытах локализуют окрашиванием по методикам, аналогичным для изоэлектрофокусирования в геле [90–93]. Разработаны также методы окрашивания, позволяющие установить места расположения разделяющих ионов — амфолинов [33, 34].

На практике подбор условий аналитического или препаративного изотахофореза может потребовать продолжительной работы (если учесть длительность процедуры окрашивания фракций и удаления избытка красителя из геля). Поэтому рекомендуется вводить в разделяемую смесь какой-либо окрашенный маркер со свойствами, близкими к разделяемым компонентам (гемоглобин, цитохром и т. п.), или метить разделяемые компоненты флуоресцирующими агентами — например, флуоресцессионом [94–96] или о-фталевым альдегидом [97]. Введение флуоресцирующей метки позволяет легко следить за ходом разделения и повышает чувствительность метода. Однако связывание заряженной флуоресцирующей метки с белком может менять его физико-химические свойства: подавлять активность (для ферментов), изменять его изоэлектрическую точку, нарушать структуру, что может затруднить интерпретацию полученных результатов.

Характерный пример использования изотахофореза — выделение иммуноглобулина IgD из сыворотки крови человека [12]. Об этом белке известно гораздо меньше, чем о других иммуноглобулинах человека. Причиной этого является его малое содержание в сыворотке и трудность выделения. Многостадийный метод очистки IgD, применявшийся ранее, не приводил к получению иммунологически чистого белка и отличался невысоким выходом. Кроме того, часто в процессе длительного выделения IgD подвергался гидролизу протеиназами, находящимися в сыворотке. Используя изотахофорез в геле ( $T = 5,5\%$ ,  $C = 2,9\%$ ) с амфолинами «рН 5–9» в буферной системе, где ведущим и элюционным буфером был 0,067 М трикс — 0,036 М  $H_3PO_4$  (рН 6,7), а замыкающим электролитом 0,012 М трикс — 0,23 М  $\epsilon$ -аминоакроновая кислота, удалось получить в ходе одного опыта из 10 мл сыворотки препарат IgD с высоким вы-

ходом. Препарат содержал незначительные количества примесей и мог быть очищен до иммунологически гомогенного состояния гель-фильтрацией на сефадексе G-200. Таким образом, применение изотахофореза открывает широкие возможности для выделения и изучения этого важного класса иммуноглобулинов (рис. 9).

В качестве другого удачного примера использования изотахофореза можно привести выделение фрагмента, несущего антиген Е, из гидролизата фибриногена [64]. Известно, что среди продуктов гидролиза фибриногена, образующихся при его обработке плазмином, появляются фрагменты, несущие антигены Е, D и т. д. Выделение этих фрагментов гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, электрофорезом в блоке «Pevicon» не приводило к удовлетворительным результатам. Используя изотахофорез в геле, удалось очистить Е-фрагмент до иммунологически гомогенного состояния, выделив его непосредственно из гидролизата 250 мг фибриногена (рис. 10). В данном случае как ведущий ион был использован  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , как замыкающий — глицин, противоион — трис, а разделяющими ионами были амфолины «рН 5—7». Гомогенность выделенного Е-фрагмента была подтверждена не только иммунологическими, но и диск-электрофоретическими методами. Данный пример хорошо иллюстрирует возможности изотахофореза для анализа сложных смесей фрагментов белков.

Как уже отмечалось, с помощью изотахофореза можно изучать не только белки и их фрагменты, но и другие природные вещества. Так, например, фракции фульвиновых и гуминовых кислот почвы с помощью диск-электрофореза удалось разделить на два и три компонента соответственно, тогда как при изотахофоретическом разделении в геле зафиксировано появление 13 и 10 компонентов соответственно [87].

### Экспериментальная процедура

#### Буферные растворы [22]

Катодные буферные растворы (замыкающие электролиты) (на 2 л воды):

- 1) трис-глициновый (рН 8,4): 30 г глицина, 6 г трис,
- 2) трис-β-аланиновый (рН 8,7): 35 г β-аланина, 5 г трис,
- 3) трис-ε-аминокапроновый (рН 8,9): 60 г ε-аминокапроновой кислоты, 3 г трис.

Буфера, на основе которых готовится гель (ведущие электролиты) (на 100 мл воды):

- 1) трис-ацетатный (рН 4,0): 3,0 мл ледяной уксусной кислоты, 1 г трис, 0,3 мл TEMED,
- 2) трис-ацетатный (рН 4,5): 3,0 мл ледяной уксусной кислоты, 2,0 г трис, 0,3 мл TEMED,
- 3) трис-2-(N-морфолино)этансульфоновый (рН 6,0): 7,3 г 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, 1,5 г трис, 0,3 мл TEMED,
- 4) трис-2-(N-морфолино)этансульфоновый (рН 6,2): 7,3 г 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, 2,0 г трис, 0,3 мл TEMED,
- 5) трис-фосфатный (рН 6,25): 30 мл 1 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 4 г трис, 0,3 мл TEMED,
- 6) трис-фосфатный (рН 6,6): 39 мл 1 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 6 г трис, 0,9 мл TEMED,
- 7) трис-фосфатный (рН 7,05): 30 мл 1 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 6 г трис, 0,3 мл TEMED,
- 8) трис-фосфатный (рН 8,1): 30 мл 1 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 12 г трис, 0,3 мл TEMED,
- 9) трис-HCl (рН 8,5): 60 мл 1 н. HCl, 22 г трис, 0,3 мл TEMED,
- 10) трис-какодилатный (рН 7,02): 2,2 г какодиловой кислоты, 1,44 г трис, 0,3 мл TEMED.

Измерение рН производится после добавления TEMED ( $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -тетраметилэтилендиамина) и разбавления 1 : 10.

Аподными буферными растворами могут служить разбавленные в соотношении 1 : 10 ведущие электролиты или трис-сульфатный буфер (рН 7,1): 121 мл 1 М  $H_2SO_4$ , 32 г трис, вода (до 4 л).

Для элюции могут использоваться анодные буферные растворы.

### Растворы для приготовления полиакриламидного геля:

Гелевый раствор № 1: 30 г акриламида, вода — до 100 мл.

Гелевый раствор № 2: 2 г метиленбисакриламида, вода — до 100 мл.

Раствор катализатора № 1: 8 мг рибофлавина, вода — до 100 мл.

Раствор катализатора № 2: 100 мг персульфата аммония, вода — до 100 мл.

Растворы для приготовления геля должны быть отфильтрованы на фильтрах «Millipor» с размером пор 0,45 мкм или на других подобных фильтрах.

*Хранение гелей и растворов.* Растворы катализаторов следует готовить перед опытом. Растворы ведущих электролитов нужно хранить в темноте на холода не более 2—4 недель. Гелевые растворы можно хранить на холода 2—4 недели. Готовые полиакриламидные гели не рекомендуется хранить более 2 недель.

*Подготовка колонки.* Колонку для полимеризации геля термостатируют при температуре проведения эксперимента — обычно 10°. Растворы смешиваются в следующих пропорциях (мл):

Раствор ведущего электролита	5,0
Гелевый раствор № 1	5,0
Гелевый раствор № 2	2,5
Раствор катализатора № 1	5,0
Раствор катализатора № 2	5,0
Вода	до 50

Параметры геля — 3,4% Т, 2,82% С.

Готовую смесь заливают в колонку по стенке, чтобы избежать появления пузырьков воздуха. На поверхность смеси, избегая перемешивания, насыпают 2 мл разбавленного в 10 раз соответствующего раствора ведущего электролита. Полимеризацию проводят при свете люминесцентных ламп в течение 1 ч.

После завершения полимеризации колонку устанавливают в приборе (рис. 6) в соответствии с инструкцией. На гель наносят образец в соответствующем катодном буферном растворе, содержащем 10% сахарозы и необходимые количества амфолинов нужного диапазона рН. Поверх образца насыпают соответствующий катодный буферный раствор. Катодный буферный раствор заливают в верхний электродный резервуар прибора, а анодный — в нижний. Устанавливают проток элюционного буфера через элюционную камеру таким образом, чтобы скорость этого протока составляла 10—25 мл/ч. Нижний резервуар прибора подключают к аноду источника питания, верхний резервуар — к катоду. Задают необходимые значения тока и напряжения.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Catsimpoolas N. (1973) Separation Sci., 8, 71—121.
2. Haglund H. (1970) Sci. Tools, 17, 2—13.
3. Eriksson G. (1969) Acta chim. scand., 21, 2290—2291.
4. Everaerts F. M. (1972) J. Chromatogr., 65, 3—17.
5. Everaerts F. M., Routs R. J. (1971) J. Chromatogr., 58, 181—188.
6. Константинов Б. И., Ошуркова О. В. (1967) Докл. АН СССР, 171, 113—117.
7. Nee T. W. (1974) J. Chromatogr., 93, 7—15.
8. Moore G. (1975) J. Chromatogr., 106, 1—16.
9. Willemse A. J. (1975) J. Chromatogr., 105, 405—410.
10. Boczek P., Deme M., Janak J. (1975) J. Chromatogr., 106, 283—290.
11. Chrambach A., Rodbard D. (1972) Separation Sci., 7, 663—703.

12. Jefferis R., Butwell A. J. (1975) *Sci. Tools*, **22**, 1—3.
13. Catsimpoolas N. (1970) *Separation Sci.*, **5**, 523—547.
14. Hinckley J. O. N. (1974) *Clin. Chem.*, **20**, 973—991.
15. Davis B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427.
16. Ornstein L. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321—349.
17. Hinckley J. O. N. (1973) *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 574—587.
18. Martin A. J. P., Everaerts F. M. (1967) *Anal. chim. acta*, **38**, 233—238.
19. Vestermark A., Wiedemann B. (1969) *Nuclear Instruments and Methods*, **56**, 151—163.
20. Vestermark A. (1966) *Cons Electrophoresis — an Experimental Study*, Stockholm.
21. Kohlrausch F. (1897) *Ann. Phys. Leipzig*, **62**, 209.
22. Winter A., Hjalmarsson S.-G., Karlsson C. (1974) LKB-Application Note No. 146, Sweden.
23. Kendall J. (1928) *Science*, **67**, 163.
24. Маурер Г. (1971) *Диск-электрофорез*, «Мир», М.
25. Finlayson G. R., Chrambach A. (1971) *Anal. Biochem.*, **40**, 292—311.
26. Vesterberg O. (1969) *Acta chim. scand.*, **23**, 2653—2666.
27. Vesterberg O., Wadstrom T., Vesterberg K., Svensson H., Malmgren B. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, **133**, 435—445.
28. Vesterberg O. (1973) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 23—40.
29. Vesterberg O. (1968) *Isoelectric Focusing of Proteins*, Karolinska Institutet, Stockholm.
30. Gaspacri V., Rosengren A. (1974) *Sci. Tools*, **21**, 1—2.
31. Galante E., Caravaggio T., Righetti P. G. (1974) *Abstr. Communs. 9th Meet. Fed. Europ. Biochem. Soc.*, Budapest, p. 432.
32. Awdeh Z. L. (1969) *Sci. Tools*, **16**, 42—43.
33. Felgenhauer K., Rak S. J. (1973) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 147—152.
34. Frater R. (1970) *Anal. Biochem.*, **38**, 536—538.
35. Wadstrom T., Mollby R., Wretling B. (1974) *Sci. Tools*, **21**, 2—4.
36. Righetti P. G., Righetti A., Bianchi B., Galante E. (1975) *Anal. Biochem.*, **63**, 423—432.
37. Frater R. (1970) *J. Chromatogr.*, **50**, 469—474.
38. Hayes M. B., Wellner D. J. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6636—6644.
39. Wallevik K. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **322**, 75—87.
40. Vesterberg O. (1969) *Sci. Tools*, **16**, 24—27.
41. Vesterberg O. (1971) *Methods in Enzymology*, **22**, 389—411.
42. Baumann G., Chrambach A. (1975) *Anal. Biochem.*, **64**, 530—536.
43. Arlinger L. (1972) LKB-Application Note No. 67, Sweden.
44. Beckers J. L., Everaerts F. M. (1970) *J. Chromatogr.*, **51**, 339—342.
45. Kopwillem A., Lundin H. (1974) LKB-Application Note No. 183, Sweden.
46. Kopwillem A., Moberg U. (1974) *Abstr. Communs. 9th Meet. Fed. Europ. Biochem. Soc.*, Budapest, p. 426.
47. Kopwillem A. (1973) LKB-Application Note No. 60, Sweden.
48. Kopwillem A. (1973) LKB-Application Note No. 59, Sweden.
49. Hjalmarsson S., Kopwillem A., Sjodin B., Karlsson J. (1974) *Abstr. Communs. 9th Meet. Fed. Europ. Biochem. Soc.*, Budapest, p. 426.
50. Arlinger L. (1974) *Abstr. Communs. 9th Meet. Fed. Europ. Biochem. Soc.*, Budapest, p. 426.
51. Kjellin K. G., Moberg U., Hallander L. (1975) *Sci. Tools*, **22**, 3—7.
52. Kopwillem A. (1974) LKB-Application Note No. 110, Sweden.
53. Everaerts F. M., Backers J. L., Verheggen Th. P. E. M. (1973) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 419—444.
54. Vestermark A. (1970) *Sci. Tools*, **17**, 24—26.
55. Kopwillem A., Moberg U., Westin-Sjodahl G., Lundin R., Siewertsson H. (1975) *Anal. Biochem.*, **67**, 166—181.
56. Stankoviansky S., Cicmanec P., Koniansky D. (1975) *J. Chromatogr.*, **106**, 131—138.
57. Arlinger L. (1971) *Protides Biol. Fluids*, **19**, 513—520.
58. Arlinger L., Routs R. (1970) *Sci. Tools*, **17**, 21—24.
59. Arlinger L. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **393**, 396—403.
60. «Tachophor» (1975) *Sci. Tools*, **22**, 13—14.
61. Righetti P. G., Secchi C. (1972) *J. Chromatogr.*, **72**, 165—175.
62. Shuster L. (1971) *Methods in Enzymology*, **22**, 412—433.
63. Clemmensen I. (1973) *Sci. Tools*, **20**, 7—8.
64. Clemmensen I., Svendsen P. J. (1973) *Sci. Tools*, **20**, 5—6.
65. Ohman J. (1973) LKB-Application Note No. 64, Sweden.
66. Kapadia G., Chrambach A. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 90—102.
67. Jovin T. M. (1973) *Biochemistry*, **12**, 879—890.
68. Jovin T. M. (1973) *Biochemistry*, **12**, 890—898.
69. Jovin T. M. (1973) *Biochemistry*, **12**, 871—879.
70. Bog-Hansen T. C., Bjerrum O. J., Svendsen P. J. (1974) *Sci. Tools*, **21**, 33—34.
71. Svendsen P. J., Lowenstein H. (1974) *Abstr. Communs. 9th Meet. Fed. Europ. Biochem. Soc.*, Budapest, p. 426.

72. Chrambach A., Rodbard D. (1971) Science, **172**, 440 — 451.  
 73. Dante M. L., Chrambach A. (1972) Science, **175**, 95.  
 74. Jovin T. M., Dante M. L., Chrambach A. (1970) Multiphasic Buffer Systems Output, Springfield, Virginia, National Technical Information Service, PB No. 196085—196092 and 203016.  
 75. Catsimpoolas N., Kenney J. (1972) Biochim. et biophys. acta, **285**, 287—292.  
 76. Chrambach A., Kapadia G., Cantz M. (1972) Separation Sci., **7**, 785—816.  
 77. Doerr P., Chrambach A. (1971) Anal. Biochem., **42**, 96—107.  
 78. Griffith A., Catsimpoolas N. (1972) Anal. Biochem., **45**, 192—201.  
 79. Griffith A., Catsimpoolas N., Kenney J. (1973) Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 457—474.  
 80. Rodbard D., Leviton C., Chrambach A. (1972) Separation Sci., **7**, 705—723.  
 81. Routs R. J. (1973) Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 445—456.  
 82. Rodbard D., Chrambach A. (1971) Anal. Biochem., **40**, 95—133.  
 83. Dirksen M. L., Chrambach A. (1972) Separation Sci., **7**, 747—772.  
 84. Hjerten S. (1962) Arch. Biochem. and Biophys., Suppl. 1, 147.  
 85. Dingman C. W., Peacock A. C. (1968) Biochemistry, **7**, 659—668.  
 86. Svendsen P. J. (1973) Sci. Tools, **20**, 1—4.  
 87. Curvetto N. R., Balmaceda N. A., Orioli G. A. (1974) J. Chromatogr., **93**, 248—250.  
 88. Rosenbaum T., Svendsen P. J. (1973) LKB-Application Note No. 81, Sweden.  
 89. Svendsen P. J., Rose C. (1970) Sci. Tools, **17**, 13—17.  
 90. Стронгин А. Я., Левин Е. Д., Степанов В. М. (1973) Химия природн. соедин., № 5, 581—597.  
 91. Vesterberg O. (1973) Sci. Tools, **20**, 22—29.  
 92. Vesterberg O. (1972) Biochim. et biophys. acta, **257**, 11—19.  
 93. Otavsky W. I., Drysdale J. W. (1975) Anal. Biochem., **65**, 533—536.  
 94. Eng P. R., Parkes C. O. (1974) Anal. Biochem., **59**, 323—325.  
 95. Ragland W. L., Pace J. L., Kemper D. L. (1974) Anal. Biochem., **59**, 24—33.  
 96. Udenfriend S., Stein S., Bohlen P., Dairman W., Leimgruber W., Weigle M. (1972) Science, **178**, 871—872.  
 97. Benson J. R., Hare P. E. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 2324—2328.

Поступила в редакцию  
30.XII.1975

## ISOTACHOPHORESIS AS A METHOD FOR BIOPOLYMER SEPARATION

STRONGIN A. Ya., LEVIN E. D., STEPANOV V. M.

*Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow*

The review is devoted to theory and practice of isotachophoresis. The preparative and analytical variants of the method are described, namely acrylamide gel isotachophoresis and capillary isotachophoresis. The chemical and biological properties of the amphoteric ampholytes-«ampholines» usually used as spacer ions in isotachophoretic runs are discussed. Several examples of isotachophoretic analysis of proteins and peptides are given. The experimental procedures for polyacrylamide gel isotachophoresis on analytical or preparative scale are described in detail.