



УДК 547.96.03:543.545

БОРАТ-ПОЛИОЛЬНЫЙ рН-ГРАДИЕНТ.
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ПРИМЕНЕНИЕ
ДЛЯ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

Трещукий Г. В., Ажицкий Г. Ю.

Крымский государственный медицинский институт, Симферополь

Описана система искусственных борат-полиольных рН-градиентов для изоэлектрического фокусирования в диапазоне $2,0 \leq \text{pH} \leq 12,0$. Стабильность этих градиентов определяется в основном степенью диссоциации компонентов буферного раствора. Приведены примеры фракционирования различных белков.

Изоэлектрическое фокусирование является методом разделения белков и других амфотерных веществ. В его основе лежит электрофорез амфолинов в условиях продольного рН-градиента [1—4], причем для создания последнего обычно применяют амфолины [5, 6]. В некоторых случаях разделение при этом сопровождается артефактами [7—9], в частности из-за образования комплексов белок — амфолин [10, 11].

Наряду со спонтанно образующимся при электрофорезе амфолиновым рН-градиентом в принципе можно использовать заранее созданный, так называемый искусственный рН-градиент. Обычно считают, что этот тип градиента легко разрушается под действием электрического тока, однако Свенсон теоретически показал, что с помощью слабых кислот и их солей с сильными основаниями (например, уксусной кислоты и ацетата натрия) можно создавать устойчивые градиенты [5]. Нами ранее был описан метод создания стабильного рН-градиента в растворе борной кислоты и боратов за счет градиента концентрации полигидроксильного соединения. Этот метод был использован для фракционирования ряда белков в диапазоне $2 \leq \text{pH} \leq 10$ [12—14].

В настоящей статье приводятся некоторые теоретические соображения, важные для понимания принципа данного типа искусственного рН-градиента, а также несколько новых примеров его применения для фракционирования белков.

Как известно, амфолиновый рН-градиент образуется в результате того, что амфолины располагаются при электрофорезе в последовательности их изоэлектрических точек; такой градиент по своей природе дискретен и стационарен в электрическом поле. Устойчивость градиента определяет успех разделения, поскольку компоненты смеси исследуемых амфолинов концентрируются в зонах, где рН отвечает их изоэлектрической точке (о фокусировке в нестационарном градиенте см. [11]).

Искусственный рН-градиент создается наплавлением в вертикальной колонке растворов кислоты или основания переменной концентрации (рис. 1). Этот градиент в электрическом поле нестационарен и в ходе электрофореза разрушается. Практически, однако, достаточно, чтобы время его разрушения было меньше времени разделения белков [15, 16]. На рис. 2 сопоставлено изоэлектрическое фокусирование гемоглобина в амфолиновом и искусственном рН-градиенте. В обоих случаях белок исходно был равномерно распределен в растворе, заполняющем колонку. В случае формирующегося амфолинового градиента белок собирается в области своей изоэлектрической точки, двигаясь к ней двумя зонами со стороны обоих электродов, тогда как в искусственном, заранее созданном градиенте очень быстро образуется одна постепенно сужающаяся зона. Опыт показывает, что для определения изоэлектрической точки не имеет значения

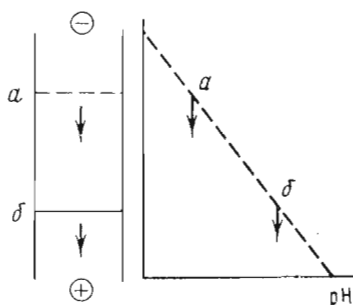


Рис. 1

Рис. 1. Схема pH-градиента, образованного градиентом концентрации кислоты. Стрелками показано движение концентрационных зон *a* и *б* в электрическом поле

Рис. 2. Распределение белка в колонке при изоэлектрическом фокусировании гемоглобина (выделен из эритроцитов) в pH-градиенте, образуемом амфотинами (*a*, pH 3–10), и в борат-полиольном градиенте (*б*, pH 4–10). Время (ч): 1 – 0; 2 – 10; 3 – 48; 4 – 0; 5 – 10; 6 – 24

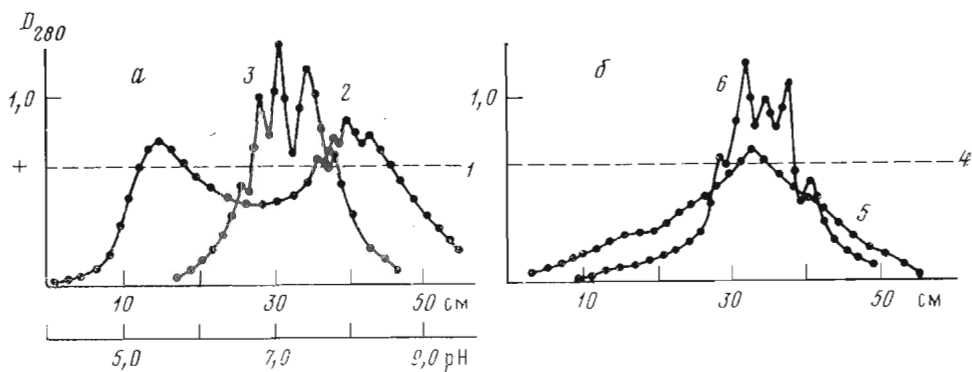


Рис. 2

нестационарность pH-градиента и его форма, лишь бы градиент к концу разделения был настолько протяженным, чтобы можно было точно измерить pH в зоне фокусирования, а сама эта зона была достаточно узка.

Главным недостатком искусственных pH-градиентов, предложенных Свенсоном, является большая электропроводность раствора и связанная с ней необходимость эффективного отвода тепла. Нам неизвестны работы, где такие градиенты использовались бы в практических целях.

Разработанный нами метод создания pH-градиента основан на способности борной кислоты увеличивать свою кислотность в присутствии полиолов. В колонке или в столбике геля, содержащих раствор борной кислоты, создается градиент концентрации полиола, например глицерина или маннита. Распределение pH в такой системе может быть представлено уравнением

$$\text{pH} = A - B \lg c_p,$$

где *A* и *B* – константы, а *c_p* – концентрация полиола. Таким образом, линейному градиенту концентрации соответствует логарифмический pH-градиент.

Уменьшение pH растворов борной кислоты при введении в них полиолов определенного строения обусловлено образованием борат-полиольных комплексов, являющихся значительно более сильными кислотами, чем борная [17]. Согласно Антикайнену [18–20], кажущаяся константа диссоциации борат-полиольного комплекса (*K^{**}*) описывается уравнением

$$\text{p}K^{**} = \text{p}K' - n \lg c_p,$$

где *K'* – константа, величина которой зависит от концентрации бората. Если для простоты допустить, что в системе, где создается pH-градиент, образуется комплекс постоянного состава *B_mP_n*, легко показать, что локальные значения pH зависят только от концентрации его компонентов:

$$\text{pH} = \frac{1}{2} (\text{p}K^* - m \lg c_B - n \lg c_P),$$

Свойства боратных комплексов полиолов

Полиол	рК *	Концентрация полиолов		рН *	$U_{гр} \cdot 10^3$, см ² · В ⁻¹ · с ⁻¹ *	$U_a^{**} \cdot 10^5$, см ² · В ⁻¹ · с ⁻¹
		%	М			
Сахароза	7,26±0,1	5	0,13	8,5	1,0±0,1	7,0±0,2
		30	0,88	7,6	0,5±0,15	
Маннит	2,75±0,15	5	0,27	5,1	6,9±0,8	54,0±0,5
		10	0,55	4,65	4,0±1,0	
Ксилит	3,92±0,1	5	0,33	4,95	7,5±1,5	47,0±0,4
		30	1,97	4,00	1,1±0,5	
Глицерин	6,54±0,12	5	0,55	7,6	1,9±1,0	32,0±0,2
		30	0,88	6,1	0,7±0,3	

* Измерены в растворах, содержащих полиолы в указанной концентрации и 0,01 М буру.
** U_a — подвижность борат-полиольных анионов.

где c_b — концентрация борной кислоты, рК* — отрицательный логарифм константы равновесия реакции комплексообразования (табл. 1).

Данные, приведенные на рис. 3, показывают применимость этого уравнения в случае глицерина и маннита. Поскольку при его выводе мы пренебрегли диссоциацией борной кислоты, с уменьшением концентрации полиола вычисленное предельное значение рН такое же, как у соответствующего буфера.

Используя известное уравнение Гендерсона — Хассельбаха, можно получить концентрационную зависимость рН для борат-полиольных буферных растворов:

$$\text{pH} = \text{pK}^* - n \lg c_p + \lg \frac{c}{c_b},$$

где c — концентрация бората.

Ясно, что, применяя вместо раствора борной кислоты боратные буферные растворы, можно расширить диапазон изменения рН. На ширину рН-градиента влияет также выбор полиола: при использовании маннита (рК* 2,75) или ксилита (рК* 3,92) он будет шире, чем с сахарозой (рК* 7,26).

Образование комплексов между борной кислотой и полиолами обычно используется для электрофоретического разделения последних. В данном случае электрофорез комплексов является причиной разрушения рН-градиента (рис. 4). Скорость концентрационной границы комплекса ($U_{гр}$) может быть описана уравнением

$$U_{гр} = U_a \cdot \frac{(1-g) \cdot c + 10^{-\text{pH}}}{c_p},$$

где U_a — абсолютная скорость комплексного аниона, g — степень гидролиза. Очевидно, что из-за малой степени диссоциации в кислой среде эта скорость будет мала. В щелочной области увеличение концентрации бората приводит к уменьшению устойчивости рН-градиента.

Таким образом, анализ этого уравнения позволяет наметить несколько путей стабилизации искусственного борат-полиольного рН-градиента. Первый из них — использование разбавленных буферных растворов. Ранее было показано, что подобные рН-градиенты достаточно стабильны при концентрации Na-боратного буфера 0,001 М [12]. Даже в диапазоне $9 \leq \text{pH} \leq 12$ стабильный рН-градиент можно получить, используя раствор 0,001 М буры, содержащий 0,001 М трис и 0,0075 М NaOH, в котором создается градиент концентрации сахарозы. Малая буферная емкость сама по себе не влияет на разделение белков, поскольку их концентрация обычно значительно меньше концентрации буфера. Недостатком этого метода стабилизации рН-градиента являются ограничения для белков.

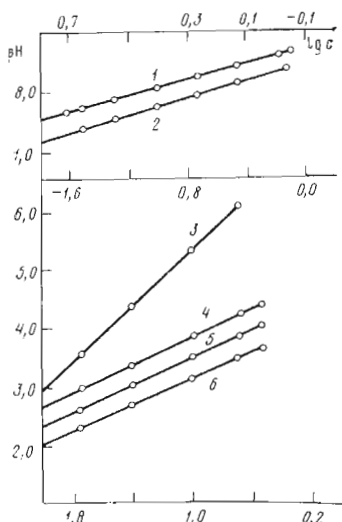


Рис. 3

Рис. 3. Влияние на рН борат-полиольных растворов изменений концентрации глицерина (1 – трис-борат, рН 8,4), борной кислоты (2 – глицерин 4,89 М) и маннита (3 – бура 0,1 М; 4 – борная кислота 0,01 М; 5 – борная кислота 0,1 М; 6 – борная кислота 0,5 М)

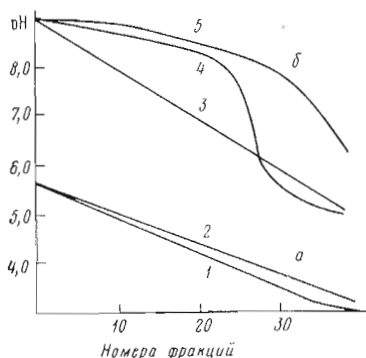


Рис. 4

Рис. 4. Изменения профиля борат-полиольных рН-градиентов (а – глицерин 0–50% в растворе 0,1 М борной кислоты; б – глицерин 0–50% в растворе 0,01 М буры) (20 В/см). Время (ч): 1, 3 – 0; 2 – 4; 4 – 10; 5 – 20

растворяющихся только в средах с высокой ионной силой. В этом случае ионную силу буферного раствора можно увеличить, вводя в него какой-либо другой электролит (например, NaCl), однако при этом необходимо более эффективно охлаждать колонку.

Второй путь основан на использовании буферных растворов, содержащих борную кислоту и слабое основание. Если кислота и основание, характеризующиеся соответственно pK_a и pK'_a , присутствуют в равных концентрациях, рН можно оценить с помощью уравнения

$$pH = \frac{pK_a + pK'_a}{2}.$$

Например, в буферном растворе, содержащем эквимольные количества борной кислоты (pK_a 9,23) и триса (pK'_a 8,08), $pH=8,65$. Чтобы сдвинуть градиент в щелочную сторону, необходимы более сильные основания, однако при этом увеличивается степень диссоциации соответствующего бората и устойчивость градиента уменьшается (ср. табл. 2–4).

Третий путь стабилизации – применение набора полиолов с различной эффективной электрофоретической подвижностью. Если в колонке создать рН-градиент так, чтобы в нижней, более кислой его части находился полиол с высокой подвижностью (иными словами, его боратный комплекс – наиболее сильная кислота), в средней части – полиол со средней подвижностью, а в верхней, наиболее щелочной области – наименее подвижный полиол, то подобный составной рН-градиент будет оптимальным по устойчивости и в то же время предельно широк. Составной градиент можно рассчитать, исходя из абсолютных подвижностей борат-полиольных анионов.

Из большого числа обследованных полиолов мы остановились на группе соединений, приведенной в табл. 1. Учитывая, что свободная гликозидная группа может реагировать с некоторыми белками [21], мы отказались от применения восстанавливающих сахаров и использовали сахарозу и полиспирты. В работе [22] было показано, что их влияние на конформацию альбумина, иммуноглобулинов и других белков в условиях борат-полиольной иоэлектрической фокусировки минимально и обратимо. Для получения рН-градиентов в области высоких значений рН мы применяли

рН трис-боратного буфера

Концентрация, М		рН		ΔрН
борная кислота	трис	без маннита	0,8 М маннит	
0,1	0	5,12	1,92	3,20
0,07	0,03	7,75	3,20	4,25
0,05	0,05	8,65	5,54	3,11
0,03	0,07	8,73	8,20	0,53

Таблица 3

Борат-полиольные комплексы. Степень диссоциации (α) и удельная электропроводность (κ) растворов

Состав раствора	Концентрация, М	рН	κ , Ом ⁻¹	α
Борная кислота	0,5	4,76	$4,0 \cdot 10^{-6}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$
Борная кислота, глицерин	0,5	3,22	$6,4 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$
Na-борат, маннит	0,05	8,5	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-1}$
	0,83	4,4	$6,2 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-1}$
Трис-борат, маннит	0,05	8,5	$3,2 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$
	0,83	4,5	$5,5 \cdot 10^{-5}$	$8,0 \cdot 10^{-3}$

Таблица 4

Растворы для составления борат-полиольного рН-градиента

«Щелочной» раствор	«Кислый» раствор	Диапазон рН	Время жизни, ч
H ₃ BO ₃ 0,5 М	H ₃ BO ₃ 0,5 М, ксилит 3,28 М	4,76–2,10	240
H ₃ BO ₃ 0,05 М, трис 5 мМ	H ₃ BO ₃ 0,05 М, трис 5 мМ, глицерин 3,26 М	7,00–4,00	240
H ₃ BO ₃ 0,05 М, трис 0,045 М	H ₃ BO ₃ 0,05 М, трис 0,045 М, глицерин 4,34 М	8,40–6,00	>72
H ₃ BO ₃ 0,1 М, трис 5 мМ, диэтил-амин 0,13 М	H ₃ BO ₃ 0,1 М, трис 5 мМ, диэтил-амин 0,13 М, глицерин 4,34 М, сахараза 0,58 М	10,0–6,00	>48
Na ₂ B ₄ O ₇ 1 мМ, NaOH 7 мМ, трис 1 мМ	Na ₂ B ₄ O ₇ 1 мМ, NaOH 7 мМ, трис 1 мМ сахараза 1,75 М	12,0–9,6	>48

сахарозу, а при малых рН — ксилит. Никаких артефактов, обусловленных взаимодействием белков с компонентами градиента, в этих условиях не наблюдалось. В табл. 5 приведен рН-градиент, эффективный в относительно узком диапазоне рН. Однако при желании можно создавать широкие рН-градиенты, удобные для предварительных, обзорных экспериментов (табл. 6).

Применение борат-полиольных рН-градиентов для изоэлектрической фокусировки альбумина, актиноксантина и других белков описано ранее [12, 13, 22–24]. В данной работе приведены (рис. 5, 6) другие примеры успешного использования этих градиентов для разделения и очистки различных белков.

Экспериментальная часть

В работе использовали стандартную смесь белков, ферритин, овальбумин, β-лактоглобулин, цитохром с, γ-глобулин человека, каталазу производства фирмы «Serva» (ФРГ), рибонуклеазу (Sigma, США), пепсин свиньи (Merck, ФРГ). Нормальный сывороточный альбумин человека и альбумин больного циррозом печени выделены электрофоретически, ге-

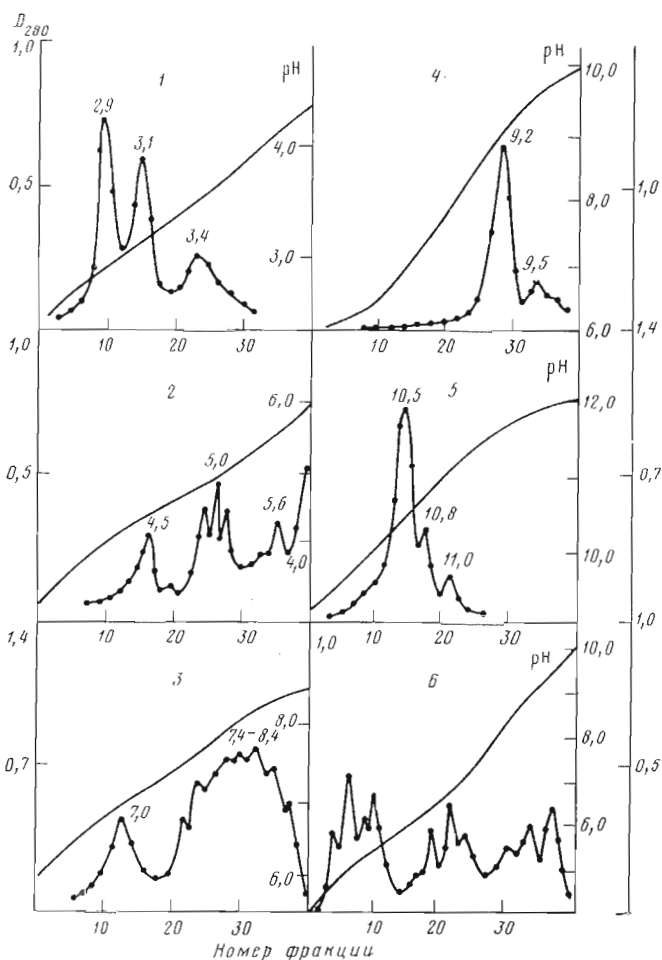


Рис. 5. Изофокусирование белков в борат-полиакриловых системах в различных диапазонах рН: 1 — пепсин свиньи (фракции с рI 3,1 и 3,4 обладают протеолитической активностью); 2, 6 — стандартная смесь белков (рI: ферритин 4,5, овальбумин 4,7–5,1, β -лактоглобулин 5,6); 3 — γ -глобулин человека; 4 — рибонуклеаза (оба пика обладают активностью); 5 — цитохром с (все три белковых компонента содержат гем)

магглутинин вируса гриппа получен аффинно.

Изофокусирование проводили в стеклянной колонке, конструкция которой описана ранее [13]. При охлаждении проточной водой (10–15° С) достигали плотности тока 5 мА/см² при напряжении 20 В/см (тепловыделение 0,1 Вт/см³). При большем тепловыделении в качестве хладагента использовали антифриз, охлажденный ниже 0° С. Чтобы уменьшить перемешивание при отборе фракций, жидкость из колонки отсасывали сверху насосом через капилляр, который был укреплен на устройстве, следящем за уровнем жидкости с помощью контактного датчика (рис. 7).

Борную кислоту (ч.д.а.) перекристаллизовывали. Полиолы предварительно очищали электрофорезом в течение суток из концентрированного водного раствора в препаративной колонке, описанной в работе [14]. Иногда для этой цели применяли пограничное фокусирование [25]. Акриламид очищали перекристаллизацией из бензола, а метиленбисакриламид — экстракцией хлороформом.

Для создания рН-градиента использовали два или три исходных раствора, которые затем смешивали с помощью градиентного смесителя или вручную. Например, для приготовления рН-градиента 2,0–4,0 готовили раствор 0,5 М борной кислоты, содержащий ксилит, который затем с помощью градиентного смесителя смешивали с раствором 0,5 М борной кис-

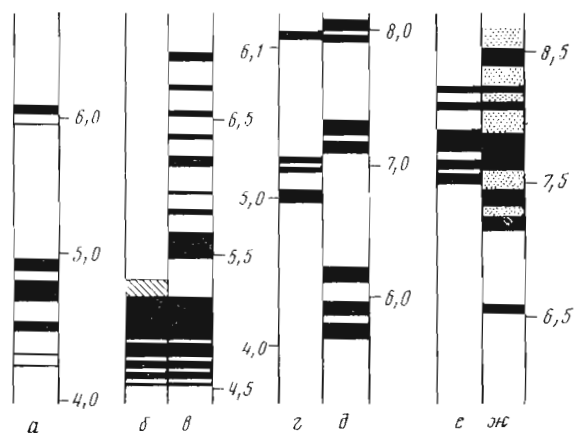


Рис. 6. Гель-изофокусирование белков в борат-полиольной системе: а — овалбумин, б — нормальный сывороточный альбумин человека, в — альбумин больного циррозом печени, г — гемагглютинин вируса гриппа, д — стандартная смесь белков, е — каталаза, ж — γ -глобулин человека (штриховка отражает фоновую окраску геля). Сбоку указаны локальные значения pH

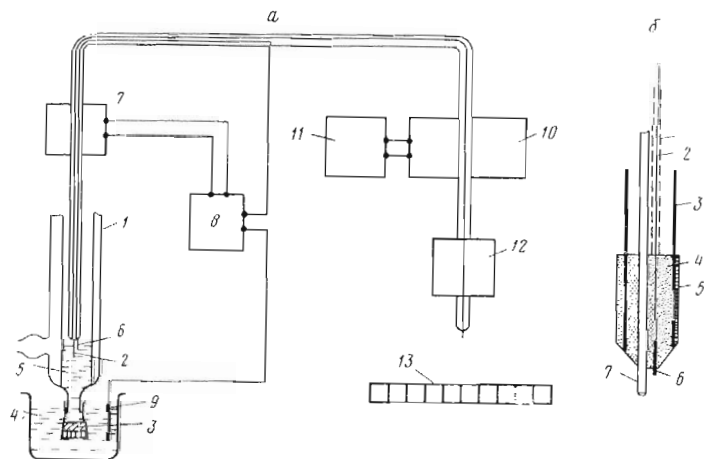


Рис. 7. Установка для отсасывания содержимого из колонки. а — Общая схема: 1 — колонка с рубашкой охлаждения; 2 — отсасывающий капилляр, 3 — колпачок с пористой стеклянной перегородкой, заполненный 6% акриламидным гелем, 4 — электродный буферный раствор, 5 — содержимое колонки, 6 — активный электрод пробоотборника, 7 — устройство протяжки пробоотборника, 8 — высокоомный усилитель, 9 — пассивный электрод, 10, 11 — проточный денситометр и самописец, 12 — перистальтический насос, 13 — коллектор. б — Головка пробоотборника: 1 и 2 — экранированный провод активного электрода, 3 — полиэтиленовая трубка (наружный диаметр 0,5 см), 4 — эпоксида смола, 5 — тефлоновая головка, 6 — платиновый электрод, 7 — отсасывающий полиэтиленовый капилляр (внутренний диаметр 1,5 мм)

лоты. Если смешивание проводили вручную, то градиент создавали как последовательность из ступеней изменения pH, наплавляя в колонку соответствующие растворы. В любом случае внизу оказывается раствор с наименьшим pH, имеющий наибольшую плотность. Ступенчатый градиент быстро сглаживается благодаря диффузии и электрофорезу.

Для формирования pH-градиента в полнакриламидном геле использовали два способа: пропитку гелевой пластинки [24] или фотополимеризацию акриламида в предварительно сформированном pH-градиенте. В последнем случае растворы для создания ступенчатого pH-градиента готовили, исходя из буферного раствора, содержащего дополнительно 1,6 мг/л рибофлавина, 0,4 мл/л TEMED, затем добавляли полиол, приго-

Ступенчатый рН-градиент в диапазоне $5,5 \leq \text{pH} \leq 8,5$ *

V	pH	V	pH	V	pH	V	pH
100	8,50	97,0	7,65	82,0	6,80	48,0	6,00
99,6	8,35	96,2	7,50	76,5	6,65	38,9	5,80
99,2	8,20	94,5	7,35	68,6	6,50	22,9	5,65
98,4	8,00	93,8	7,20	63,3	6,35	0,00	5,50
97,5	7,80	87,3	7,00	57,1	6,20		

* V мл раствора 0,05 М борной кислоты и 0,045 М триса смешивают с 100—V мл этого же раствора, содержащего дополнительно 60% глицерина.

Таблица 6

Ступенчатый рН-градиент в диапазоне $4 \leq \text{pH} \leq 10$

V	pH *	V	pH	V ₁	pH **	V ₁	pH
20	9,60	10	8,20	20	6,70	10	5,40
18	9,50	8	7,80	18	6,50	8	5,10
16	9,40	6	7,50	16	6,25	6	4,85
14	9,05	4	7,15	14	6,00	4	4,60
12	8,65	2	6,85	12	5,70	2	4,30
						0	4,00

* В интервале $6,85 \leq \text{pH} \leq 9,6$ V мл буферного раствора (борная кислота 0,1 М, трис 5 мМ, диэтиламин 0,13 М), содержащего 5% сахарозы, смешивали с 20—V мл буферного раствора, содержащего вместо сахарозы 30% глицерина.

** В интервале $4,0 \leq \text{pH} \leq 6,7$ V₁ мл указанного выше буферного раствора, содержащего 30% глицерина, смешивали с 20—V₁ мл того же буферного раствора, содержащего вместо глицерина 60% ксилита.

товляя растворы для 10 ступеней рН-градиента, и к каждому из них добавляли цианогум до 7% (после добавления цианогума растворы необходимо хранить на холоду без света). Затем пакет из 12—14 стандартных трубочек для гель-электрофореза помещали в стакан или короткий цилиндр, после чего насосом через капилляр, олущенный на дно стакана, закачивали вначале буферный раствор, а затем последовательно растворы, создающие градиент, начиная с наименее плотного. Заполненный стакан помещали между двумя—четырьмя лампами дневного света. Полимеризация заканчивается через 14—16 ч при рН 2,0—7,0 и через 6—8 ч при рН 7,0—12,0. Затем трубки извлекали и помещали в прибор для диск-электрофореза (Reanal, ВНР). В качестве электродного раствора использовали исходный буферный раствор.

Электрофокусирование проводили в течение 16—18 ч при напряжении 200 В, затем гель извлекали из трубки и резали вдоль на две части. Одну часть в течение 1 ч окрашивали в растворе 0,1% бромфенолового синего в 7% уксусной кислоте, а другую использовали для измерения рН посредством микроэлектродов (Radiometer, Дания) или по методике, описанной в работе [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Svensson H. Acta chem. scand., 1961, v. 15, № 2, p. 325—343.
2. Svensson H. Acta chem. scand., 1962a, v. 16, № 3, p. 456—466.
3. Vesterberg O. Acta chem. scand., 1966, v. 20, № 4, p. 820—834.
4. Vesterberg O. Acta chem. scand., 1967, v. 21, № 1, p. 206—216.
5. Caststimpoolas H. In: Isoelectric focusing. N. Y.: Acad. Press, 1976, p. 71—73.
6. Righetti P. G., Drysdale J. W. In: Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1976, p. 590.
7. Hare D. L., Stimpson D. J., Cann J. R. Arch. Biochem. and Biophys., 1978, v. 187, № 2, p. 274—275.
8. Guengerich P. P. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 577, № 1, p. 132—141.
9. Olavsky W. J., Drysdale J. W. Analyt. Biochem., 1975, v. 65, № 3, p. 533—536.
10. Righetti P. G., Brown R. P., Stone A. L. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 542, № 2, p. 232—244.

11. *Gianazza E., Astorri C., Righetti P. G.* J. Chromatography, 1978, v. 166, № 1, p. 55–64.
12. *Troitsky G. V., Zavjalov V. P., Kiryukhin I. F., Abramov V. M., Agitsky G. Yu.* Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 400, № 1, p. 24–31.
13. *Ажицкий Г. Ю., Троицкий Г. В., Малый К. Д.* Биохимия, 1976, т. 41, № 4, с. 597–603.
14. *Решетов П. Д., Жигис Л. С., Стерлигова Н. Н., Ажицкий Г. Ю.* Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1476–1482.
15. *Kolin A. J.* Chem. Phys., 1954, v. 22, № 9, p. 1628–1629.
16. *Kolin A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1955, v. 41, № 1, p. 101–110.
17. *Везер У.* В кн.: Структура и связь. М.: Мир, 1969, с. 251–272.
18. *Antikainen P. I.* Suom. Kem., 1958, B-31, p. 255.
19. *Antikainen P. I.* Acta chem. scand., 1959, v. 13, № 2, p. 312.
20. *Antikainen P. I., Rossi V. M. K.* Suom. Kem., 1959, B-32, p. 180–185.
21. *Dolhofer R., Wieland O. H.* FEBS Lett., 1979, v. 103, p. 282.
22. *Азмед М.* Использование борат-полиольной изофокусирующей системы для изучения изоэлектрических спектров сывороточного альбумина человека. Автореф. дис. . . канд. биол. наук / Крымский государственный мед. ин-т. Симферополь, 1980. 20 с.
23. *Троицкий Г. В., Азмед М., Ажицкий Г. Ю., Багдасарьян С. Н., Гаевская В. А., Клишевич Н. Р., Шевцов В. Д.* Вопр. мед. химии, 1980, № 1, с. 133–136.
24. *Ажицкий Г. Ю., Азмед М., Троицкий Г. В.* Вопр. мед. химии, 1980, № 1, с. 133–136.
25. *Ажицкий Г. Ю., Петренко В. Ф., Троицкий Г. В.* В кн.: Тезисы 5 Всес. симпоз. по химии и физике белков и пептидов. Баку, 1980, с. 34.

Поступила в редакцию
30.III.1981
После доработки
30.XI.1981

BORATE-POLYOL pH GRADIENT. A THEORETICAL BASIS AND APPLICATION FOR PROTEIN ISOELECTROFOCUSING

TROITSKY G. V., AZHITSKY G. Yu.

Crimean State Medical Institute, Simpheropol

A system of artificial borate-polyol pH-gradients for isoelectrofocusing in the $2 \leq \text{pH} \leq 12$ range is described. The stability of these gradients is determined mainly by the dissociation degree of the buffer components. Application of the system is illustrated by separation of various proteins.