

УДК 543.545

## ПРОТОЧНОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛ И ЧАСТИЦ, СОПУТСТВУЮЩЕЕ КАПИЛЛЯРНОМУ ЗОННОМУ ЭЛЕКТРОФОРЕЗУ \*

© 1995г. В.П. Андреев, Ю.В. Степанов

*Институт аналитического приборостроения, Санкт-Петербург*

Поступила в редакцию 14.11.94

Исследованы удерживание и разрешающая способность нового метода разделения — проточного фракционирования, сопутствующего капиллярному зонному электрофорезу. Показано, что метод может быть использован для фракционирования фрагментов ДНК.

Математическая модель капиллярного зонного электрофореза, учитывающая неоднородность профиля электроосмотического потока и взаимодействие частица-стенка [1], позволила обнаружить существование при капиллярном электрофорезе в низко концентрированных буферных растворах второго механизма разделения, а именно, проточного фракционирования в поле двойного электрического слоя. Для реализации проточного фракционирования, сопутствующего капиллярному зонному электрофорезу (ПФКЗЭ), необходимо, чтобы притяжение частиц к стенке и неоднородность профиля электроосмотического потока были достаточно сильны, т.е. дзета-потенциал стенки достаточно велик, а концентрация буфера достаточно низка. Ниже излагается более подробное исследование ПФКЗЭ, частично опубликованное нами в [2]. На рис.1 изображена зависимость удерживания  $R$  частицы с эффективным зарядом  $Z = 2.57e$  ( $e$  — заряд электрона; дробное значение  $Z$  возможно благодаря влиянию буфера) от концентрации буфера. Удерживание рассчитывалось следующим образом: вычислялась скорость частицы с учетом взаимодействия частица-стенка и делилась на скорость частицы без учета взаимодействия со стенкой.

Значения дзета-потенциала  $\zeta$ , напряженности электрического поля, радиуса капил-

ляра и коэффициента диффузии частиц на рис.1 — 5 одни и те же и указаны в подписи к рис.1. Рис.2 показывает зависимость удерживания от заряда частицы при фиксированном значении концентрации буфера  $C_0 = 10^{-5}$  М. Кривизна зависимости  $R(Z)$  максимальна при промежуточных значениях  $Z$ , и, соответственно, разрешение также должно быть максимальным при промежуточных значениях  $Z$ .

Зависимость разрешения  $R_s$  двух модельных объектов с электрическими зарядами, отличающимися на 10% и равными электрофоретическими подвижностями  $\mu$ , от заряда первого объекта при концентрации  $C_0 = 10^{-5}$  М представлены на рис.3. Начальная длина пробы здесь  $l_0 = 0.01$  М. Для сравнения на рис.4 приведены зависимости тех же объектов в буфере высокой концентрации  $C_0 = 0.1$  М. В этом случае разрешение очень низкое, поскольку электрофоретические подвижности частиц равны и нормальный капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) отсутствует, а ПФКЗЭ неэффективно при высоких концентрациях буфера в силу малой толщины двойного электрического слоя. Разрешение же при  $C_0 = 10^{-5}$  М достаточно велико в области  $Z = 1e \div 4e$ . Необходимо отметить, что минимум  $R_s$  в окрестности  $Z = 5e$  связан с переходом

\* Авторы благодарны Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку (проект РФФИ 94-03-08754).

от нормального (диффузионного) проточного фракционирования (ПФ) к стерическому ПФ. При больших значениях электрического заряда частицы столь интенсивно прижаты к стенке капилляра, что их продольная скорость начинает определяться уже толь-

ко радиусом частицы и, в случае достаточно большой скорости продольного потока, подъемной силой. На рис.5 показана зависимость разностей удерживаний  $\Delta R$  для рассматриваемых модельных объектов от заряда первого объекта.

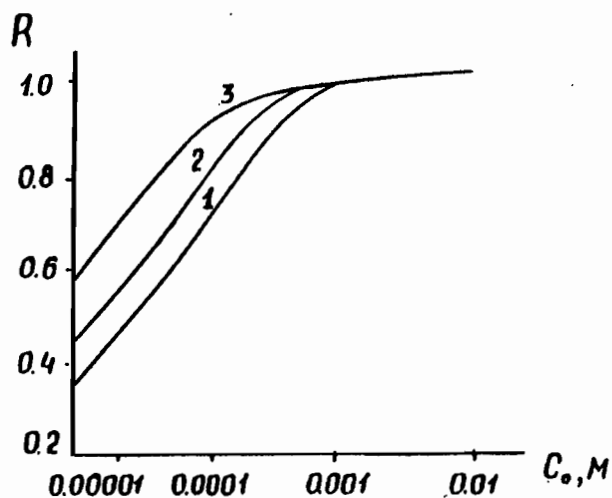


Рис.1. Зависимость удерживания от концентрации буферного раствора.  
 $\zeta = -100$  мВ,  $E_x = 50$  КВ/м,  $Z = 2.57e$ ,  
 $D = 5 \cdot 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с;  
 1 -  $a = 10$  мкм, 2 -  $a = 20$  мкм,  
 3 -  $a = 50$  мкм.

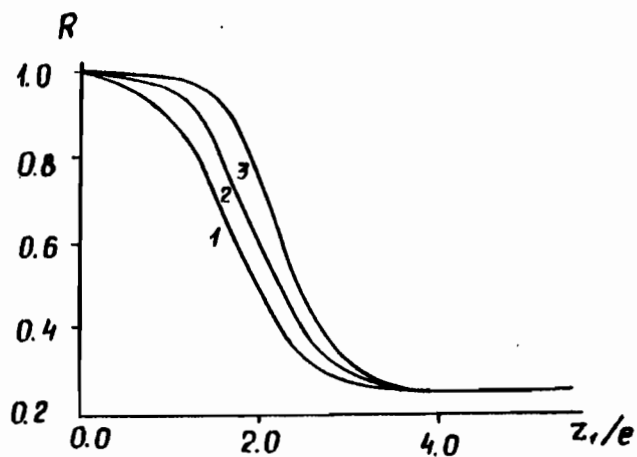


Рис.2. Зависимость удерживания от величины заряда фракционирующих частиц.  
 1 -  $a = 10$  мкм, 2 -  $a = 20$  мкм,  
 3 -  $a = 50$  мкм,  
 $C_0 = 10^{-8}$  М.

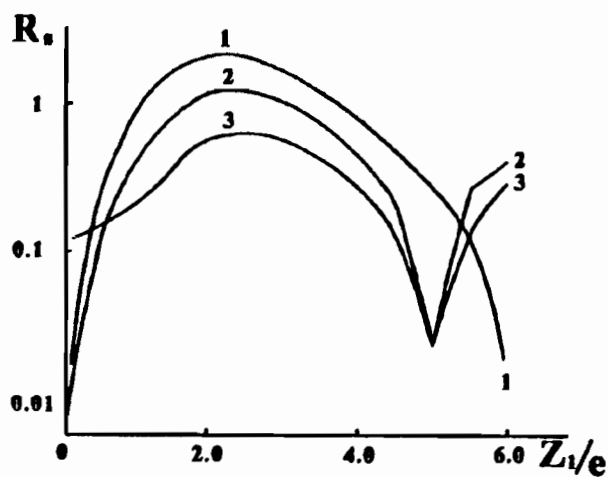


Рис.3. Зависимость разрешения от величины заряда фракционирующих частиц. Низкая концентрация буфера.  
 $Z_2 = 0.9Z_1$ ,  $D_2 = D_1/0.9$ ,  $C_0 = 10^{-8}$  М;  
 1 -  $a = 10$  мкм, 2 -  $a = 20$  мкм,  
 3 -  $a = 50$  мкм.

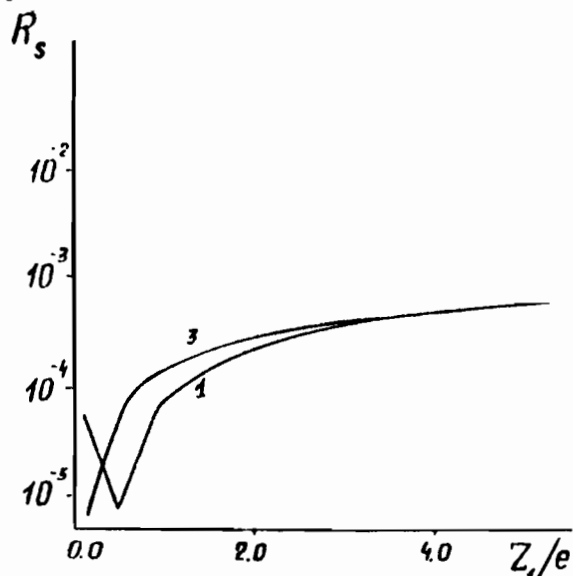


Рис.4. Зависимость разрешения от величины заряда фракционирующих частиц. Высокая концентрация буфера.  
 $Z_2 = 0.9Z_1$ ,  $D_2 = D_1/0.9$ ,  $C_0 = 10^{-4}$  М;  
 1 -  $a = 10$  мкм, 2 -  $a = 20$  мкм,  
 3 -  $a = 50$  мкм.

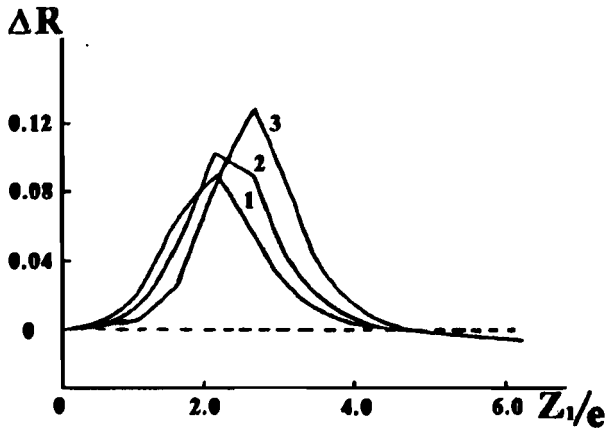


Рис.5. Зависимость разности удерживаний частиц, отличающихся по величине заряда на 10%, от величины заряда.  
 $Z_2 = 0.9Z_1$ ,  $D_2 = D_1/0.9$ ,  $C_0 = 10^{-8}$  М;  
 1 -  $a = 10$  мкм, 2 -  $a = 20$  мкм,  
 3 -  $a = 50$  мкм;  
 $\Delta R = R_2 - R_1$ .

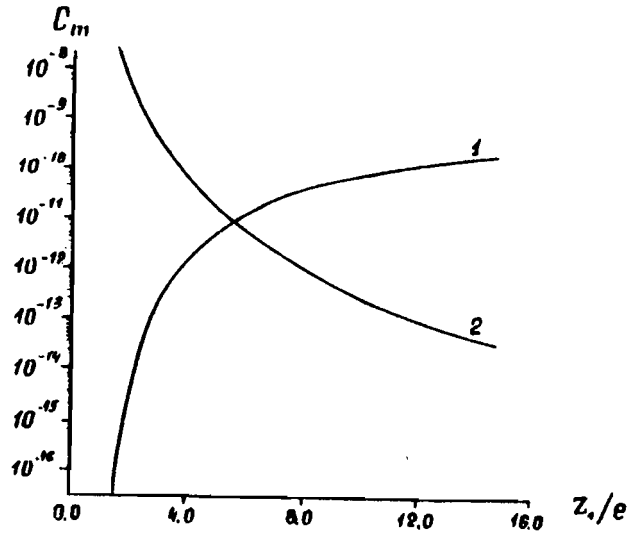


Рис.6. Зависимость коэффициента  $C_m$ , характеризующего тейлоровскую дисперсию, от заряда частиц.  
 $Z_p = 20e$ ,  $\zeta = -100$  мВ,  $C_0 = 10^{-8}$  М;  
 1 - без подъемной силы, 2 - с подъемной силой.

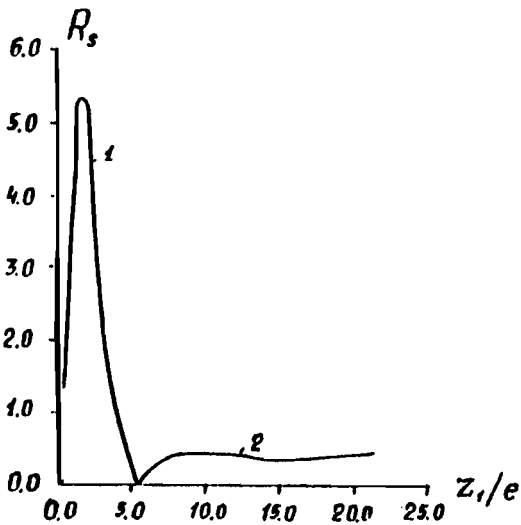


Рис.7. Зависимость разрешения частиц с отличающимися на 10% значениями заряда и равными электрофоретическими подвижностями от величины заряда.  
 $a = 1$  мм,  $L = 1$  м,  $E_s = 50$  КВ/м,  
 $C_0 = 10^{-8}$  М;  
 $\zeta = -100$  мВ,  $D_1 = 5 \cdot 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с,  
 $D_2 = 5.55 \cdot 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с,  $Z_2 = 0.9Z_1$ ;  
 $\mu_{cp1} = \mu_{cp2}$ ;  
 1 - нормальное ПФКЗЭ,  
 2 - стерическое ПФКЗЭ.

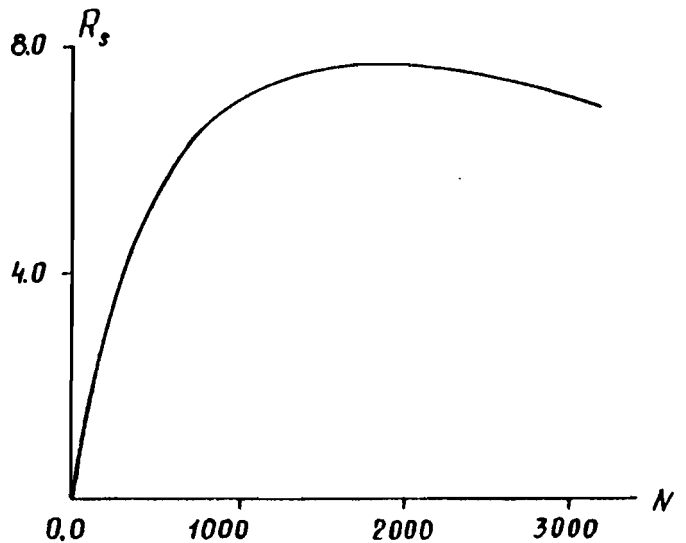


Рис.8. Стерическое ПФКЗЭ. Зависимость разрешения фрагментов ДНК от числа оснований.  
 $N_2 = 0.9N_1$ ,  $D_1Z_1 = D_2Z_2 = 6.2 \cdot 10^{-9}$  м<sup>2</sup>/с,  $E_s = 50$  КВ/м;  
 $a = 1$  мм,  $L = 1$  м,  $\zeta = 100$  мВ,  
 $\mu_{1cp} = \mu_{2cp}$ ,  $Z \sim N$ ,  $D \sim \frac{1}{N}$ .

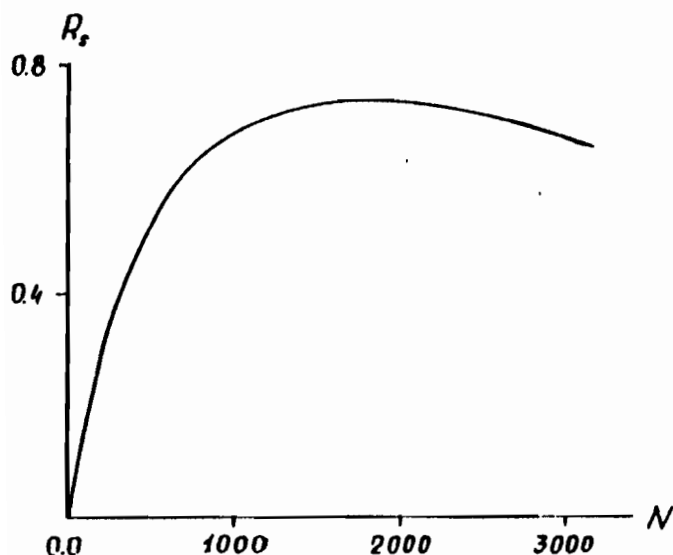


Рис.9. То же, что и на рис.8.  
 $Z_{p2} = 0.99Z_{p1}$ . Другие параметры такие же, как на рис.8.

Можно видеть, что  $\Delta R$  меняет знак в окрестности  $Z = 5e$ , что означает переход от нормального к стерическому механизму разделения.

Стерический вариант ПФКЗЭ может быть эффективным. Так, моделировалось разделение коротких фрагментов ДНК (20 и 22 основания). Было показано, что в модифицированном капилляре (дзета-потенциал +100 мВ) радиусом 20 мкм, при начальной длине пробы  $l_0 = 1$  мм и напряженности электрического поля  $E=50$  КВ/м, разделение указанных фрагментов может быть достигнуто в капилляре длиной 8 см за 43 сек.

Для исследования ПФКЗЭ более крупных частиц учитывалось гидродинамическое взаимодействие частица-стенка (lift force) [3]. Подъемная сила, действующая на частицу, пропорциональна кубу радиуса частицы и продольной скорости движения частицы. При ПФКЗЭ скорость частицы (электрофоретическая + электроосмотическая) достаточно мала, поэтому подъемная сила заметна только для субмикронных и более крупных частиц. На рис.6 изображены зависимости коэффициента  $C_m$  от электрического заряда частиц, рассчитанные с учетом и без учета подъемной силы. Различия в  $C_m$  весьма значительны и не приводят к большим различиям в разрешении только в силу того, что сами значения  $C_m$  в обоих случаях весьма малы, и определяю-

щей дисперсию пика пробы величиной является начальная длина пробы. Тем не менее, всюду далее разрешение рассчитывалось с учетом действия подъемной силы. На рис.7 изображена зависимость разрешения модельных объектов с равными электрофоретическими подвижностями, но отличающимися зарядами на 10% от заряда первого объекта. Первый пик  $Z < 5e$  соответствует нормальному (диффузионному) механизму ПФКЗЭ, а область  $Z > 5e$  – стерическому механизму ПФКЗЭ. Отметим, что коэффициенты диффузии, а следовательно, и радиусы частиц здесь фиксированы, поэтому разрешение в области стерического ПФКЗЭ практически не зависит от  $Z$ .

На рис.8 представлена ситуация, моделирующая разделение фрагментов ДНК, число оснований в которых отличается на 10%. При этом электрофоретическая подвижность не только одинакова для частиц обоих сортов, но и постоянна вдоль оси абсцисс. Размер же частиц и их заряд растут пропорционально  $N$ . Как следует из рис.8, возможно разделение по методу ПФКЗЭ достаточно длинных фрагментов ДНК, по крайней мере, до  $N = 3000$ . Максимум разрешения имеет место в районе  $N = 2000$ . Последующее убывание связано с тем, что радиус частицы становится соизмеримым с толщиной двойного электрического слоя. Действительно, для  $N = 2000$   $R_s = 0.08$  мкм, а дебаевская длина при  $C_0 = 10^{-5}$  М равняется  $K^{-1} = 0.1$  мкм.

На рис.9 рассмотрен более "жесткий" случай, когда число оснований в разделяемых фрагментах ДНК отличается всего на 1%, тем не менее, разделение и в этом случае оказывается возможным.

Представляется, что практическое значение предсказанного нового способа разделения заключается в возможности фракционировать как короткие, так и весьма длинные фрагменты ДНК без применения заполненных гелем капилляров и пульсирующих электрических полей. Предсказанный вариант разделения может оказаться также одним из наиболее простых способов реализации ПФ, учитывая существенно более высокую технологичность капилляров по сравнению с плоским каналом ПФ, а также возможность управлять величиной дзета-потенциала с помощью внешнего поперечного электрического поля [4].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Andreev V.P., Lisin E.E.* On the mathematical model of capillary electrophoresis // *Chromatographia*. 1993. V.37, №34. P.202-210.
2. *Andreev V.P., Lisin E.E.* On the prediction of the new separation mode: field-flow fractionation capillary zone electrophoresis 16th. Int. Symp. on Capillary Chromatography. Sep 1994. Riva del Garda, Italy. Proceedings. P. 1852-1856.
3. *Williams P.S., Koch T., Giddings J.C.* Characterization of near-wall hydrodynamic lift forces using sedimentation FFF // *Chem. Eng. Comm.* 1992. V.111. P.121-147.
4. *Lee C.S., MacManigill D., Wu C.T.* // *Anal. Chem.* 1991. V.63. P.1519-1523.