



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені В. Н. КАРАЗІНА

**А. Ю. Куліков**  
**О. С. Чернишова**  
**Н. О. Нікітіна**

## **ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ**

Навчально-методичний посібник

Харків – 2013

УДК 543.545

ББК 24.46

К 90

**Рецензенти:**

**Георгієвський В. П.** - д. фарм. н., професор, член-кор. НАН України, головний науковий співробітник ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» Державної служби України з лікарських засобів;

**Рубцов В. І.** - к.х.н., доцент кафедри фізичної хімії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Затверджено до друку рішенням Науково-методичної ради  
Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна  
(протокол № 1 від 11 жовтня 2012 р.)

**Куліков А. Ю.**

К 90 Електрофоретичні методи аналізу / А. Ю. Куліков, О. С. Чернишова, Н. О. Нікітіна. - Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2013. – 68 с.

У посібнику висвітлено загальні положення теорії електрофорезу, розглянуто теоретичні та практичні основи планарного електрофорезу. Особливу увагу приділено застосуванню методу електрофорезу для розв'язання практичних аналітичних задач.

Видання може бути корисним студентам хімічних, біологічних, екологічних та фармацевтичних спеціальностей.

**УДК 543.545**

**ББК 24.46**

© Харківський національний університет  
імені В. Н. Каразіна, 2013

© Куліков А. Ю., Чернишова О. С., Нікітіна Н. О., 2013

© Дончик І. М., макет обкладинки, 2013

## Зміст

|   |    |
|---|----|
| <b>Вступ</b> .....  | 5  |
| <b>Класифікація електрофоретичних методів аналізу та загальні терміни</b> ..... | 7  |
| <b>Теоретичні основи електрофорезу</b> .....                                    | 6  |
| <b>Гелі для електрофорезу. Їх основні характеристики</b> .....                  | 10 |
| Поліакриламідний гель (ПААГ).....   | 10 |
| Агароза.....  | 15 |
| Змішаний гель.....  | 17 |
| <b>Техніка приготування гелів</b> .....   | 17 |
| Вертикально розташовані пластини.....   | 17 |
| Горизонтально розташовані пластини.....   | 26 |
| <b>Електрофорез білків</b> .....  | 28 |
| Лідируючі барвники.....   | 28 |
| Розділення білків за розміром із застосуванням додецилсульфату натрію.....      | 29 |
| Вибір пористості гелю.....  | 31 |
| Підготування білкового препарату.....   | 33 |
| Забарвлення білків в ПААГ.....  | 33 |
| Флюоресцентні барвники.....   | 36 |
| <b>Капілярний електрофорез</b> .....  | 36 |
| <b>Інші види електрофорезу</b> .....  | 42 |
| Ізоелектричне фокусування.....  | 42 |
| Ізотахофорез.....   | 45 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Лабораторні роботи</b> .....  | 47 |
| Загальні зауваження.....   | 47 |
| <i>Лабораторна робота № 1. Приготування гелю з агарози для електрофорезу</i> .....   | 49 |
| <i>Лабораторна робота № 2. Розділення синтетичних барвників методом гель-електрофорезу</i> .....   | 50 |
| <i>Лабораторна робота № 3. Ідентифікація складу харчових барвників методом гель-електрофорезу</i> .....                                      | 53 |
| <i>Лабораторна робота № 4. Приготування гелю з поліакриламідом для електрофорезу</i> .....   | 55 |
| <i>Лабораторна робота № 5. Розділення амінокислот методом електрофорезу у гелі з поліакриламідом</i> .....                                   | 57 |
| <i>Лабораторна робота № 6. Визначення молекулярної маси білку методом електрофорезу у гелі з поліакриламідом (метод Вебера—Осборн)</i> ..... | 60 |
| <i>Лабораторна робота № 7. Визначення молекулярної маси білку методом електрофорезу у гелі з поліакриламідом (метод Лемлі)</i> .....         | 62 |
| <b>Рекомендована література</b> .....  | 66 |

## ВСТУП

Електрофорез (від грецького електро- електричний та phoresis – перенос) – спрямований рух колоїдних частинок або макроіонів під дією зовнішнього електричного поля. Електрофорез був відкритий Ф. Ф. Рейссом і вважається найважливішою різновидністю електрокінетичних явищ.

Основні дати історії розвитку методу:

1808 р. – Рейсс (1778—1852) відкрив електрокінетичні явища у розчинах;

1909 р. - Міхаеліс дав відкритому ефекту назву електрофорез;

1912 р. – Ікеда та Сузуки спостерігали ізоелектричне фокусування при дослідженні амінокислот;

1930 р. – початок розвитку електрофорезу як сучасного методу аналізу;

1936 р. – Тіселіус створив чутливий електрофоретичний пристрій та довів, що білок глобулін складається з трьох білків;

1939 р. – Клобузітські та Коніг застосували електричне поле до паперових смуг, які змочені електролітом;

1948 р. – Тіселіусу присвоєна Нобелівська премія «за дослідження електрофорезу та адсорбційного аналізу, особливо за відкриття, які пов'язані зі складною природою сироватковатих білків»;

1952 р. – Тіселіус запропонував електрофорез на папері та в інших середовищах;

1981 р. – Джоргенсон і Лукасц теоретично й експериментально дослідили електрофорез у скляних капілярах;

1984 р. – Терабе запропонував міцелярну електрокінетичну капілярну хроматографію;

1987 р. – випущено перший комерційний прилад для капілярного електрофорезу.

Електрофорез застосовують в електрохімії для вивчення подвійного електричного шару та адсорбції іонів на поверхні. В біохімії електрофорез слугує для аналізу, розділення та очищення біополімерів (головним чином білків), бактеріальних клітин, вірусів, а також амінокислот, вітамінів та ін. Практичне застосування електрофорезу почалось після створення шведським вченим А. Тіселіусом спеціального апарату для фронтального (або вільного) електрофорезу білків у розчині. Найпоширеніше розповсюдження знайшли електрофоретичні методи із застосуванням інертних носіїв (паперу, гелів та ін.), які одержали загальну назву зонального електрофорезу, оскільки фракції речовин, що розділяють, утворюють в товщі носія окремі зони, які не зміщуються. Електрофорез часто поєднують з іншими методами розділення біоорганічних сполук, наприклад, з хроматографією. Розроблено техніку концентрування електрофоретичних зон біополімерів в гелях, яка значно підвищує розділювальну здатність методу (диск-електрофорез). Застосування реакції антиген-антитіло у поєднанні з електрофорезом стало основою для створення методу імуно-електрофорезу. Електрофоретичний аналіз біологічних рідин, наприклад, сироватки крові для дослідження головним чином білків, широко застосовують в діагностиці багатьох захворювань.

## **КЛАСИФІКАЦІЯ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИХ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ ТА ЗАГАЛЬНІ ТЕРМІНИ**

Електрофоретичні методи поділяють на декілька типів. Розрізняють фронтальний, капілярний електрофорез, ізотахофорез та ізоелектричне фокусування.

**Електрофорез (Electrophoresis)** — метод розділення суміші речовин, що дисоціюють, який базується на відмінностях в електрофоретичній рухливості їх іонів в розчині електроліту, який розміщений в електричному полі.

**Гель-електрофорез (Gel-electrophoresis)** — електрофорез, в якому суміш заряджених макромолекул ділиться в результаті різниці в їх заряді, розмірі та швидкості міграції через гель (або розчин нейтрального полімеру), який розміщений в електричному полі.

**Капілярний електрофорез (Capillary electrophoresis)** — метод розділення суміші заряджених чи нейтральних молекул, що базується на різниці в їх електрофоретичній рухливості і/чи розподіленні між розчином та зарядженими частинками (міцелами, колоїдними частинками, металокомплексами, молекулами поліелектроліту), які рухаються в електричному полі.

**Ізотахофорез (Isotachopheresis)** — електрофорез, в якому перед сумішшю, яку розділяють, розміщують лідируючий електроліт, а після неї — кінцевий електроліт, причому під впливом електричного поля суміш ділиться на межуючи одна з одною зони індивідуальних компонентів, які виходять у послідовності зниження їх електрофоретичної рухливості.

**Ізоелектрофокусування (Isoelectric focusing)** — метод розділення в електричному полі суміші амфотерних сполук, що



базується на їх розподілі вздовж колонки з градієнтом рН у відповідності з їх ізоелектричними точками.

## ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Під електрофорезом зазвичай розуміють рух зарядженої частинки у розчині під впливом електричного поля. Сила, яка викликає рух сферичної частинки в однорідному електричному полі за відсутності солей ( $F_{ef}$  – електрофоретична сила), в умовах рівноваги дорівнює опору тертя, яке ця частинка повинна подолати у рідині, тобто

$$F_{ef} = q \cdot E = 6 \cdot \pi r \eta v, \quad (1)$$

де  $q$  – ефективний заряд частинки,  $E$  – напруженість електричного поля,  $r$  – радіус частинки,  $\eta$  – динамічна в'язкість середовища,  $v$  – лінійна швидкість міграції частинки.

При електростатичній взаємодії частинки із солями буфера швидкість її руху зменшується на деяку величину, яку можна розрахувати, якщо відомо значення електрокінетичного потенціалу, густина електричного подвійного шару, що оточує частинку та її заряд.

*Рухливість* частинки  $\mu$  визначається як відношення швидкості  $v$  до напруженості поля  $E$ :

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi r \eta} \left[ \frac{\text{см}^2}{\text{В} \cdot \text{с}} \right]. \quad (2)$$

Оскільки напруженість поля є відношення густини струму  $J$  ( $\text{А}/\text{см}^2$ ) до питомої електропровідності  $\kappa$  ( $1/\text{Ом} \cdot \text{см}$ ), тобто

$$E = \frac{J}{\kappa} \left[ \frac{\text{В}}{\text{см}} \right], \quad (3)$$

для швидкості  $v$ , із якою частинка рухається при вільному електрофорезі, маємо вираз:

$$v = E\mu = \frac{\mu J}{\varepsilon} \left[ \frac{\text{см}}{\text{с}} \right]; \quad (4)$$

величини  $\varepsilon$  і  $\mu$  визначаються співвідношеннями

$$\varepsilon = F \sum_i c_i \mu_i \quad (5)$$

$$\mu = f(c_1, c_2, c_3, \dots, T), \quad (6)$$

де  $F$  – число Фарадея ( $9.65 \cdot 10^4$  Кл/моль),  $c_i$  і  $\mu_i$  – концентрація та рухливість іонів сорту  $i$  (моль/см<sup>3</sup>),  $f$  – коефіцієнт,  $T$  – температура.

На рухливість частинки впливають також рН та іонна сила середовища (зазвичай середовищем слугує якийсь буферний розчин). Таким чином істинна рухливість частинки визначається істинним зарядом іонів, який у свою чергу залежить від ступеня дисоціації слабкої кислоти, основи або амфотерної сполуки при обраному рН. В першому наближенні рухливість обернено пропорційна квадратному кореню з іонної сили.

При низькій іонній силі буферних розчинів частинки рухаються швидко і кількість тепла, яке виділяється, мала, тоді як при високій іонній силі частинки рухаються повільніше і тепла вивільнюється більше (хоча зони поділу при цьому виходять чіткішими).

Максимально допустима сила струму  $I$  визначається кількістю Джоулева тепла, що виділяється в гелі, оскільки при підвищенні температури рухливість іонів та вільна дифузія зростають. *Кількість тепла  $H$* , що вивільнюється в одиницю часу при проходженні струму, дорівнює

$$H = \frac{RI^2}{A} = \frac{UI}{A}, \quad (7)$$

де  $R$  – опір носія,  $U$  – напруга,  $A$  – механічний еквівалент тепла, який дорівнює 4.185 Дж/кал.

З усього сказаного ясно, що рух частинок при електрофорезі залежить від низки факторів: від розмірів, форми, концентрації, електричного заряду, ступеня гідратації і ступеня дисоціації самих частинок, від в'язкості, рН, температури та іонної сили середовища, від напруги електричного поля, тривалості електрофорезу і довжини шляху, що пройшла частинка.

Співвідношення між електрофоретичною рухливістю, швидкістю пересування, напругою поля, величиною рН та іонною силою однакові для вільного електрофорезу та електрофорезу в носії (зональний електрофорез). В останньому випадку на рухливість і чіткість розділення впливають також адсорбція, неоднорідність речовини носія та його іонообмінні властивості, електроосмос, капілярний ефект, підвищення температури та розведення. При застосуванні поліакриламідного гелю як носія вплив адсорбції та електроосмосу виключається.

## **ГЕЛІ ДЛЯ ЕЛЕКТРОФЕРЕЗУ. ЇХ ОСНОВНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Для електрофорезу зазвичай застосовують поліакриламідний (ПААГ) гель, агарозу, змішаний гель (агароза+ПААГ) та ацетатцелюлозну плівку, яка імпрегнована ПААГ.

### **Поліакриламідний гель (ПААГ)**

*Вихідними матеріалами* для синтезу поліакриламідного гелю є акриламід,  $\text{NN}'$ -метиленбісакриламід, персульфат амонію, рибофлавін та тетраметилетилендіамін.

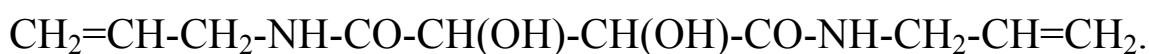
*Акриламід* ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$ ) – це білий кристалічний порошок. Добре очищений комерційний препарат містить не більше 0.05 % акрилової кислоти. Його 5 % водний розчин повинен

мати рН не нижче 5, а оптична густина 1 % розчину при 290 нм не повинна перевищувати 0.15. Таку речовину можна застосовувати без додаткового очищення або перекристалізації. Акриламід слід зберігати сухим, в темному посуді, найкраще у прохолодному місці. В таких умовах він може зберігатися до року. Оскільки акриламід чинить шкідливу дію на шкіру та нервову систему, його слід зважувати і розчиняти у рукавичках та у витяжній шафі.

***NN'-метиленабісакриламід («Біс»)*** –  $(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH})_2-\text{CH}_2$  – застосовують в якості «зшивання» лінійних полімерів акриламідів. Препарати, які містять не більше 0.02 % акрилової кислоти, не потребують додаткового очищення. Умови зберігання та токсичність такі самі, як і в акриламіді.

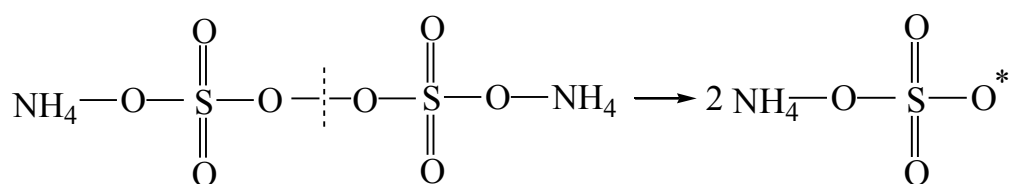
В якості «зшивання» іноді застосовують етилендіакрилат –  
 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,

а також ***NN'***-диалілтартардіамід (ДАТД) –



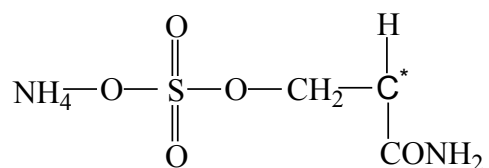
За допомогою них одержують «розчинні» гелі. У першому випадку ефірний зв'язок можна розірвати обробкою гелю лугом або водним розчином піперидину.

***Персульфат амонію*** виробляється у вигляді білого кристалічного порошку або гранул. Його застосовують як ініціатор процесу полімеризації. Гомолітичне розривання зв'язку між атомами кисню в молекулі персульфату амонію призводить до утворення двох вільних радикалів із одним неспареним електроном у атома кисню:



Такий радикал стимулює розрив подвійного зв'язку в молекулі акриламідів та приєднується до неї таким чином, що знов

утворюється радикал із неспареним електроном, але вже в атома вуглецю:



Цей радикал, в свою чергу, викликає розрив подвійного зв'язку та приєднання наступної молекули акриламід утворенням нового радикалу тощо. Ланцюгова реакція полімеризації йде до того часу, поки два радикали, зустрівшись між собою, не утворюють звичайний ковалентний зв'язок. За тим самим механізмом до ланцюга лінійного полімеру, який росте, може однією із своїх кінцевих ванільних груп вбудуватися і метиленбісакриламід. Другий його кінець може так само опинитися у складі іншого полімерного ланцюга, й утворюється «зшивання».

Персульфат амонію у водному розчині поступово розкладається, тому слід застосовувати лише щойно приготовані розчини. Сухий препарат зберігається краще, хоча і він повільно розкладається з виділенням кисню. Комерційні препарати для електрофорезу звичайно добре очищені, але ж їх треба перевіряти. Якщо 1 % розчин персульфату амонію у воді має рН < 2, то він непридатний. Катіон, який входить до складу персульфату, не відіграє ролі у процесі ініціації. Можна застосовувати, наприклад, персульфат калію.

**Рибофлавін** – жовто-оранжеві кристали. Він малорозчинний у воді, але добре розчиняється у слаболужних водних буферних розчинах; розчини мають жовто-зелене забарвлення.

Рибофлавін також може бути ініціатором полімеризації. При освітлюванні його водного розчину видимим світлом (445 нм) він приєднує гідроген і відновлюється до лейкорибофлавіну. Останній

знов легко окиснюється розчиненим у воді киснем, утворюючи пероксид гідрогену. За рахунок розкладу пероксиду продукуються вільні радикали ( $\text{HO}^\bullet$ ), які ініціюють ланцюгову реакцію полімеризації акриламиду.

До чистоти рибофлавіну ставлять не дуже високі вимоги оскільки він є дуже ефективним ініціатором і застосовується у набагато менших концентраціях ( $\sim 0.005\%$ ), ніж персульфат амонію.

**Тетраметилетилендіамін** (ТЕМЕД) –  $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  – безбарвна рідина із густиною  $0.78 \text{ г/см}^3$ . Концентрація нерозведеного ТЕМЕД близько  $6.7 \text{ моль/л}$ .

ТЕМЕД не є ініціатором полімеризації акриламиду, але служить каталізатором цього процесу. Він ефективний лише у своїй неіонізованій формі, тому при полімеризації акриламиду у кислому середовищі вміст ТЕМЕД слід значно збільшувати. У нейтральному або лужному середовищі ТЕМЕД можна додавати у кількості, еквімолярній у відношенні до персульфату.

Як каталізатор часто застосовують **диметиламінопропіонітрил** —  $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CN}$ . Він ефективніший за ТЕМЕД, тому його вносять в три-чотири рази менше, ніж персульфату амонію.

У гелі тертя суттєво зростає, причому тим сильніше, чим більше маса молекул і менше середній розмір пор, тобто чим більша величина  $T$  (відсоткове відношення сумарної маси обох полімерів до об'єму їх розчину):

$$\ln(\mu'/\mu_0) = -k_R T, \quad (8)$$

де  $\mu'$  — електрофоретична рухливість заряджених молекул в гелі,  $\mu_0$  — електрофоретична рухливість заряджених молекул у вільній рідині.

Величина коефіцієнта гальмування  $k_R$  (порядку 0.1 - 0.4) залежить від середнього радіуса молекули  $R$  і ступеня зшиття гелю  $C$ , слабко зростаючи зі зростом останньої у межах від 1 до 7. Для глобулярних білків  $R$  лежить в діапазоні від 1.57 нм для лактоальбуміну ( $M=12400$  г/моль) до 3.61 нм для церулоплазміну ( $M=151000$  г/моль).

Для ефективного розділення білків при електрофорезі в ПААГ співвідношення  $\mu'/\mu_0$  повинно складати 0.1—0.2. Звідси витікає, що оптимальна електрофоретична рухливість білків в ПААГ лежить у межах 0.01—0.1 см/год на 1 В/см. Наприклад, при напруженості поля 10—20 В/см цьому відповідають швидкості міграції білків в діапазоні 0.1—2 см/год. Таким чином, при робочій довжині гелю 10 см за 5 год. електрофорезу найбільш швидкі білки можуть дістатися кінця гелю, в той час як менш швидкі просунуться лише на 0.5 см. Якщо, наприклад, заздалегідь відомо, що білки, які розділяють, сильно різняться між собою за зарядом чи розміром, то можна вести електрофорез в умовах більш високих рухливостей ( $\mu'$ ), тобто в більш крупно пористих гелях, і тим скоротити час фракціонування в 2—3 рази.

Вибір значення  $T$  залежить від природи відмінності електрофоретичних рухливостей білків в гелі. Якщо сильно різняться розміри молекул, а відношення заряду до маси у них більш-менш однакове, то варто обрати  $T$  максимальним. Поділ у цьому випадку буде відбуватися лише за рахунок тертя об гель, причому тим ефективніше, чим більше  $T$ , хоча при цьому у зв'язку зі збільшенням тривалості електрофорезу посилиться дифузія білків. Якщо ж компоненти суміші, яку аналізують, мають різні відношення заряду до маси, то може виявитися вигідним вести розділення у великопористому гелі при малих значеннях  $T$ , тобто

нібито у вільній рідині, майже не використовуючи ефект тертя молекул об гель. Це забезпечить вигреш у часі фракціонування.

Як орієнтир можна рекомендувати одержану на практиці таблицю відповідності молекулярних мас білків ( $M$ ), які діляться, і концентрацій ПААГ ( $T$ ):

| $M$ , тис. Дальтон | $T$ , % | $M$ , тис. Дальтон | $T$ , % |
|--------------------|---------|--------------------|---------|
| 10—40              | 15—20   | 100—300            | 5—10    |
| 40—100             | 10—15   | > 300              | 5       |

### **Агароза**

Поєднання тривкості та великопористості робить гелі агарози незамінними при електрофорезі особливо великих макромолекул, зокрема нуклеїнових кислот. Агароза – це особливо чиста фракція природного лінійного полісахариду агару, який добувають з деяких видів морських водоростей. У полімерному ланцюзі агарози чергуються  $\beta$ , $D$ -галактопіраноза і 3,6-ангідро- $\alpha$ , $L$ -галактопіраноза. Її молекулярна маса становить  $10^4$ — $10^5$ . Гелеутворення йде шляхом зв'язування в просторову сітку пучків за рахунок водневих зв'язків між ними. Деякі види агарози утворюють міцні гелі вже при концентрації 0.3 %.

Гелі агарози не зовсім прозорі, однак це зумовлено не наявністю домішок, а свого роду «кристалізацією» гелю, і свідчить, скоріше, про чистоту агарози. Затверділий гель являє собою не зовсім рівноважну систему: з часом він трохи ущільнюється, видавлюючи із себе рідину. Цей процес йде спочатку доволі швидко, а потім – дуже повільно. Гелі агарози перед дослідом слід витримувати протягом 12 год. (відкриті пластини для горизонтального електрофорезу витримують у вологій камері).



Стиснення сильніше виражено у більш концентрованих гелів агарози.

Агароза для електрофорезу випускається звичайно у вигляді ліофілізованого порошку. Для приготування гелю обраної концентрації наважку порошку розчиняють у відповідному буфері та витримують на киплячій бані або у термостаті при 90—95 °С близько 2 год. для утворення істинного розчину полімеру. Іноді розчин агарози просто кип'ятять зі зворотним холодильником.

Різноманітні буфери, детергенти та інші добавки змішують з розчином агарози у гарячому вигляді (при 50—60 °С). Вони не заважають її застиганню. Треба враховувати, що висока концентрація агентів, дисоціюючих водневих зв'язків, дещо ускладнює утворення гелю. Наприклад, гелі звичайної агарози із сечовиною 6 моль/л топляться за 1.5 хв. при 75 °С, але не застигають за 1 год. при 20 °С.

Контакт із киснем повітря не заважає застиганню агарози, тому гелі для горизонтального електрофорезу готують шляхом заливки дозованого об'єму розтопленої агарози на суворо горизонтальну скляну пластинку потрібного розміру. Гарячу суміш агарози з буфером слід короткочасно дегазувати під вакуумом.

Вибір концентрації агарози, тобто пористості її гелю, диктується розмірами макромолекул, які фракціонують. Середній розмір пор 2 % гелю агарози приблизно відповідає діаметру сферично упакованої молекули біополімеру із масою 50 млн. Дальтон. Гелі з більш високим вмістом агарози застосовують для гель-фільтрації. При електрофорезі пори гелю повинні бути легко проникні для молекул біополімерів, щоб лише гальмувати їх міграцію в електричному полі за рахунок тертя, тому для електрофорезу застосовують гелі з концентрацією 0.4—2 %.

Перед заливкою у форму або на пластинку розчин гарячої агарози охолоджують до 50 °С і витримують не менше 1 год. у термостаті при даній температурі. Це необхідно для повного вирівнювання температури розчину по всьому об'єму. Це забезпечує одночасне застигання всього гелю та однорідність його структури.

### **Змішаний гель**

Електрофорез великих білків іноді буває доцільно проводити у великопористому ПААГ, який містить 1.5-2.5 % акриламід. Для надання міцності такому гелю його полімеризують сумісно з 0.5—0.6 % агарози. Застигаючи, чиста 0.5 % агароза дає дуже м'який гель, 2 % ПААГ не вдається навіть заполімеризувати, а їх комбінація утворює гелі з відмінними механічними характеристиками.

В таблиці 1 наведені системи гелів для електрофорезу та області їх застосування.

## **ТЕХНІКА ПРИГОТУВАННЯ ГЕЛІВ**

### **Вертикально розташовані пластини**

Для електрофорезу білків звичайно використовують пластини шириною 8—14 см і довжиною 8—28 см. Електрофорез нуклеїнових кислот і їх фрагментів проводять у великих пластинах розміром 33x43 см. Для розділення гідролізатів тРНК застосовують пластини ПААГ довжиною 90 см.

Полімеризацію акриламід у або застигання агарози, а потім і сам електрофорез ведуть у формі, що утворена двома пластинами дзеркального скла товщиною 5—6 мм. Відстань між пластинами задається товщиною прокладок з тефлону або плексигласу і

визначає товщину гелю. Для аналітичних цілей, як правило, застосовують пластини гелю (і відповідно прокладки) товщиною від 0.4 до 1.5 мм. Ці ж прокладки можна застосовувати для ущільнення форми під час знаходження в ній ще не затверділого гелю. Для цього встановлюють ще одну прокладку такої ж самої товщини (фрезерувати сумісно) по нижньому краю стекол і щільно притискають її до фрезерованих торців бокових прокладок.

Добре підігнані тефлонові прокладки можна не змащувати. Прокладки з плексигласу змащують силіконовим мастилом. Тонкий валик мастила з шприца без голки наносять спочатку з однієї сторони трьох добре промитих детергентом прокладок, а також на нижні торці двох із них. Бокові прокладки накладають на одне із стекол форми мастилом донизу та до них впритул присувають так само покладену нижню прокладку. Руками в рукавичках притуляють прокладки до скла так, щоб мастило не видавлювалося з-під них у порожнину форми. На утворену таким чином П-подібну прокладку знову так само наносять суцільний валик мастила по всьому периметру та накладають друге скло. Всю систему затискають по трьом сторонам пружинними затискачами для паперу.

При заливанні агарози ущільнення форми можна здійснити простіше – заклеїти торці стекол клейкою стрічкою (лейкопластиром). Нижню прокладку при цьому можна не встановлювати. Ущільнення не буде досконалим, але агароза у контакті із прокладками і стрічкою швидко застигне та помітного її протікання не буде. Для надійності можна спочатку залити невеликий шар агарози і дати їй застигнути у нижній частині форми, а потім залити решту об'єму.

Таблиця 1. Системи гелів для електрофорезу

| № | Система гелю                            | Область застосування (приклад)   | рН             |                 | Розчини розділювального гелю |  |               |  | Розчини концентруючого гелю                                 |  |     |  | Електродний буферний розчин                                       |     |     |
|---|---|--|----------------|-----------------|------------------------------|--|---------------|--|---|--|-----|--|---|-----|-----|
|   |   |  | концентрування | розділення      | №                            | складові частини на 100 мл розчину                 | рН            | співвідношення розчинів у суміші   | №   | складові частини на 100 мл розчину                           | рН  | співвідношення розчинів у суміші                                 | складові частини на 100 мл розчину                                | рН  |     |
| 1 | рН 8.9;<br>7.5 %<br>(середньо пористий) | Білки з мол. масою $10^4$ - $10^6$ ; оптимальне розділення при мол. масі $3 \cdot 10^4$ - $3 \cdot 10^5$ (сироваткові білки) | 8.3            | 9.5             | 1                            | 1 М НСІ<br>48 мл;<br>Тріс 36.6 г;<br>ТЕМЕД 0.23 мл | 8.9           | 1 частина № 1<br>2 частини № 2<br>1 частина Н <sub>2</sub> О                   | 4 <sup>2)</sup>   | 1 М Н <sub>3</sub> РО <sub>4</sub><br>25.6 мл<br>Тріс 5.7 г. | 6.9 | 1 частина № 4<br>2 частини № 5<br>1 частина № 6<br>4 частини № 7 | Тріс 6.0 г<br>Гліцин 28.8 г.<br>Використовують 10 % водний розчин | 8.3 |     |
|   |   |  |                | 2 <sup>1)</sup> | Акриламід 30 г<br>МБА 0.8 г  |  | 4 частини № 3 | 5  | Акриламід – 10 г.<br>МБА 2.5 г<br>РФ 4.0 мл<br>Сах. 40.0 г. |  |     |  |   |     |     |
|   |   |  |                | 3               | ПСА 0.14 г                   |  |               | 6  |   |  |     |  |   |     |     |
|   |   |  |                |                 |                              |  |               | 7  |   |  |     |  |   |     |     |
| 2 | рН 8.9;<br>15 %<br>(дрібнопористий)     | Білки з мол. масою $< 3 \cdot 10^4$  | 8.3            | 9.5             | 8                            | Акриламід 60 г<br>МБА 0.4 г                        |               | 1 частина № 1<br>2 частини № 8<br>4 частини № 3                                |   |  |     |  |   |     | 8.3 |
| 3 | рН 8.9;<br>30 %<br>(дрібнопористий)     | Білки з мол. масою $< 10^4$ (мінімум біля 2000)  | 8.3            | 9.5             | 9                            | ПСА 0.18г  |               | 1 частина № 1<br>4 частини № 8<br>3 частини № 9                                |   |  |     |  |   | 8.3 |     |
| 4 | рН 8.9;<br>3.75 %<br>(великопористий)   | Білки з мол. масою $> 10^6$ (максимум біля $2 \cdot 10^6$ )  | 8.3            | 9.5             | 10                           | Акриламід 15 г<br>МБА 0.4 г                        |               | 1 частина № 1<br>2 частини № 10<br>1 частини № 6<br>4 частини Н <sub>2</sub> О |   |  |     |  |   | 8.3 |     |

Продовження таблиці 1

| № | Система гелю                                 | Область застосування (приклади)  | рН             |            | Розчини розділювального гелю     |  |     |  | Розчини концентруючого гелю |  |      |  | Електродний буферний розчин  |     |
|---|--|--|----------------|------------|----------------------------------|--|-----|--|-----------------------------|--|------|--|--|-----|
|   |  |  | концентрування | розділення | №                                | складові частини на 100 мл розчину   | рН  | співвідношення розчинів у суміші   | №                           | складові частини на 100 мл розчину   | рН   | співвідношення розчинів у суміші                                   | складові частини на 100 мл розчину   | рН  |
| 5 | рН 7.3;<br>7.5 %<br>(середньо-пористий гель) | Основні білки, які у системі № 1 рухаються назад до катода   | 8.3            | 6.6        | 11 <sup>4)</sup><br><br>12<br>13 | 1 М КОН<br>8.0 мл;<br>Гліцин<br>19.0 г;<br>ТЕМЕД<br>0.08 мл<br>Акриламід<br>60.0 г; МБА<br>1.6 г<br>ПСА 0.56 г | 7.3 | 6 частин № 11<br>1 частина № 12<br>1 частина № 13                              | 14                          | 1 М КОН<br>48.0 мл;<br>Гліцин 4.8 г;<br>ТЕМЕД<br>0.46 мл                           | 10.3 | 1 частина № 14<br>2 частини № 5<br>4 частини № 7<br>1 частина № 13 | Гліцин 13.7 г<br>2,6-<br>Диметилпиридин 38.2 мл<br>Застосовують 10 % водний розчин | 8.3 |
| 6 | рН 7.5;<br>7.5 %<br>(середньо-пористий гель) | Білки (особливо ферменти), для яких оптимальне розділення досягається при рН 8 (при рН > 8 нестійкі) | 7.0            | 8.0        | 15                               | 1 М НСІ<br>48.0 мл; Тріс<br>6.85 г;<br>ТЕМЕД<br>0.46 мл  | 7.5 | 1 частина № 15<br>2 частини № 2<br>1 частина Н <sub>2</sub> О<br>4 частини № 3 | 16                          | 1 М Н <sub>3</sub> Р <sub>4</sub><br>39.0 мл; Тріс<br>4.95 мл;<br>ТЕМЕД<br>0.46 мл | 5.5  | 1 частина № 16<br>2 частини № 5<br>1 частини № 6<br>4 частини № 7  | Диетилбарбіту<br>рова кислота<br>5.52 г; Тріс<br>1.0 г                             | 7.0 |

Продовження таблиці 1

| № | Система гелю                                | Область застосування (приклади)                     | рН             |            | Розчини розділювального гелю |  |     |   | Розчини концентруючого гелю |   |     |  | Електродний буферний розчин  |     |
|---|---|---|----------------|------------|------------------------------|--|-----|---|-----------------------------|---|-----|--|--|-----|
|   |   |   | концентрування | розділення | №                            | складові частини на 100 мл розчину                           | рН  | співвідношення розчинів у суміші  | №                           | складові частини на 100 мл розчину                          | рН  | співвідношення розчинів у суміші   | складові частини на 100 мл розчину                                   | рН  |
| 7 | рН 4.3;<br>15 %<br>(дрібно-пористий гель)   | Основні білки із мол. масою близько $2 \cdot 10^4$  | 5.0            | 3.8        | 17                           | 1 М КОН<br>48.0 мл;<br>АсОН<br>17.2 мл; ТЕМ<br>ЕД 4.0 мл     | 1.3 | 1 частина № 17<br>2 частини № 8<br>1 частина Н <sub>2</sub> О<br>4 частини № 18 | 19                          | 1 М КОН<br>48.0 мл;<br>АсОН<br>2.87 мл;<br>ТЕМЕД<br>0.46 мл | 6.7 | 1 частина № 19<br>2 частини № 5<br>4 частини Н <sub>2</sub> О<br>1 частина № 6 | β-Валин 31.2 г;<br>АсОН 8.0 мл<br>Застосовують<br>10 % розчин        | 4.5 |
| 8 | рН 4.3;<br>7.5 %<br>(середньопористий)      | Основні білки із мол. масою $> 2 \cdot 10^4$        | 5.0            | 3.8        | 18                           | ПСА 0.28 г   |     | 1 частина № 17<br>2 частини № 2<br>1 частина Н <sub>2</sub> О<br>4 частини № 18 |                             |   |     |  |  | 5.0 |
| 9 | рН 2.9;<br>7.5 %<br>(середньопористий гель) | Сильно основні білки із мол. масою $> 2 \cdot 10^4$ | 4.0            | 2.3        | 20                           | 1 М КОН<br>12.0 мл;<br>АсОН<br>53.25 мл;<br>ТЕМЕД<br>1.15 мл | 2.9 | 4 частини № 20<br>2 частини № 2<br>2 частини № 21                               | 22                          | 1 М КОН<br>48.0 мл;<br>АсОН<br>2.95 мл                      | 5.9 | 1 частина № 22<br>2 частини № 5<br>4 частини Н <sub>2</sub> О<br>1 частина № 6 | Гліцин 28.1 г;<br>АсОН 3.06 мл<br>Застосовують<br>10 % водний розчин | 4.0 |
|   |   |   |                |            | 21                           | ПСА 2.80 г   |     |   |                             |   |     |  |  |     |

- 1) Для 7 % гелю розчин № 2 замінюють на № 2а: акриламід 28.0 г, МБА 0.735 г.
- 2) Розчин № 4 можна замінити на № 4а: 1 моль/л НСІ близько 48 мл, тріс 5.98 г, ТЕМЕД 0.46 мл, рН 6.7.
- 3) Суміш піддають фотополімеризації. 4) Зберігати при + 20 °С.
- 5) Сечовину необхідно попередньо знесолити (наприклад, шляхом хроматографування на іонообміннику із змішаним шаром аніоніту та катіоніту); після цього електропровідність не повинна перевищувати 5 мк  $\text{æ}$ .

## Пояснення до таблиці 1

У другому стовпчику наводяться значення рН буфера розділювального гелю в даній системі та відсотковий вміст акриламід у розділювальному гелі. Усі розчини готують на бідистильованій воді. Замість розчину сахарози (№ 7) можна також застосовувати дистильовану воду. Всі розчини персульфату амонію слід додавати до решти розчинів безпосередньо перед заливкою гелю. Усі розчини, що змішуються, повинні мати кімнатну температуру (20<sup>0</sup>).

Для отримання розділювальних гелів із концентрацією акриламід у 4—7.5 % застосовують рівняння  $A = y \cdot 30 / 7.5$ , де  $A$  – кількість акриламід у розчині № 2,  $y$  – бажана концентрація гелю у відсотках. Для концентрацій гелю вищих за 7.5 % розчин № 2 замінюють розчином № 8. Об'єм  $B$  розчину № 8 у суміші розділюючого гелю системи гелю № 1 розраховують за формулою  $B = y / 7.5$ , а об'єм води  $C$  у суміші розділюючого гелю – за формулою  $C = 4 - (B + 1)$ .

Зібрану й ущільнену одним з описаних способів форму встановлюють вертикально та заливають до неї розчин мономерів ПААГ чи розтоплену агарозу. Хоча ПААГ товщиною 0.4 мм можна заливати у похилому, а полімеризувати – в горизонтальному положенні пластин. Це значно спрощує задачу герметизації форми: достатньо оклеїти її з торців пластин водостійкою липкою стрічкою.

В ході полімеризації на верхньому краї гелю формують ряд однакових заглибин прямокутної форми – «кишень», куди потім і вносять різні препарати. Для цього до гелю, який ще не заполімеризувався, або гарячу агарозу вставляють «гребінку» з

тефлону чи плексигласу такої ж або трохи меншої товщини, ніж прокладки між стеклами. На рис. 1 зображена зібрана форма зі вставленою у гель гребінкою. На боковому перерізі можна бачити, що верхня частина гребінки трохи товща за нижню із зубцями. Це зручно оскільки гребінка встановлюється кожного разу однаково та рівно – до упору виступу об торець скляної пластини. На рис. 1 можна помітити, що нижню прокладку роблять трохи довшою ширини стекл таким чином, що її кінці виступають назовні. За ці кінці нижню прокладку витягають з форми після застигання гелю.

Гель заливають між пластин із таким розрахунком, щоб при зануренні гребенки до упору рідкий гель заповнив проміжки між її зубцями. Гребінку починають вставляти з деяким перекосом, щоб під її зубцями не затримувались пухирці повітря. Для цього торці зубців попередньо змочують, потираючи їх об скло з налитим на нього розчином акриламідю. При роботі із концентрованим ПААГ гель може прилипати до зубців гребінки і нижні порожнини кишень можуть виявитися нерівними. Це погіршує умови формування вихідних смуг у гелі.

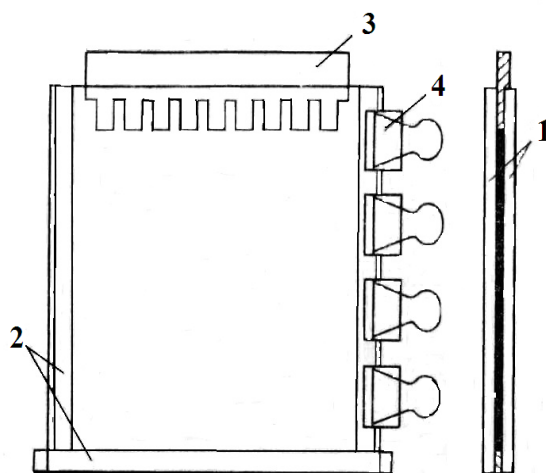


Рис. 1. Форма для полімеризації вертикальної пластини гелю.  
1 – скляні пластини; 2 – прокладки; 3 – гребінка; 4 – затискач



В такому випадку вводять ще один шар гелю пониженої концентрації та гребенку встановлюють на нього. На межі між двома шарами різної пористості смуга вихідного препарату буде вигідним чином звужуватись.

У літературі описано багато конструкцій приладів для електрофорезу у вертикальних пластинах. Найбільше розповсюдження одержала конструкція приладу із плаксигласу, запропонована Стадієром (рис. 2). Її легко реалізувати в лабораторних умовах. Верхній та нижній електродні резервуари прямокутної форми поєднані вертикальною стіною, у якої є виріз, що веде до порожнини верхнього резервуару. Такий самий виріз має одна з двох скляних пластин, між якими полімеризується гель. Пластини притискають пружинними затискачами до вертикальної стінки так, щоб обидва вирізи співпали. Буфер у верхній резервуар заливають до такого рівня, щоб він через виріз покривав верхній торець гелю. При цьому друга, не вирізана, скляна пластина виступає в ролі передньої стінки резервуару. У місці сполучення двох вирізів, між скляною пластиною та стінкою, повинно бути здійснено ущільнення, яке перешкоджає витіканню верхнього буферу. Стадієр застосовував з цією метою заливку агаром.

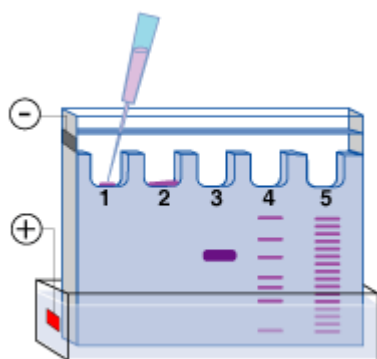


Рис. 2. Прилад Стадієра для електрофорезу у вертикальних пластинах

В обидва резервуари вмонтовані електроди із платиного дроту. При установці в прилад форму з гелем частково занурюють у буфер нижнього резервуару таким чином, що вона спирається там на рознесені по боках виступи, а її нижній торець виявляється

підійнятим над дном резервуару. Після занурення необхідно уважно перевірити чи не залишилося між пластинами і на торці гелю пухирців повітря. Їх можна видалити струменем рідини з зігнутої голки шприца.

Препарати із доданою до них сахарозою або гліцерином вносять в кишені гелю після остаточного збирання приладу. Їх підшарюють під електродний буфер на дно кожної з кишень. Кишені можна заповнити препаратом (поступово піднімаючи кінчик піпетки) майже на повну висоту.

Необхідність інтенсивного тепловідведення від великої поверхні пластин примушує вводити до приладу для електрофорезу зміяк із охолоджуючою рідиною та помпу, яка забезпечує циркуляцію електродних буферів. Однак у випадку тонких гелів повітряне охолодження виявляється достатнім. Струм, який протікає, нагріває гель до деякої рівноважної температури, але в тонкому шарі гелю ця температура виявляється практично однаковою по всьому його перерізу. Саме ця обставина є вирішальною для забезпечення гарної якості розділення.

### **Горизонтально розташовані пластини**

Перевага такого розташування – не лише у компактності приладу, але й у відсутності проблеми ущільнення. Обидва електродних буфери знаходяться у резервуарах, розташованих нижче рівня горизонтального столика, на який кладуть гель. Природно, що цей столик використовується і для відводу тепла від пластинки гелю – в його каналах циркулює охолоджуюча вода.

Гель, який полімеризовано на тонкій скляній пластині, розміщують на столику відкритою поверхнею доверху, оскільки препарат вносять не з торця гелю, а в ряд спеціальних «колодязів», що розташовані на деякій відстані від його краю. Електричний

ланцюг замикається через восьми-десяти-шарові гноти з фільтрувального паперу, один кінець яких занурено до електродних резервуарів, а другий притиснуто до гелю з перекриттям в 10—12 мм (рис. 3). При накладанні гнотів на гель слід уважно слідкувати за відсутністю повітряних пухирців між ними.

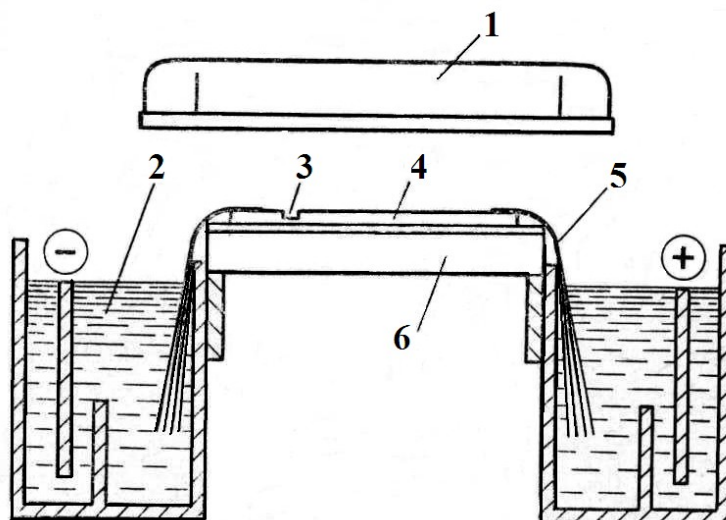


Рис. 3. Схема приладу «Мультифор» для електрофорезу у горизонтальних пластинах. 1 – протиконденсаційна кришка; 2 – електродний резервуар; 3 – колодязь для внесення препарату; 4 – гель; 5 – гніт; 6 – охолоджуючий столик

Показані на рис. 3 переділи в електродних камерах перешкоджають конвекційному переносу продуктів електролізу від електродів до кінців гнотів. У ході електролізу на аноді утворюється вільна кислота, а на катоді – луг, які по густині відрізняються від електродних буферів, а це може викликати конвекцію. Якщо електрофорез йде більш 24 год., електродні буфери слід замінити. Якщо ж вони однакові та між електродними резервуарами забезпечена циркуляція рідини, то кислота і луг взаємно нейтралізуються, і буфер можна не замінити.

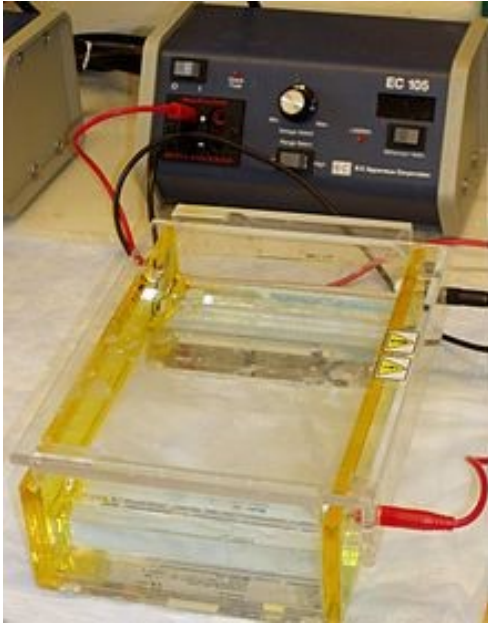


Рис. 4. Прилад для електрофорезу з антиконденсаційною кришкою

Щоб уникнути підсихання гнотів і гелю прилад під час роботи закривають прозорою кришкою, яку іноді називають антиконденсаційною (рис. 4). Вона запобігає конденсації вологи з навколишнього повітря на поверхні гелю у випадку його суттєвого охолодження. Якщо у випадку перегріву гнотів сама кришка пітніє зсередини, умови спостереження за перебігом електрофорезу погіршуються.

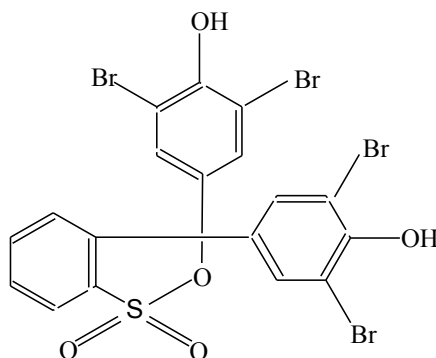
## **ЕЛЕКТРОФОРЕЗ БІЛКІВ**

### **Лідируючі барвники**

Для спостереження за ходом електрофорезу у вихідний препарат вносять барвник, який мігрує у тому ж напрямку, що і білки, які фракціонують. Він не повинен помітним чином зв'язуватися із білками, а швидкість його просування по гелю повинна бути явно більша, ніж у найбільш швидко мігруючого білка. Разом з тим барвник не повинен надто сильно відриватися від білків, щоб його проходженню до кінця пластини відповідало використання більшої частини гелю, який знаходиться на ній, для

фракціонування білків. Такий барвник називають лідируючим («tracker dye»).

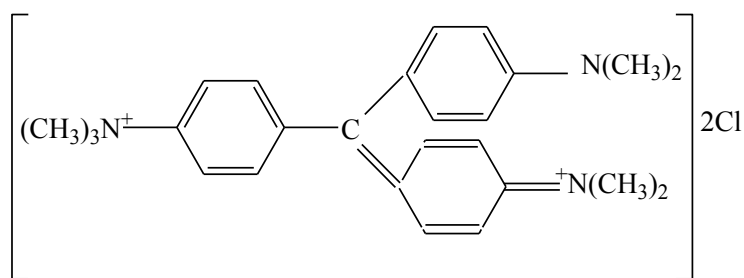
У лужних та нейтральних буферах, коли кислі білки заряджені негативно і мігрують до аноду, а також для будь-яких білків у комплексі із додецилсульфатом натрію застосовують негативно заряджені барвники. Найрозповсюдженіший – бромфеноловий синій:



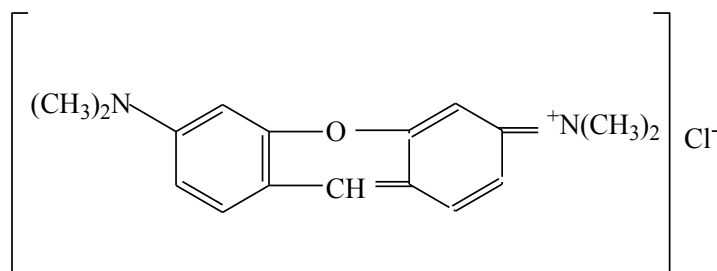
Іноді застосовують барвник ще більш складної структури – ксиленціанол. Його електрофоретична рухливість приблизно вдвічі нижча за рухливість бромфенолового синього, тому його застосовують при фракціонуванні великих білків та нуклеїнових кислот.

Для характеристики електрофоретичної рухливості білка у даних умовах електрофорезу прийнято вказувати відношення відстані, яку пройдено білковою смугою від початку робочого гелю, до аналогічної відстані до смуги барвника у цьому ж гелі. Це відношення, як і у хроматографії, позначають  $R_f$ .

Як позитивно заряджений барвник для електрофорезу у кислому середовищі, коли білки мігрують у напрямку катоду, застосовують метиловий зелений:



або піронін:



## Розділення білків за розміром із застосуванням додецилсульфату натрію

Електрофорез в ПААГ із застосуванням додецилсульфату натрію (ДСН) дозволяє фракціонувати білки залежно від значень лише одного параметра – їх молекулярної маси. Для цього білки у вихідному розчині препарату обробляють не менш ніж потрійним надлишком додецилсульфату натрію. За рахунок гідрофобних взаємодій детергент приблизно однаково зв'язується переважною більшістю білків у співвідношенні 1.4 мг додецилсульфату натрію на 1 мг білку. Величезний надлишок повністю дисоційованих залишків сульфокислоти, які вносяться детергентом, у більшості випадків робить несуттєвою роль власного заряду білка.

Електрофоретична рухливість ( $\mu'$ ) жорсткого комплексу білок-ДСН виявляється зв'язаною із молекулярною масою білку ( $M$ ) простим співвідношенням:

$$\mu' = A - B \cdot \lg M, \quad (10)$$

де  $A$  і  $B$  – коефіцієнти, що залежать від пористості гелю, температури та інших умов експерименту. Величину  $\mu'$  зручніше представляти у відносних одиницях, що виражають відношення

шляхів міграції білка та бромфенолового синього за час електрофорезу, тобто у значеннях введеної раніше величини  $R_f$ . Така заміна віді́б'ється лише на значеннях коефіцієнтів  $A$  і  $B$ . Немає сенсу визначати ці коефіцієнти у кожному досліді. Одночасно із фракціонуванням досліджуваної суміші можна провести електрофорез набору білків-«маркерів», молекулярні маси яких точно відомі. Звісно, що вся попередня обробка ДСН і меркаптоетанолом повинна бути суворо однаковою для маркерів і препарату, який досліджується. В пластині для суміші маркерів можна відвести окремий трек.

Після закінчення електрофорезу, вимірявши шляхи міграції бромфенолового синього і кожного із маркерів, можна розрахувати значення  $R_f$  та, знаючи молекулярні маси маркерів, побудувати експериментальну залежність  $\lg M$  від  $R_f$  для даного досліді. Якщо пористість гелю обрано вдало, така залежність буде лінійною. Визначивши  $R_f$  для білка, який нас цікавить, із графіка можна знайти для нього величину  $\lg M$  і підрахувати  $M$ . Положення та нахил прямої на графіку змінюються при варіації концентрації ПААГ та інших умов експерименту, тому не можна користуватися будь-яким стандартним калібруванням. Графік залежності  $\lg M$  від  $R_f$  треба будувати для кожного досліді. При визначенні  $R_f$  треба вводити поправку на набухання або зіщулювання гелю при фіксації, забарвленню білків та видаленні барвника, приводячи все до вихідного лінійного розміру.

### **Вибір пористості гелю**

При поданій пористості (концентрації) гелю залежність, що описана вище, має місце лише для білків, молекулярні маси яких лежать в певному інтервалі. Надто великі для такого гелю білки зовсім не зможуть мігрувати у ньому. Рухливості надто малих

білків, для яких пори гелю практично не створюють перешкод, мають залежати не від їх молекулярної маси, а лише від відношення заряду до маси. В присутності ДСН це відношення однакове для більшості білків. Наприклад, для однаково зшитих гелів ( $C=3.3$ ) були рекомендовані наступні значення  $T$  залежно від молекулярної маси білків:

|                    |        |        |       |
|--------------------|--------|--------|-------|
| $T, \%$            | 5      | 10     | 15    |
| $M$ , тис. Дальтон | 18 —30 | 10—100 | 10—60 |

Для визначення молекулярних мас пептидів випускається набір стандартних фрагментів міоглобіну із діапазоном  $M$  2.5—17 тис. Для нього та відповідних пептидів рекомендується використовувати сильно зшитий гель ( $T=12.5$ ;  $C=9$ ), який містить 8 моль/л сечовини, що посилює гальмування малих пептидів у гелі.

Про важливість правильного вибору пористості гелю можна зробити висновок із співставлення двох картин розділення набору з семи маркерних білків (рис. 5).

| Білок                         | $M$ , Дальтон | $\lg M$ |
|-------------------------------|---------------|---------|
| Цитохром С                    | 11700         | 4.068   |
| Міоглобін                     | 17200         | 4.236   |
| $\gamma$ -Глобулін (L-ланцюг) | 23500         | 4.371   |
| Карбоангідраза                | 29000         | 4.462   |
| Овальбумін                    | 43000         | 4.634   |
| $\gamma$ -Глобулін (H-ланцюг) | 50000         | 4.699   |
| Людський альбумін             | 68000         | 4.832   |
| Трансферін                    | 77000         | 4.886   |



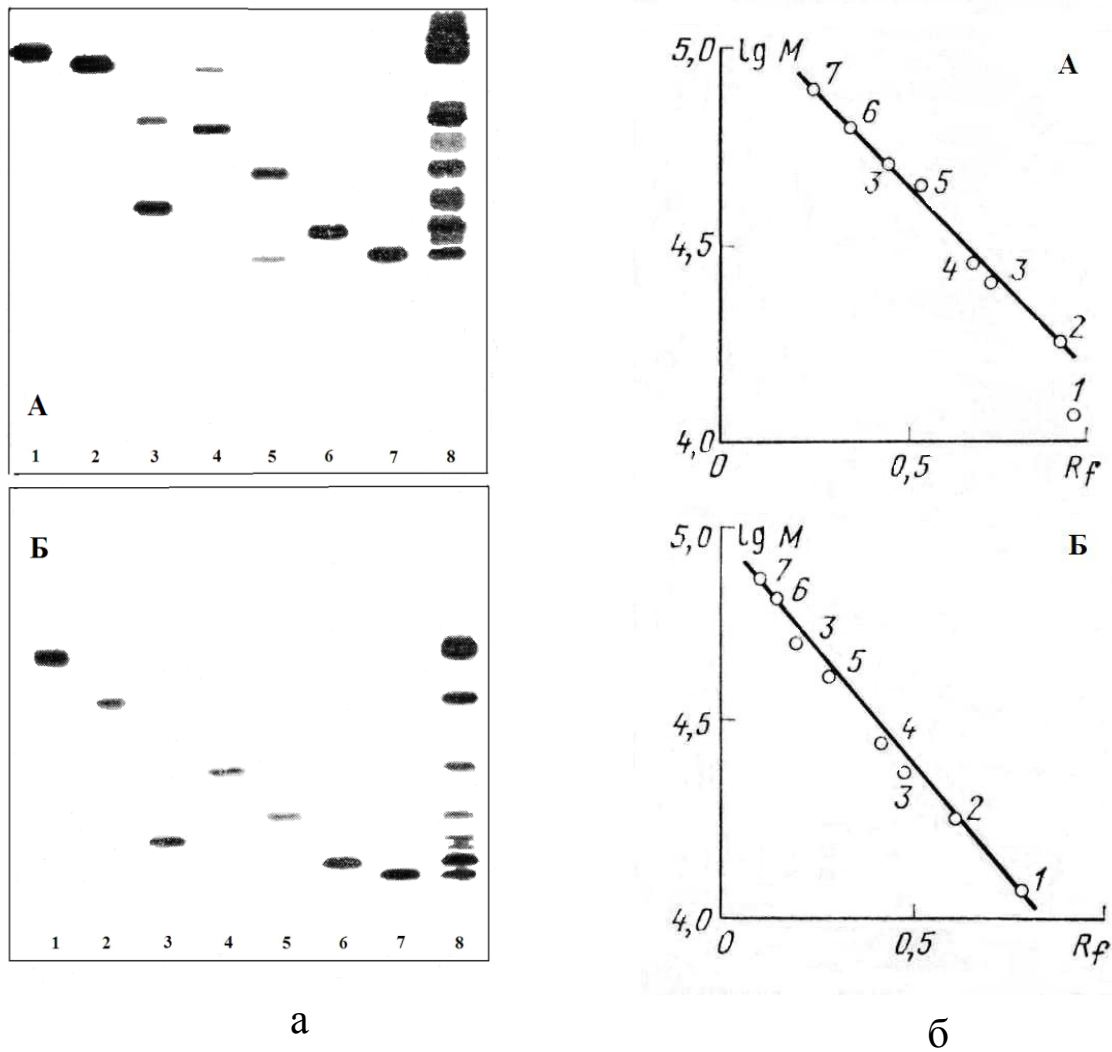


Рис. 5. А - 5 % ПААГ; Б – 10 % ПААГ. а) вплив пористості гелю на характер міграції різноманітних білків-маркерів; б) графіки залежності  $\lg M$  від  $R_f$ , що побудовано за даними рис. 5а

### Підготування білкового препарату

На цю операцію слід звернути особливу увагу. Зіставляти молекулярні маси білків за швидкістю їх міграції можна лише в тому випадку, коли є впевненість у повній денатурації білка при обробці його ДСН.

Процедура обробки включає діаліз білкового препарату проти 0.01 моль/л  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , який містить 0.1 % ДСН і 0.1 %  $\beta$ -меркаптоетанолу, видаляючи з нього залишки солі. Потім концентрації ДСН і  $\beta$ -меркаптоетанолу збільшують до 1 %

(кожного) та прогрівають препарат при 100 °С протягом 2 хв. Концентрація білка при цьому повинна складати 1 мг/мл. Якщо передбачається присутність у препараті протеаз, прогрів можна подовжити до 5 хв. Наприклад, трипсин і хімотрипсін зберігають значну каталітичну активність в присутності 1 % ДСН, але прогрів при 100 °С протягом 5 хв. цю активність заглушає. Якщо ж при високій температурі спостерігається не ферментативний гідроліз білка, то прогрівання при 100 °С можна замінити інкубацією при 37 °С протягом 2 год. Перед нанесенням препарату на гель до нього додатково додають β-меркаптоетанол до концентрації 4—5 %.

### **Забарвлення білків в ПААГ**

Виявлення та локалізацію білкових зон після їх розділення електрофорезом в ПААГ у більшості випадків здійснюють шляхом їх профарбовування в гелі. Зони проявляються як зафарбовані смуги або плями різної інтенсивності залежно від вмісту в них білка. Для забарвлення гель вимочують в розчині барвника, який дифундує всередину нього та міцно зв'язується із білками. Процес дифузії, як правило, займає декілька годин. Для запобігання розмивання смуг за цей час білки іноді попередньо фіксують осадженням. Для цього гель спочатку вимочують в 10 % або 50 % трихлороцтової кислоти (ТХО). Частіше фіксацію поєднують із забарвленням, використовуючи розчин барвника в суміші оцтової кислоти та метанолу або в ТХО.

Одночасно із білками забарвленим виявляється і сам гель. Це відбувається як за рахунок простого заміщення буфера гелю на розчин барвника, так і в результаті деякої сорбції його на гелі. Однак зв'язування барвника із гелем значно менш міцно, ніж із білками, тому від «фону» вдається без особливих зусиль позбутися «відмивкою» гелю, наприклад, вимочуванням його у відносно

невеликому об'ємі розчинника із декількома змінами. Якщо відмивання йде лише за рахунок дифузії барвника з гелю, воно займає декілька годин, звичайно його проводять протягом ночі. Для запобігання розчинення осаджених білків барвник відмивають теж оцтовою кислотою, часто в суміші з метанолом, який покращує розчинність барвника. Відмивка прискорюється при підвищеній температурі (37—50 °С) та перемішуванні розчинника, однак при цьому є небезпека послаблення забарвлення смуг.

Тепер для виявлення застосовують барвник кумасі яскраво-блакитний («Coomassie brilliant blue», скорочено СВВ). Цей барвник дає кращу чутливість та лінійну залежність інтенсивності забарвлення від концентрації білка в більш широкому її діапазоні. Барвник випускають у двох модифікаціях: R-250 і G-250. На рис. 6 наведено формулу G-250. Структура СВВ R-250 відрізняється лише відсутністю двох метильних груп. Зараз ці барвники випускають під назвами «PAGE blue 83» і «PAGE blue G-90» відповідно.

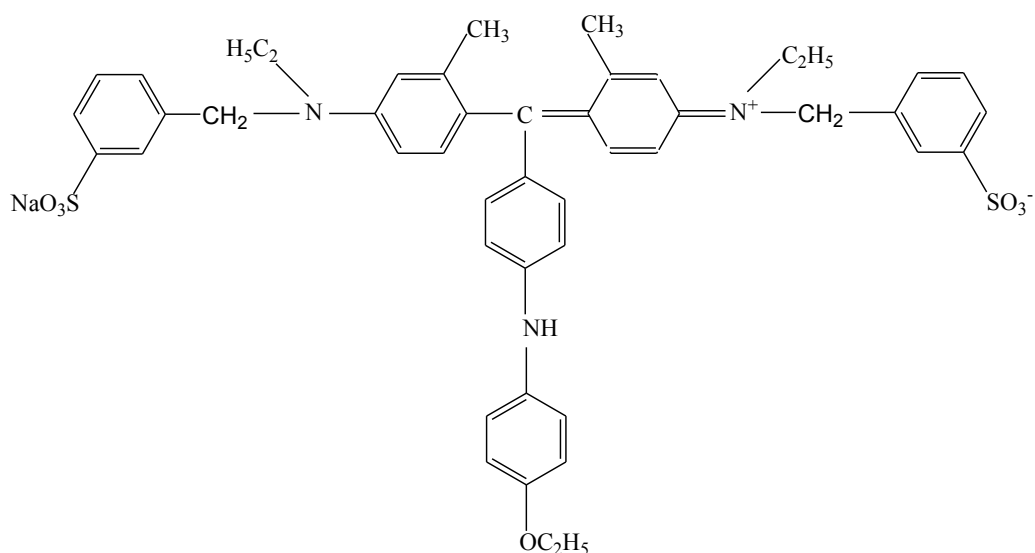


Рис. 6. Кумасі G-250

Велика кількість ароматичних кіл у структурі барвників типу СВВ робить їх погано розчинними не лише у воді, але і в

розведеної оцтової кислоти. Для покращення розчинності до кислоти часто додають метанол. Зазвичай використовують водні розчини, які містять 9—10 % оцтової кислоти та 40—45 % метанолу (за об'ємом), однак робоча концентрація СВВ R-250 в цій суміші складає 0.1—0.25 %, рідко 0.5 %. Іноді СВВ R-250 розчиняють у 25 %, 50 % трихлороцтової кислоти або в суміші, яка містить 10 % ТХО і 25 % ізопропанолу. Домішки, що не розчинилися, необхідно відфільтрувати.

Тривалість забарвлення залежить від товщини і пористості гелю та може варіювати від 2—3 до 12 год. Для прискорення процесу можна забарвлювати гель при 37 °С, а ванночку із розчином барвника погойдувати. Відмивання від барвника, який не зв'язався із білком, проводять, вимочуючи гель у 7.5 % оцтової кислоті та 5 % метанолу. В цих умовах розчинність барвника достатня для вимивання його вільних молекул, а десорбція його з поверхні білка незначна. Якщо електрофорез вели у присутності високої концентрації сечовини, то краще відмивати сумішшю, яка містить 7.5 % оцтової кислоти і 20 % метанолу.

При забарвленні співвідношення об'ємів рідини і гелю повинно складати приблизно 3:1, при відмиванні – 5:1 чи навіть 10:1 із двома-трьома змінами розчинника.

### **Флюоресцентні барвники**

*Данзилхлорид* (рис. 7) випускається у вигляді двох кристалічних форм: кристали червоного кольору плавляться при 70 °С, жовті – при 73 °С. Вони добре розчиняються в ацетоні. Максимум їх поглинання у розчині лежить в області 330—360 нм, флюоресценції – 510 нм. Молярна екстинція  $\varepsilon = 4.3 \cdot 10^6$ .

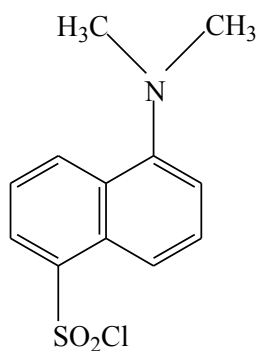


Рис. 7. Структурна формула данзилхлориду

В лужному середовищі, відщеплюючи іон хлору, данзильний залишок приєднується до амінокислот, пептидів та білків, головним чином, за їх кінцевою аміногрупою. При цьому його здатність флюоресциувати зберігається.

## КАПЛЯРНИЙ ЕЛЕКТРОФОРЕЗ

Метод капілярного електрофорезу базується на розділенні компонентів складної суміші в кварцовому капілярі під дією прикладеного електричного поля. Мікрооб'єм аналізованого розчину вводять у капіляр, який попередньо заповнено підходящим буфером – електролітом. Після подання до кінців капіляра високої напруги (до 30 кВ) компоненти суміші починають рухатися по капіляру з різною швидкістю, яка залежить у першу чергу від заряду і величини іонного радіуса, і відповідно, у різний час досягають зони детектування. Отримана послідовність піків називається електрофореграмою, при цьому якісною характеристикою речовини є параметр утримування (час міграції), а кількісною – висота чи площа піку, пропорційна концентрації речовини. На рис. 8 показана схема установки для капілярного електрофорезу.

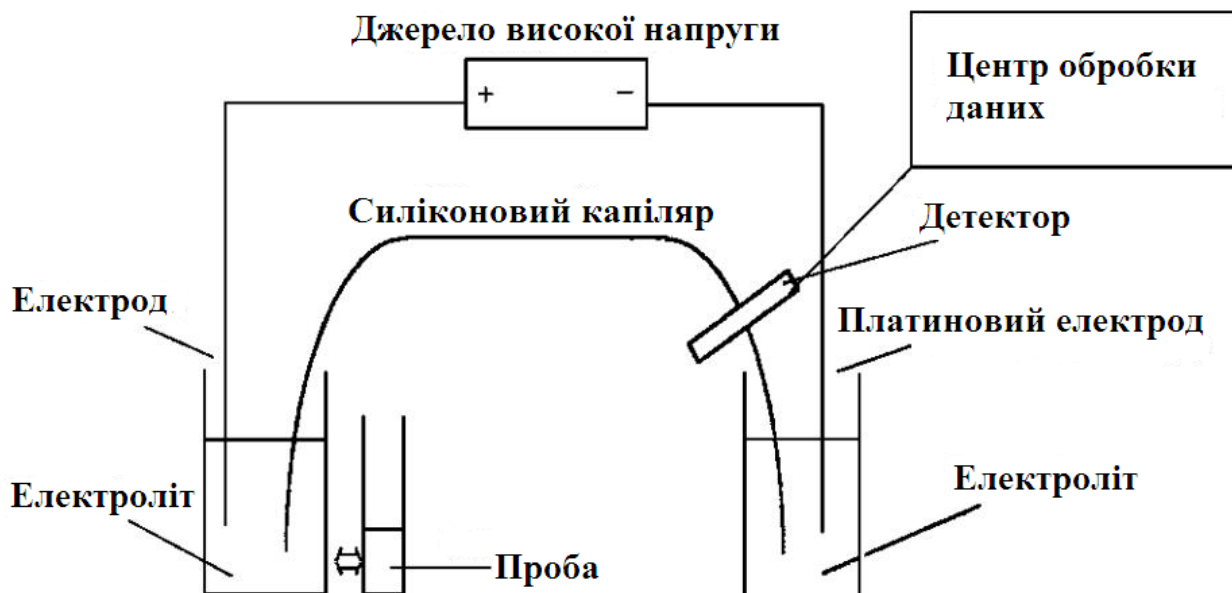


Рис. 8. Схема установки для капілярного електрофорезу

При проведенні розділення у капілярах особливо важливе значення набуває електроосмотичний потік (ЕОП), пов'язаний із рухом дифузної частини подвійного шару, який утворюється відносно зарядженої поверхні внутрішньої стінки капіляра (рис. 9).

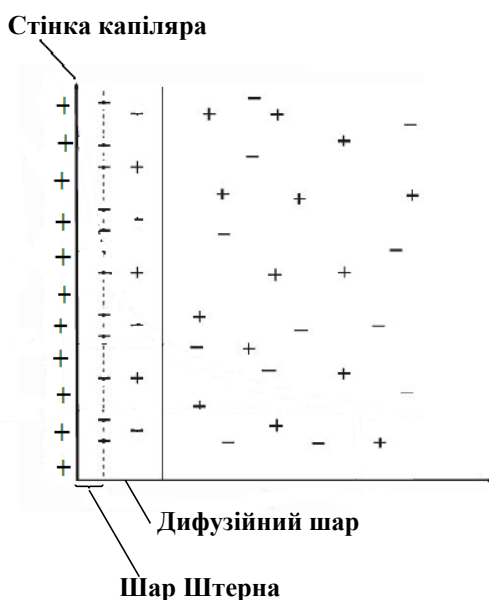


Рис. 9. Подвійний електричний шар на стінці капіляра

Швидкість електроосмотичного потоку ( $v_{eo}$ ) залежить від електроосмотичної рухливості, яка у свою чергу визначається

густиною заряду на внутрішній стінці капіляра та характеристиками буфера.

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = \frac{\varepsilon \cdot \xi}{\eta} \cdot E, \quad (11)$$

де  $\varepsilon$  — діелектрична проникність,  $\xi$  — дзета потенціал,  $\eta$  — динамічна в'язкість середовища.

Як правило, заряд поверхні визначається наявністю негативно заряджених силанольних груп на поверхні немодифікованих кварцових капілярів або створюється за рахунок додаткової модифікації поверхні. Результируюча рухливість частинок є сумою електрофоретичної та електроосмотичної рухливостей:

$$\mu = \mu_{ef} + \mu_{eo}. \quad (12)$$

Швидкість пересування іонів з однаковим напрямком електрофоретичної та електроосмотичної рухливостей буде збільшуватись, а з протилежним — зменшуватись. Для немодифікованого кварцового капіляра в дифузній частині подвійного електричного шару присутня надлишкова концентрація катіонів, в результаті руху яких виникає ЕОП, направлений до катода. В результаті катіони будуть пересуватися швидше та дететкуватися до ЕОП, а аніони повільніше та дететкуватися після ЕОП, нейтральні молекули рухаються із ЕОП.

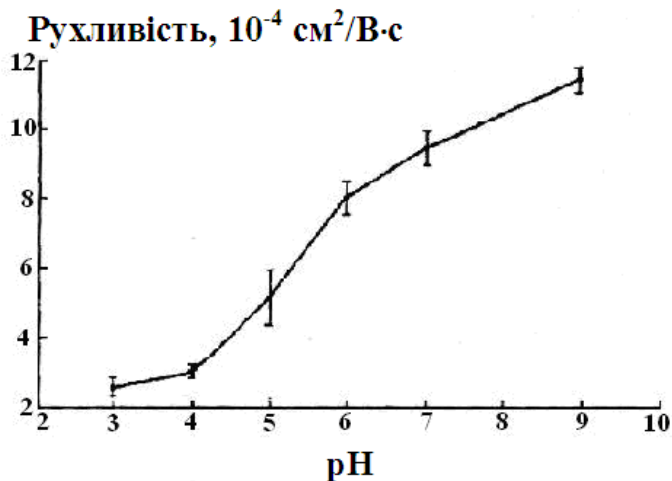


Рис. 10. Залежність електроосмотичного потоку від рН

У кварцових капілярах ЕОП зменшується при збільшенні концентрації електроліту і додаванні органічних розчинників та зростає зі збільшенням рН (рис. 10), а також залежить від в'язкості розчину в капілярі та температури. Якщо ж при додаванні катіонних ПАР до роздільного буфера на поверхні капіляра адсорбується позитивний заряд, то ЕОП змінює напрям і переносить роздільний буфер у напрямку анода. Таблиця 2 дає уявлення про можливості впливу на ЕОП.

Унікальною особливістю ЕОП є плаский профіль потоку в капілярі. Такий профіль є вигідним, оскільки зменшується розмивання зон речовин, що розділюють. Ефективність розділення в капілярному електрофорезі прямо пропорційна, а час аналізу обернено пропорційний напрузі, прикладеній до електродів.

Розділення в капілярному електрофорезі може бути виконано як із позитивною, так і з негативною полярністю електродів. Якщо для компонентів проби відомі значення  $pK_a$ , можна вибрати буфер із відповідним значенням рН і полярність електродів, щоб зразок рухався в бік детектора. Швидкість міграції залежить від напруженості електричного поля, яка звичайно складає 200—400 В/см.

*Існує кілька варіантів капілярного електрофорезу, що відрізняються за принципом та механізмом розділення.*

Капілярний зонний електрофорез є найрозповсюдженішим. Він передбачає застосування одного буфера як розділювального середовища. Розділення компонентів проби базується на розбіжностях у рухливостях заряджених молекул чи іонів. Метод широко застосовують для визначення пептидів, білків, амінокислот, лікарських препаратів, неорганічних іонів та багатьох інших об'єктів.



Таблиця 2. Можливості впливу на електроосмотичний потік

| Зміни у системі розділення                                   | Дія на ЕОП   | Примітки   |
|--|--|--|
| pH буфера  | ЕОП зростає при зменшенні pH                       | Може також впливати на заряд проби   |
| Концентрація буфера  | ЕОП зростає при зменшенні концентрації буфера      | Висока концентрація обумовлює сильну течію, мала концентрація легко призводить до перевантаження |
| Температура  | Змінюється в'язкість (2—3 % на 1 <sup>0</sup> C)   | Може також впливати на селективність   |
| Органічні розчинники   | Зміна ЕОП та в'язкості                             | Комплексна зміна буфера розділюючої системи, у більшості випадків зі зміною селективності        |
| ПАР як добавки до буферів або нейтральні гідрофобні полімери | Адсорбція на стінці капіляру. Характерна зміна ЕОП | Аніонні ПАР можуть збільшити ЕОП, катіонні ПАР зменшують або обертають ЕОП                       |
| Динамічні покриття   | При утворенні міцел сильна зміна селективності     | Проблеми зі стабільністю   |
| Ковалентні покриття  | Зменшують адсорбцію на стінках                     | Проблеми зі стабільністю   |
| Радіальне електричне поле                                    | Зміна ЕОП  | Обмежене розповсюдження  |

Капілярний іонний аналіз – це різновид капілярного зонного електрофорезу, в якому для визначення неорганічних іонів, що не поглинають світло в УФ-області спектра, застосовується посереднє фотометричне детектування. Це роблять, уводячи до буфера для електрофорезу катіони, що поглинають світло в УФ-області спектра.

Капілярна електрокінетична хроматографія – базується на розділенні нейтральних частинок при їх розподілі між частинками, які рухаються в електричному полі, та електролітом, який заповнює капіляр. Такий розподіл може бути обумовлений дією молекулярних сил, іон-парною взаємодією, комплексоутворенням (лігандний обмін). Існують різновиди капілярної електрокінетичної хроматографії: міцелярна, іонообмінна, лігандообмінна.

## **ІНШІ ВИДИ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ**

### **Ізоелектричне фокусування**

Ізоелектричне фокусування – це один із методів розділення молекул, що базується на їх поведінці в електричному полі. Під час ізоелектричного фокусування між анодом і катодом створюється градієнт рН. Заряджені молекули, які спочатку рівномірно розподілені в середовищі або нанесені у вигляді однієї смуги, рухаються у відповідності з їх фактичним зарядом у напрямку протилежно зарядженого електрода. Якщо ці молекули амфотерні, то при переміщенні у градієнті рН їх сумарний заряд буде непереривно змінюватися доки, поки вони не дійдуть до положення, де він дорівнюватиме нулю. Це здійсниться в тому місці градієнта рН, де значення рН дорівнюватиме ізоелектричній точці молекули (рис. 11). Таким чином, молекули, що мають

однакову ізоелектричну точку, сконцентруються у вузькій зоні. Якщо градієнт рН стабільний, то подальші зміни не відбуватимуться і молекули залишаться сконцентрованими, оскільки їх дифузії перешкоджає електричне поле. Найчастіше цей процес називають ізоелектричним фокусуванням, однак в літературі можна зустріти і такі терміни, як ізоелектричне фракціонування, ізоелектричне розділення, ізоелектрична конденсація та стаціонарний електроліз.

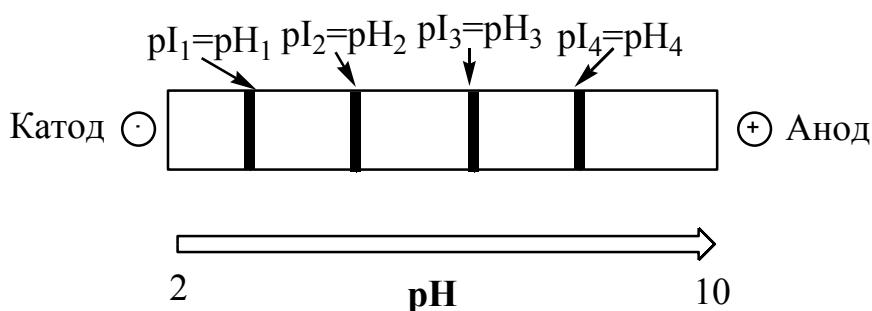


Рис. 11. Розподіл аналітів в методі ізоелектричного фокусування

Винахідниками ізоелектричного фокусування є Уільямс та Уотерман, які в 1929 р. чітко сформулювали його основні принципи.

Свенсон визначив умови одержання стійких градієнтів рН. Він ввів термін «природний градієнт рН», який можна пояснити на прикладі. Припустімо, що розведений розчин нейтральної солі, наприклад сульфата натрію, піддається електролізу між платиновими електродами. При відсутності перемішування біля катода та анода будуть накопичуватися відповідно гідроксид натрію та сірчана кислота. Якщо тепер додати у систему амфотерну речовину, то вона виявиться негативно зарядженою у катода і позитивно зарядженою у анода. Оскільки негативно заряджені іони повинні рухатися у напрямку до анода, а позитивно заряджені – до

катода, іони амфотерної речовини, яка додана до системи, перемістяться від електродів та займуть якесь проміжне положення між ними в тому місці, де рН виявиться рівним їх ізоелектричній точці. При цьому сумарний заряд амфотерних молекул дорівнюватиме нулю. Якщо ж в описану вище систему додати суміш амфотерних речовин, то кожна із них досягне місця, що відповідає його ізоелектричній точці. Компоненти із високими ізоелектричними точками будуть фокусуватися поблизу гідроксиду натрію, а з низьким – поблизу сірчаної кислоти. Це означає, що між катодом та анодом сформувався градієнт рН. У тих випадках, коли немає необхідності у максимально високих та низьких значеннях рН, можна застосовувати сіль більш слабкої основи і більш слабкої кислоти, наприклад, ацетат амонію.

Для того щоб за допомогою стаціонарного електролізу розділити два амфоліти, необхідна присутність третього із проміжною ізоелектричною точкою.

*Градієнти рН можна одержувати трьома принципово різними методами:*

- 1) за допомогою амфолітів-носіїв,
- 2) шляхом формування температурного градієнта,
- 3) шляхом допоміжного градієнта концентрації.

Зупинимося детальніше на першому способі.

Свенсон та Вестерберг визначили вимоги до амфолітів-носіїв при розділенні білків методом ізоелектричного фокусування:

1. Амфоліти-носії повинні характеризуватися високою буферною ємністю при значеннях рН, які близькі до їх ізоелектричних точок, щоб величина рН не змінювалась навіть у присутності 0.5 % білка при тому, що середня концентрація самих амфолітів-носіїв складає 1 %.

2. Для досягнення доброго розділення речовин, лише трохи розрізнених за ізоелектричними точками, необхідно застосовувати велику кількість амфотерних сполук, ізоелектричні точки яких різняться менш ніж на 0.05 одиниці рН.

3. Суттєво, щоб ізоелектричні точки амфолітів-носіїв охоплювали широкий діапазон рН, бажано від 2.5 до 11, оскільки ізоелектричні точки більшості білків лежать в межах рН 3—10.

4. Амфоліти-носії повинні мати високу розчинність у воді.

5. Необхідно, щоб амфоліти-носії мали достатньо низьку оптичну густину при 280 нм, оскільки вимірювання поглинання ультрафіолетового світла є найпростішим способом виявлення білків.

6. Амфоліти-носії не повинні міцно зв'язуватися з білками. З цієї точки зору гідрофільні речовини мають перевагу перед гідрофобними, оскільки останні сильніше «прилипають» до білків.

7. Наприкінці дослідів по препаративному виділенню макромолекул амфоліти-носії необхідно видалити із розчину. Тому краще використовувати амфоліти із низькою молекулярною масою, оскільки їх можна потім легко відділити від макромолекул.

8. Дуже важливо, щоб у процесі електрофокусування провідність була всюди рівномірно високою, оскільки в зонах зі зниженою провідністю може виникнути місцевий перегрів.

## **Ізотахофорез**

Ізотахофорезом називається такий вид електрофорезу, при якому всі заряджені компоненти рухаються в електричному полі з однаковими (ізо) швидкостями (тахо). Принцип ізотахофорезу був відкритий ще Кольраушем у 1897 р., однак як метод розділення він

почав розповсюджуватися лише у 70-х роках після того, як були детально досліджені його основи та переваги.

При «класичному» електрофорезі іони, які розділяють, знаходяться в одному електрофоретичному буфері та рухаються в електричному полі з різними швидкостями. В умовах ізотахофорезу всі іони переміщуються з однією і тією ж самою швидкістю, але розміщуються один за іншим у відповідності з їх рухливостями.

При ізотахофорезі розділення іонів відбувається у відповідності із їх рухливостями, а концентрація іонів у кожній зоні залежить від концентрації попереднього іону. Це означає, що концентрація іонів в будь-якій зоні визначається першим, або провідним, іоном. Необхідно, щоб іон, який досліджують, знаходився між провідним та замикаючим іонами. Останній повинен мати найнижчу рухливість порівняно з усіма іонами, які знаходяться в системі. У цьому випадку іони розміщуються у такій послідовності, що іон із більш високою рухливістю буде рухатися попереду іона з меншою рухливістю. Оскільки в умовах ізотахофорезу швидкості всіх іонів, як і сила струму в усіх зонах, однакові, згідно з законом Ома, градієнт напруги у кожній зоні буде іншим. Чим менша рухливість іону, тим більше перепад напруги в цій зоні. Тому всі іони здобувають однакову швидкість, не дивлячись на розбіжності у їх рухливостях (рис. 12).

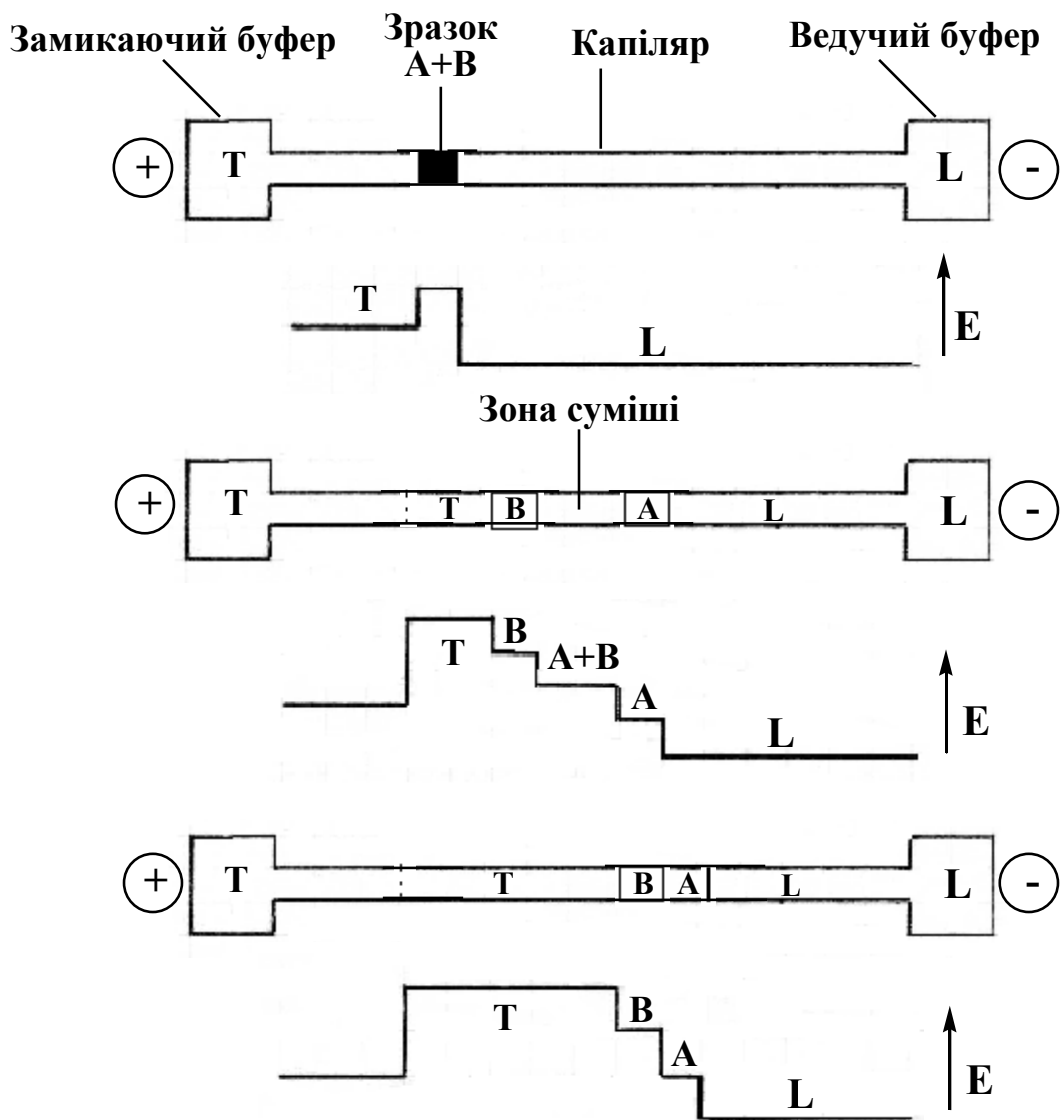


Рис. 12. Схема ізотахофезу

## ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

### *Загальні зауваження:*

Необхідною умовою успішного виконання лабораторного практикуму та уникнення аварійних ситуацій або нещасних випадків є уважне вивчення методики досліду, планування етапів роботи, дотримання вимог охорони праці.

1. Розпочинати роботу можна лише після бесіди з викладачем (допуск до лабораторної роботи), в ході якої слід описати основні етапи досліду із зазначенням заходів безпеки, вміти відповісти на теоретичні контрольні питання за темою лабораторної роботи.
2. Перед заняттям слід оформити лабораторний журнал відповідно до наступних вимог:
  - заголовок: лабораторна робота №, назва лабораторної роботи;
  - стисле формулювання мети роботи;
  - реактиви та обладнання;
  - план роботи з чітким розділенням на етапи.
3. Якщо будь-які етапи роботи викликають сумніви, обов'язково проконсультуйтеся із викладачем.
4. У лабораторії необхідно знаходитись у халаті, при собі мати невеличкий рушничок для рук.
5. Не нагрівайте, не змішуйте, не лийте та не збовтуйте реактиви поблизу обличчя. Завжди направляйте шийку посудини від обличчя і тіла. Не направляйте шийку посудини в бік працюючих поблизу товаришів.
6. Ніколи не набирайте рідину до піпетки ротом, завжди використовуйте грушу.



7. Уникайте вдихання парів або пилу речовин, з якими ви працюєте. З леткими речовинами працюйте лише у витяжній шафі. Під час приготування гелів застосовуйте гумові рукавички.
8. В лабораторії не можна їсти, пити, палити та працювати у нетверезому стані.
9. Якщо виникло загорання на робочому місці, відключіть вентиляцію, електрику загальним розмикачем. Невеличке вогнище засипте піском або накрийте азбестовою ковдрою. У випадку вогнища на великій ділянці застосовуйте вогнегасник.

*Перша допомога при нещасних випадках:*

- При термічному опіку одразу слід обробити уражену ділянку етиловим спиртом.
- При потраплянні на шкіру кислоти необхідно змивати її проточною водою протягом 15 хв., потім уражену ділянку промити 2—3 % розчином питної соди.
- При потраплянні на шкіру лугу необхідно змивати його проточною водою протягом 15 хв., потім уражену ділянку промити 2—3 % розчином оцтової або борної кислоти.
- При потраплянні будь-яких речовин в очі ретельно промийте їх великою кількістю проточної води і обов'язково зверніться до лікаря.
- При спалахуванні одягу на людині накиньте на нього повстяну ковдру або будь-яку щільну тканину, щоб збити полум'я. Не дозволяйте постраждалому бігти, це підсилить горіння.

## Лабораторна робота № 1

### Приготування гелю з агарози для електрофорезу

Мета: ознайомитись з прийомами приготування гелю з агарози, приготувати гель із масовою часткою агарози 1 %.

Реактиви та обладнання:

- агароза, фосфатний буфер (рН 6.2);
- столик для заливки гелю, рамка, гребенки, хімічний стакан місткістю 300 мл, мірна колба місткістю 200 мл, терези аналітичні, шпатель, водяна баня.

Хід роботи:

Для приготування 1 % розчину агарози беруть наважку агарози 2 г на аналітичних терезах, розчиняють агарозу в 200 мл буферного розчину, перемішують. Отриманий розчин агарози ставлять на водяну баню. Періодично перемішуючи, продовжують нагрівати, не допускаючи кипіння. Отриманий гель повинен бути прозорим і не містити окремих нерозплавлених частинок.

Розплав охолоджують при кімнатній температурі до 55—60°C.

*Увага:* не допускати утворення поверхневої плівки та піни, розшаровування по густині.

Вирівнюють столик для заливки гелів, заливають розплавлений гель в рамку таким чином, щоб товщина шару розплаву була не менше ніж 5 мм. *Увага:* не допускати утворення пухирів повітря. Встановлюють гребенки, не торкаючись дна форми, але не менше ніж на 3 мм на відстані 3 см та більше одна від одної.

Після повного застигання гелю (звичайно 30 хв. при кімнатній температурі 18–25 °С) обережно виймають гребенки, плавним рухом вгору, намагаючись не пошкодити утворені лунки.

Затверділий гель являє собою не цілком рівноважну систему: з часом він дещо ущільнюється, видавлюючи з себе рідину. Цей процес іде спочатку досить швидко, а потім дуже повільно. Тим не

менш гелі агарози перед дослідом слід витримувати протягом 12 год. (відкриті пластини для горизонтального електрофорезу витримують у вологій камері).

Допускається зберігання готових гелів в щільно закритих ємностях із невеликою кількістю буферного розчину (рН 6.2) протягом 1 місяця при температурі 2—8 °С.

## **Лабораторна робота № 2**

### **Розділення синтетичних барвників методом гель-електрофорезу**

Мета: ознайомитися з методикою розділення барвників та провести розділення чотирьох синтетичних барвників методом гель-електрофорезу.

#### Реактиви та обладнання:

- гель з агарози з масовою часткою 1 % (див. лабораторну роботу № 1), фосфатний буфер (рН 6.2), барвники: метиловий оранжевий, бромфеноловий синій, метиловий червоний, алізариновий червоний С, гліцерин, вода дистильована;
- камера для горизонтального електрофорезу з блоком живлення «Ельф-4», хімічний стакан місткістю 10 мл, мірні колби місткістю 10 мл, терези аналітичні, шпатель, мікрошприц.

#### Хід роботи:

##### *Приготування розчинів синтетичних барвників*

**Алізариновий червоний С** (1,2-Диоксиантрахинон сульфокислоти натрієва сіль): 0.0100 г речовини розчиняють в 8 мл води й доводять об'єм розчину етиловим спиртом до 10 мл.

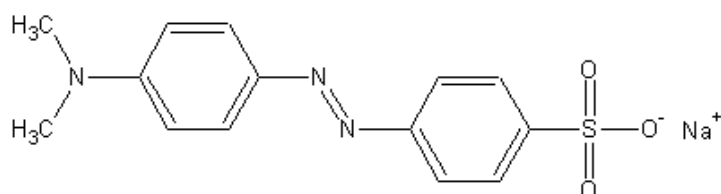
##### **Бромфеноловий синій**

(3',3'',5',5'' — Тетрабромфенолсульффталеїн): 0.0100 г речовини розчиняють в 5 мл етилового спирту й доводять об'єм розчину водою до 10 мл.

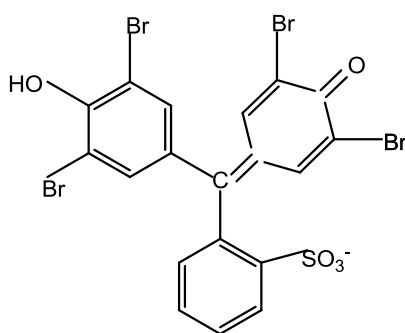
**Метилловий червоний** (4-Диметиламіноазобензол-2-карбонова кислота): 0.0100 г речовини розчиняють при нагріванні в 10 мл етилового спирту.

**Метилловий оранжевий** (4-Диметиламіноазобензол-4'-сульфо кислоти натрієва сіль): 0.0100 г речовини розчиняють в 8 мл гарячої дистильованої води і після охолодження доводять об'єм розчину водою до 10 мл.

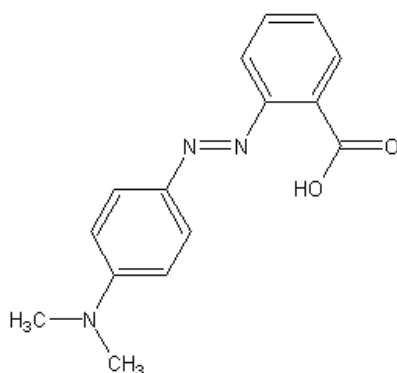
**Суміш барвників:** у стакані змішують по 2.5 мл індивідуальних барвників: метилового оранжевого, бромфенолового синього, метилового червоного, алізаринового червоного С.



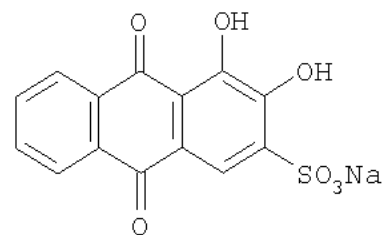
Метилловий оранжевий,  $pK_a = 3.75$



Бромфеноловий синій  
 $pK_a = 4.0$



Метилловий червоний  
 $pK_a = 5.2$



Алізариновий червоний  
 $pK_{a2} = 5.5, pK_{a1} = 9.5$

Для збільшення густини розчинів індикаторів приготувані розчини змішують з 50 % розчином гліцерину у співвідношенні 1:1, для того щоб досліджуваний зразок опустився на дно лунки. Замість розчину гліцерину можна використовувати 10 %-й розчин цукру.

#### *Проведення розділення*

В чисту і суху камеру для гель-електрофорезу поміщають підкладку з готовим гелем та вносять досліджувані зразки в лунки гелю. Для цього використовують мікрошприц (10 мкл). В лунки вносять зразки індивідуальних барвників (для ідентифікації барвників у суміші) та їх суміш. *Увага:* після внесення кожного зразка необхідно ретельно промивати мікрошприц буферним розчином. Потім камеру заповнюють буферним розчином так, щоб він не наповнював колодязі. Електропровідність забезпечують за допомогою фільтрувального паперу, змоченого в буфері для електрофорезу.

Закривають кришку камери. Підключають камеру до джерела струму, дотримуючись полярності, і включають джерело. Встановлюють параметри джерела: напруга 100 В, сила струму 400 мА, час електрофорезу – 2—3 години. *Увага:* при цьому необхідно слідкувати за тим, щоб камера не перегрівалася.

Великі і малі частки будуть проходити через гель із різною швидкістю залежно від розмірів часток порівняно з розміром отворів у гелі.

Після завершення електрофорезу вимикають джерело струму і знімають кришку з камери. Реєструють результати електрофорезу.

## Лабораторна робота № 3

### Ідентифікація складу харчових барвників методом гел'єлектрофорезу

Мета: ознайомитися з методикою розділення харчових барвників та провести ідентифікацію харчових барвників: коричневого, зеленого та світло-зеленого методом гел'єлектрофорезу.

#### Реактиви та обладнання:

- гел' з агарози з масовою часткою 1 % (див. лабораторну роботу № 1), фосфатний буфер (рН 6.2), барвники стандарти: тартразін Е 102 (жовтий), синій блискучий FCF або діамантовий синій Е 133 (синій), індигокармін Е 132 (синій), понсо 4R або червоний Е 124 (червоний), жовтий «Сонячний захід» або оранжевий жовтий S Е 110 (жовто-оранжевий), азорубін або кармоїзин Е 122 (вишневий), барвники для аналізу: коричневий, зелений та світло-зелений, гліцерин, вода дистильована;
- камера для горизонтального електрофорезу з блоком живлення «Ельф-4», хімічний стакан місткістю 10 мл, мірні колби місткістю 10 мл, терези аналітичні, шпатель, мікрошприц.

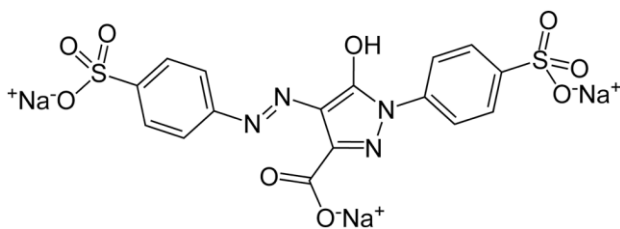
#### Хід роботи:

##### *Приготування розчинів харчових барвників*

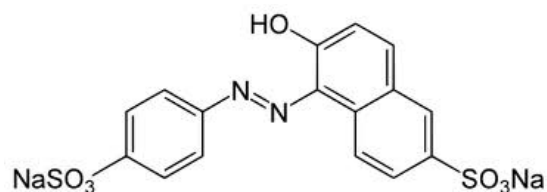
Для приготування 0.5%-их розчинів барвників на аналітичних терезах беруть наважки 0.0500 г барвників стандартів та барвників, які рекомендовано для аналізу, наважки переносять у мірні колби місткістю 10 мл, розчиняють у невеликій кількості води та доводять до мітки дистильованою водою.

Для збільшення густини розчинів індикаторів приготувані розчини змішують з 50 % розчином гліцерину у співвідношенні 1:1,

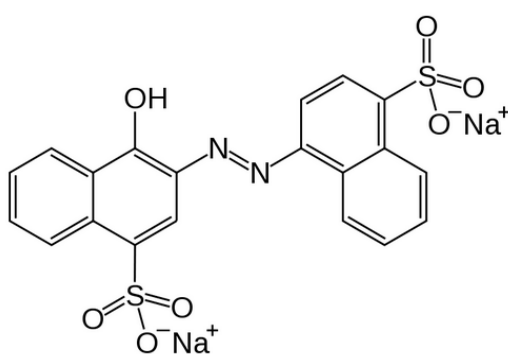
для того щоб досліджуваний зразок опустився на дно лунки. Замість розчину гліцерину можна використовувати 10 %-й розчин цукру.



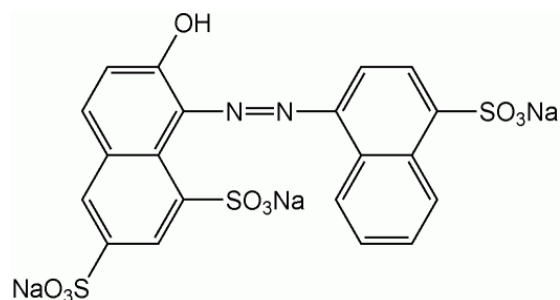
Тартразин E 102



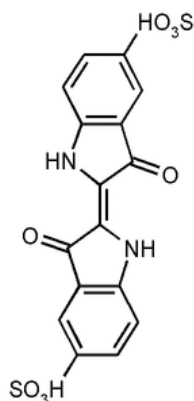
Жовтий «Сонячний захід» E 110



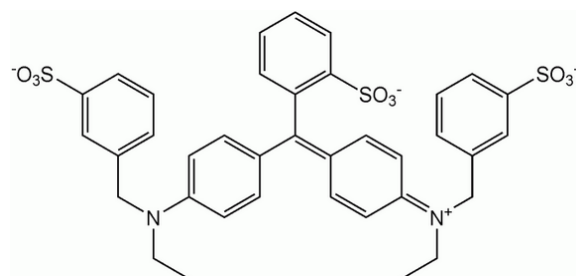
Азорубін E 122



Червоний E 124



Індигокармін E 132



Синій блискучий FCF E 133

### *Проведення розділення*

В чисту і суху камеру для гель-електрофорезу поміщають підкладку з готовим гелем та вносять досліджувані зразки в лунки гелю. Для цього використовують мікрошприц (10 мкл). В лунки вносять зразки барвників стандартів (для ідентифікації барвників у

суміші) та барвники для аналізу. Барвник коричневий є сумішшю барвників E102, E110, E122, E 124 та E 133; барвник зелений – E102 та E132; світло-зелений – E102 та E133. *Увага:* після внесення кожного зразка необхідно ретельно промивати мікрошприц буферним розчином. Потім камеру заповнюють буферним розчином так, щоб він не наповнював колодязі. Електропровідність забезпечують за допомогою фільтрувального паперу, змоченого в буфері для електрофорезу.

Закривають кришку камери. Підключають камеру до джерела струму, дотримуючись полярності, і включають джерело. Встановлюють параметри джерела: напруга 100 В, сила струму 400 мА, час електрофорезу – 2—3 години. *Увага:* при цьому необхідно слідкувати за тим, щоб камера не перегрівалася.

Після завершення електрофорезу вимикають джерело струму і знімають кришку з камери. Реєструють результати електрофорезу та роблять висновок щодо складу барвників, що були взяті для аналізу.

#### **Лабораторна робота № 4**

##### **Приготування гелю з поліакриламідом для електрофорезу**

Мета: ознайомитись з прийомами приготування гелю з поліакриламідом, приготувати гель з масовою часткою поліакриламідом 4.5 %.

##### Реактиви та обладнання:

- Трис-(оксиметил)-амінометан, ч.д.а., TEMED, ч., кислота хлороводнева 0.1 моль/л, акриламід (99 %), N, N'-метилен-біс-акриламід, ч.д.а., персульфат амонію, ч.д.а., гліцин, ч.д.а., розчин оцтової кислоти з масовою часткою 7 % (промивна рідина та рідина для зберігання гелів);



- столик для заливки гелю, рамка, гребенки, хімічний стакан місткістю 300 мл, мірні колби місткістю 1 л, 200 мл, 100 мл, 50 мл та 25 мл, терези аналітичні, шпатель.

Хід роботи:

*Приготування вихідних розчинів*

**Розчин А:** на аналітичних терезах зважити 2.287 г трис-(оксиметил)-амінометану, наважку перенести у стакан місткістю 25 мл, додати 3 мл HCl та 0.01 мл ТЕМЕД і додати 3.25 мл дистильованої води.

**Розчин В:** зважити 3.5 г акриламід (отрута, працювати у гумових рукавичках) та 0.0919 г N, N'-метилен-біс-акриламід. *Увага:* наважку метилен-біс-акриламід перенести у стакан місткістю 50 мл та розчинити 5 мл води, потім додати акриламід і додати 7.5 мл дистильованої води. Розчин відфільтрувати (працювати у витяжній шафі).

**Розчин С:** Наважку персульфат амонію масою 0.035 г розчинити у 25 мл дистильованої води.

Розчини А та В можуть зберігатися в темних сосудах в холодильнику протягом декількох тижнів. Розчин С використовують щойно приготованим.

**Розчин D (pH 8.9):** змішати 6.25 мл розчину А, 12.5 мл розчину В, 6.25 мл води. Помістити отриманий розчин на магнітну мішалку, встановити рівномірну швидкість перемішування та дочекатися повного видалення бульбашок повітря. Потім по скляній паличці додати 25 мл розчину С.

**Електродний буфер (pH 8.3):** Взяти наважки трис-(гидроксиметил)-амінометану 0.6 г та гліцину. – 2.875 г, наважки перенести у мірну колбу місткістю 1 л та довести до мітки водою.

*Приготування гелю*

Вирівнюють столик для заливки гелів, заливають розчин D в рамку таким чином, щоб товщина шару розплаву була не менше ніж 5 мм. Встановлюють гребенки, не торкаючись дна форми, але не менше, ніж на 3 мм на відстані 3 см та більше одна від одної.

Після повного застигання гелю (звичайно 30 хв. при кімнатній температурі 18–25 °С) обережно виймають гребенки, плавним рухом вгору, намагаючись не пошкодити утворені лунки.

Допускається зберігання готових гелів у щільно закритих ємностях з невеликою кількістю буферного розчину (рН 8.9) протягом 1 місяця при температурі 2–8 °С.

## **Лабораторна робота № 5**

### **Розділення амінокислот методом електрофорезу у гелі з поліакриламідом**

Мета: ознайомитися з прийомами розділення амінокислот у гелі з поліакриламідом, провести розділення трьох амінокислот.

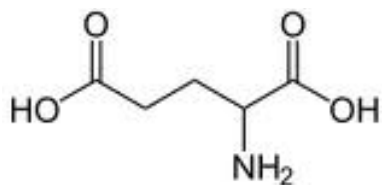
#### Реактиви та обладнання:

- гель із поліакриламідом, буферний розчин рН 8.3 (див. лабораторну роботу № 4); розчин оцтової кислоти з масовою часткою 7 % (промивна рідина та рідина для зберігання гелів), барвник амідочорний 10 В, амінокислоти: глютамінова кислота, гліцин, лізин, фенілаланін, аргінін, аспарагінова кислота, валін, гістидин.
- камера для горизонтального електрофорезу з блоком живлення «Ельф-4», хімічний стакан місткістю 10 мл, мірні колби місткістю 10 мл та 500 мл, терези аналітичні, шпатель, мікрошприц.

## Хід роботи:

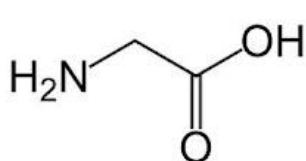
### *Приготування розчинів*

Група готує один з 3-х варіантів сумішей амінокислот, варіант визначається викладачем. У кожному варіанті є кисла, основна та нейтральна амінокислоти. Приклади варіантів: глутамінова кислота, гліцин, лізин; глутамінова кислота, фенілаланін, аргінін; аспарагінова кислота, валін, гістидин.



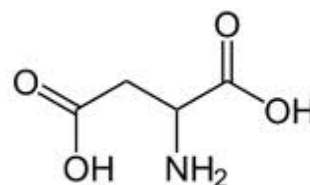
глутамінова кислота,

$pK_{a3} = 2.2, pK_{a2} = 4.3, pK_{a1} = 9.7$



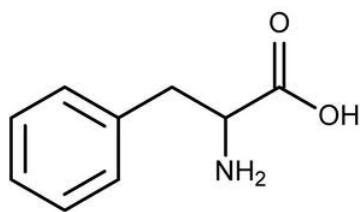
гліцин,

$pK_{a2} = 2.3, pK_{a1} = 9.6$



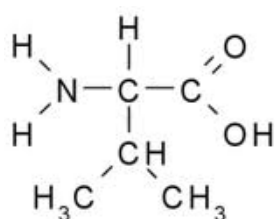
аспарагінова кислота,

$pK_{a3} = 1.9, pK_{a2} = 3.6, pK_{a1} = 9.6$



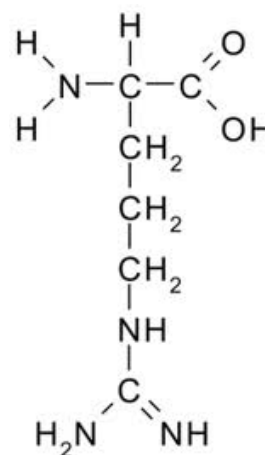
фенілаланін,

$pK_{a2} = 2.6, pK_{a1} = 9.2$



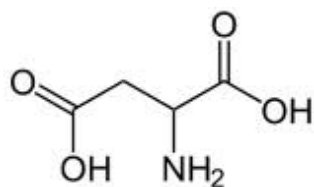
валін,

$pK_{a2} = 2.3, pK_{a1} = 9.7$



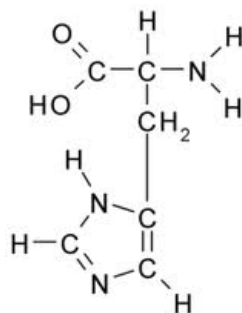
аргінін,

$pK_{a3} = 2.2, pK_{a2} = 9.1,$   
 $pK_{a1} = 13.2$



лізин,

$pK_{a3} = 2.2, pK_{a2} = 8.9, pK_{a1} = 9.7$



гістидин,

$pK_{a3} = 1.8, pK_{a2} =$   
 $6.0, pK_{a1} = 9.0$

**Стандартні розчини:** окремі наважки амінокислот масою 0.020–0.025 г перенести у мірні колби місткістю 10 мл та довести до мітки водою.

**Суміш амінокислот:** зважити по 0.020–0.025 г кожної з трьох амінокислот. Усі три наважки висипати в мірну колбу місткістю 10 мл, довести до мітки дистильованою водою.

**Барвник:** амідочорний 10 В масою 5 г перенести в мірну колбу місткістю 500 мл, розчинити в 7 %-му водному розчині оцтової кислоти та довести до мітки.

#### *Проведення розділення*

У чисту і суху камеру для гель-електрофорезу поміщають підкладку з готовим гелем та вносять досліджувані зразки в лунки гелю. Для цього використовують мікрошприц (10 мкл). В лунки вносять зразки стандартів амінокислот (для ідентифікації компонентів суміші) та суміш для аналізу. *Увага:* після внесення кожного зразка необхідно ретельно промивати мікрошприц буферним розчином (рН 8.3). Потім камеру заповнюють буферним розчином так, щоб столик із гелем був занурений у буферний розчин.

Закривають кришку камери. Підключають камеру до джерела струму, дотримуючись полярності, і включають джерело. Встановлюють параметри джерела: напруга 100 В, сила струму 400 А, час електрофорезу – 2—3 години. *Увага:* при цьому необхідно слідкувати за тим, щоб камера не перегрівалася. Після завершення електрофорезу вимикають джерело струму і знімають кришку з камери.

#### *Проявлення електрофореграми*

Обережно відокремлюють гель від столика та занурюють у розчин барвника і залишають для забарвлення на 1 год. Потім промивають забарвлений гель водою та переносять у промивну рідину – розчин оцтової кислоти з масовою часткою 7 %. Промивну рідину змінюють багаторазово протягом кількох днів, поки не досягнуть обезбарвлення фону.

Реєструють результати електрофорезу та роблять висновок щодо складу суміші амінокислот, що були взяті для аналізу.

## **Лабораторна робота № 6**

### **Визначення молекулярної маси білка методом електрофорезу у гелі з поліакриламідом (метод Вебера-Осборн)**

Мета: ознайомитися з прийомами визначення молекулярної маси білка при проведенні електрофорезу у гелі з поліакриламідом.

#### Реактиви та обладнання:

- 30 % розчин акриламідом, що містить 0.6 % біс акриламідом;
- 0.2 моль/л фосфатний буферний розчин рН 7.2;
- 0.02 моль/л фосфатний буферний розчин рН 7.2;
- 0.05 моль/л фосфатний буферний розчин рН 7.2 (електродний буфер);
- розчин персульфату амонію 15 мг/мл (готують безпосередньо перед використанням);
- тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД);
- 70 % розчин ізопропілового спирту (фіксує розчин);
- 0.04 % розчин кумасі R-250 у розчині ізопропанолу – оцтова кислота – вода (20:10:70 об.);
- 10 % розчин оцтової кислоти;
- 10 % розчин додецилсульфату натрію (ДСН);
- β-меркаптоетанол;
- 0.001 % розчин бромфенолового синього;
- набір білків-маркерів:
  - фосфорілаза (91000 Да);
  - бичий сироватковий альбумін (68000 Да);
  - яєчний альбумін (42000 Да);
  - хімотріпсіноген А (27000 Да);

- РНКаза (14000 Да);
- цитохром С (12000 Да);
- камера для вертикального електрофорезу з блоком живлення «Ельф-4», хімічний стакан місткістю 10 мл, мірні колби місткістю 10 мл та 500 мл, терези аналітичні, шпатель, мікрошприц.

#### Хід роботи:

##### *Приготування поліакриламідного гелю*

У стакан місткістю 50—70 мл поміщають 10 мл розчину акриламиду (отрута, працювати в гумових рукавичках у витяжній шафі), 15 мл 0.2 моль/л фосфатного буферного розчину рН 7.2, 30 мг ДСН, 3.2 мл дистильованої води, 1.5 мл розчину персульфату амонію та 0.04 мл тетраметіленетилендіаміну, обережно перемішують на мішалці протягом 5 хв. та готують пластинку для вертикального електрофорезу.

##### *Приготування розчинів*

**Стандартний розчин:** по 5 мг кожного стандартного зразка поміщають у градуйовану пробірку місткістю 10 мл, додають 0.1 мл 10 % розчину ДСН, 0.03 мл β-меркаптоетанолу та доводять об'єм розчину до 1 мл водою. Розчин витримують на киплячій водяній бані протягом 5 хв. та охолоджують до кімнатної температури.

**Випробовуваний розчин:** близько 5 мг випробовуваного зразку поміщають у градуйовану пробірку місткістю 10 мл, додають 0.1 мл 10 % розчину ДСН, 0.03 мл β-меркаптоетанолу та доводять об'єм розчину до 1 мл дистильованою водою. Розчин витримують на киплячій водяній бані протягом 5 хв. та охолоджують до кімнатної температури.

У відповідні комірочки пластинки наносять по 20, 40 та 60 мкл стандартного та випробовуваного розчинів поперемінно, в одну комірочку поміщають 20 мкл розчину бромфенолового синього та обережно підшарюють електродний буфер. До електродного буфера катодного з'єднання додають ДСН до концентрації 0.1 %. Отримують електрофореграму при силі току 8 мА; напругу 100—200 В встановлюють, коли зразки вийдуть у гель. Розділення проводять доки барвник пройде 4/5 пластинки (близько 4—6 годин).

Після закінчення електрофорезу обережно знімають гель з пластинки, поміщають його у фіксуєчий розчин на 1 год. Гелі забарвлюють, витримуючи у розчині барвнику кумасі протягом 2 год. та промивають 10 % розчином оцтової кислоти для видалення надлишку барвника.

### **Обробка електрофореграм**

Лінійкою вимірюють шлях від комірочки нанесення до кожного зі стандартів та будують калібрувальну криву залежності шляху, що пройшов білок-стандарт, від логарифму молекулярної маси. Визначивши шлях, який пройшов білок у випробовуваному зразку, визначають його молекулярну масу.

## **Лабораторна робота № 7**

### **Визначення молекулярної маси білка методом електрофорезу у гелі з поліакриламідом (метод Лемлі)**

Мета: ознайомитися з прийомами визначення молекулярної маси білка при проведенні електрофорезу у гелі з поліакриламідом.

#### Реактиви та обладнання:

- 30% розчин акриламідом, що містить 0.4 % бісакриламідом;

- буферний розчин рН 8.8: 1.5 моль/л трис-НСІ буфер з 0.4 % ДСН;
- буферний розчин рН 6.8: 0.5 моль/л трис-НСІ буфер з 0.4 % ДСН;
- електродний буфер рН 8.6: 0.025 моль/л трис – 0.192 моль/л гліцин (наважку гліцину розчиняють у воді, додають сухий трис до рН 8.6, доводять об'єм водою);
- буферний розчин рН 6.8 для зразків: 0.0625 моль/л трис-НСІ буфер (рН 6.8), 2 % ДСН, 10 % сахарози або гліцерину, 0.001 % бромфенолового синього. Перед використанням до розчину додають  $\beta$ -меркаптоетанол до концентрації 5 %;
- персульфат амонію;
- тетраметилетендиамін (ТЕМЕД);
- 70 % розчин ізопропілового спирту (фіксує розчин);
- 0.04 % розчин кумасі R-250 у розчині ізопропанолу – етанол – оцтова кислота – вода (2:1:1:6 об.);
- 10 % розчин оцтової кислоти;
- 10 % розчин додецилсульфату натрію (ДСН);
- $\beta$ -меркаптоетанол;
- 0.001 % розчин бромфенолового синього;
- набір білків-маркерів:
  - фосфорілаза (91000 Да);
  - бичий сироватковий альбумін (68000 Да);
  - яєчний альбумін (42000 Да);
  - хімотріпсіноген А (27000 Да);
  - РНКаза (14000 Да);
  - цитохром С (12000 Да);
- камера для вертикального електрофорезу з блоком живлення «Ельф-4», хімічний стакан місткістю 10 мл, мірні колби



місткістю 10 мл та 500 мл, терези аналітичні, шпатель, мікрошприц.

### Хід роботи:

#### *Приготування поліакриламідного гелю*

У стакан місткістю 50—70 мл поміщають 4 мл розчину акриламиду, 5 мл буферного розчину рН 8.8, 30 мг ДСН, 11 мл дистильованої води. До суміші додають 15 мг персульфату амонію та 16 мкл тетраметиленетилендіаміну, обережно перемішують на мішалці протягом 5 хв.

#### *Приготування концентруючого поліакриламідного гелю*

У стакан місткістю 50—70 мл поміщають 12.5 мл розчину акриламиду (отрута, працювати у гумових рукавичках у витяжній шафі), 7.5 мл буферного розчину рН 6.8 та 10 мл дистильованої води. Обережно перемішують та додають 16 мг персульфату амонію та 18 мкл тетраметиленетилендіаміну, обережно перемішують на мішалці протягом 5 хв.

#### **Приготування пластинки для електрофорезу**

Пластинку готують таким чином, щоб співвідношення концентруючий гель – розділюючий гель було 1:5. Заливають відповідну кількість концентруючого гелю та дають йому заполімеризуватися (на поверхню гелю додають воду). Після закінчення полімеризації воду видаляють, наливають гель для розділення та полімеризують (на поверхню гелю додають воду).

#### *Приготування розчинів*

**Стандартний розчин:** по 5 мг кожного стандартного зразку поміщають у градуйовану пробірку місткістю 10 мл, додають 10 мл буферного розчину рН 6.8 для зразків, витримують на киплячій водяній бані протягом 5 хв. та охолоджують до кімнатної температури.

**Випробовуваний розчин:** близько 5 мг випробовуваного зразку поміщають у градуйовану пробірку місткістю 10 мл, додають 10 мл буферного розчину рН 6.8 для зразків, витримують на киплячій водяній бані протягом 5 хв. та охолоджують до кімнатної температури.

У відповідні комірки пластинки наносять по 20, 40 та 60 мкл стандартного та випробовуваного розчинів поперемінно, в одну комірку поміщають 20 мкл розчину бромфенолового синього та обережно підшарюють електродний буфер. До електродного буферу катодного з'єднання додають ДСН до концентрації 0.1 %. Отримують електрофореграму при силі току 8 мА; напругу 100—200 В встановлюють, коли зразки вийдуть у гель. Розділення проводять доки барвник пройде 4/5 пластинки (близько 4—6 годин).

Після закінчення електрофорезу обережно знімають гель із пластинки, поміщають його у фіксуєчий розчин на 1 год. Гелі забарвлюють, витримуючи у розчині барвника кумасі протягом 2 год. та промивають 10 % розчином оцтової кислоти для видалення надлишку барвника.

### **Обробка електрофореграм**

Лінійкою вимірюють шлях від комірки нанесення до кожного зі стандартів та будують калібрувальну криву залежності шляху, що пройшов білок-стандарт, від логарифму молекулярної маси. Визначивши шлях, який пройшов білок у випробовуваному зразку, визначають його молекулярну масу.

## РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Encyclopedia of Separation Science / ed. M. Cooke, C. F. Poole. — Academic Press, 2000. — 4807 p.
2. Encyclopedia of analytical chemistry. Application, theory and instrumentation / ed. R. A. Meyers. — Wiley, 2000. — 14484 p.
3. Spragg S. P. Electrophoresis // Encyclopedia of physical science and technology / ed. R. A. Meyers. — Academic Press, 2001. — P. 363—405.
4. Westermeier R. Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations / R. Westermeier. — [2<sup>nd</sup> ed.]. — New York : Wiley, 1997. — 331 p.
5. Семак И. В. Биохимия белков / И. В. Семак, Т. Н. Зырянова, О. И. Губич. — Минск : БГУ, 2007. — 49 с.
6. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеша, Л. Веерцекеи. — М. : Мир, 1982. — 355 с.
7. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л. А. Остерман. — М. : Наука, 1981. — 288 с.

Навчальне видання

**Куліков** Артем Юрійович  
**Чернишова** Оксана Сергіївна  
**Нікітіна** Наталія Олександрівна

## **ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ**

Коректор *Л. Є. Стешенко*  
Комп'ютерне верстання  
Макет обкладинки *І. М. Дончик*

Формат 60×84/16. Ум. друк. арк. 3,06. Тираж 50 пр. Зам. № 213/12

Видавець і виготовлювач  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,  
61022, м. Харків, пл. Свободи, 4.  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.2009

Видавництво ХНУ імені В. Н. Каразіна  
Тел. 705-24-32