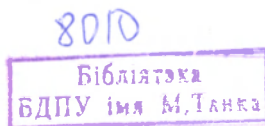


Министерство образования Республики Беларусь
Белорусский государственный педагогический университет
имени Максима Танка

**Ж. Э. Мазец,
Е. В. Спиридович,
Л. В. Гончарова**

ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ В КУРСЕ БИОФИЗИКИ

Учебно-методическое пособие



Минск 2000

УДК 537(075.8)

ББК 22.33я73

М135

Печатается по решению редакционно-издательского совета
БГПУ им. М. Танка

Рецензент: *З. Я. Серова*, доктор биологических наук, зав. лабораторией физиологии большого растения ИЭБ НАН Беларуси; *Л. Ф. Кабашикова*, кандидат биологических наук, зав. лабораторией фотосинтетического аппарата ИФБ НАН Беларуси; *Л. Н. Калитуха*, кандидат биологических наук

Мазец Ж. Э., Спиридович Е. В., Гончарова Л. В.

М135 Электрокинетические явления в курсе биофизики: Учеб.-метод. пособие. — Мн.: БГПУ им. М. Танка, 2000. — 41 с.

ISBN 985-435-276-5

В издании освещаются вопросы, связанные с изучением электрокинетических явлений в рамках курса биофизики. Систематизируются теоретические и прикладные сведения по электрофарезу как одному из основных видов электрокинетических явлений.

Адресуется студентам-биологам, а также аспирантам, занимающимся изучением клеточных и субклеточных структур.

ББК 22.33я73

ISBN 985-435-276-5

© Ж. Э. Мазец, Е. В. Спиридович,
Л. В. Гончарова. 2000

ПРЕДИСЛОВИЕ

Биофизика – это интегральная наука, находящаяся на стыке многих дисциплин: физической и коллоидной химии, биохимии, физиологии, цитологии, эмбриологии, гистологии, генетики и др. Биофизика по набору исследуемых явлений и используемых методов тяготеет к физике, а по изучаемым объектам и целям исследования – к биологии. Использование физических подходов играет важную роль в понимании механизмов химических и биологических процессов. Поэтому одной из основных задач биофизики является разработка новых методов исследования в биологии. Многие из этих методов универсальны и используются во многих отраслях естественнонаучных знаний.

К таким методам можно отнести электрокинетические. Они применяются в биохимии, физиологии растений и животных, генетике и цитологии, фармакологии, криминалистике и в других. Это связано с тем, что клетки и ткани биологических объектов представляют собой сложные гетерогенные коллоидные системы. Изучение электрокинетических явлений, протекающих в этих системах, представляет большой интерес при физико-химических исследованиях структур биосубстратов и клеточных и субклеточных мембран. В связи с этим студентам естественнонаучных факультетов необходимо понимать природу и физический смысл данных явлений.

І. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ

Сущность электрокинетических явлений заключается в движении одной фазы относительно другой под действием электрического поля, или в возникновении разности потенциалов в направлении относительного движения фаз при действии механических сил. Впервые эти явления обнаружил профессор Московского университета Ф. Рейс в 1807 г. Он разделил их на два вида: *электрофорез* и *электроосмос*.

Электрофорез – это движение частиц дисперсной фазы в постоянном электрическом поле по направлению к противоположно заряженному электроду.

Электроосмос – движение дисперсной среды в постоянном электрическом поле по направлению к электроду, заряженному одновременно с частицами дисперсной фазы.

Позднее было обнаружено, что в коллоидных растворах при наличии разности гидростатического давления или градиента силы тяжести между дисперсной фазой и дисперсионной средой может возникать разность потенциалов.

Возникновение потенциала на границе двух фаз всегда связано с наличием на поверхности раздела электрического заряда. Электрический заряд на поверхности клеток и биосубстратов возникает в результате адсорбции ионов на поверхности частиц, а также за счет ионизации диссоциирующих групп дисперсной фазы.

Возникновение зарядов на неионогенных поверхностях (масла, целлюлоза, холестерин и др.) принципиально возможно за счет адсорбции как катионов, так и анионов, но преимущественно адсорбируются последние. Это происходит потому, что анионы менее гидратированы, чем катионы, поэтому для удаления анионов из раствора и их последующей адсорбции на поверхности раздела требуется меньшая затрата энергии. Возникновение поверхностного заряда может происходить в белках, нуклеиновых кислотах, полисахаридах и других органических электролитах, содержащих карбоксильные, гидроксильные, аминные и другие полярные группы, способных к электролитической диссоциации.

Таким образом, наличие заряда на поверхности разделов двух фаз обусловлено асимметричным распределением ионов. Ионы одного знака прочно связаны поверхностью частиц, а ионы противоположного знака находятся в дисперсионной среде. Эта система ионов в целом электронейтральна и называется *двойным электрическим слоем*.

Структура двойного электрического слоя не зависит от механизма возникновения заряда на поверхности частицы, а определяется плотностью расположения зарядов на ее поверхности. При редком расположении зарядов на поверхности частицы вокруг каждого заряда в растворах возникает ионная атмосфера. Истинно двойной слой возникает в случае плотного расположения зарядов и обобществления ионных атмосфер.

Любые факторы, влияющие на величину двойного электрического слоя, изменяют величину электрокинетического потенциала (дзета – потенциал ζ). Электрокинетический потенциал образуется в очень тонком слое жидкости, непосредственно прилегающем к дисперсной фазе, и действует в направлении, перпендикулярном к направлению движения фазы (или среды). В связи с этим ζ -потенциал нельзя зарегистрировать непосредственно с помощью электродов. Величину ζ -потенциала можно рассчитать только косвенно, измеряя скорость движения фазы в электрическом поле по следующей формуле (по Смолуховскому):

$$\zeta = \frac{4\eta u}{DE}$$

где ζ - дзета – потенциал (электрокинетический потенциал), η - коэффициент вязкости дисперсионной среды, u – скорость передвижения фазы, D – диэлектрическая проницаемость, E – градиент потенциала внешнего электрического поля.

Экспериментально установлено, что различные объекты биологического и небиологического происхождения, обладая одной и той же величиной потенциала, движутся в электрическом поле одной и той же напряженности с одинаковой скоростью. Однако направление и скорость движения объектов находится в зависимости от знака и величины заряда. Для белковых молекул и небольших по размерам частиц, радиус которых

соизмерим с толщиной двойного электрического слоя, электрофоретическая подвижность зависит также и от формы, и размеров частиц.

Различия в подвижности частиц служат основой для разделения смесей веществ в аналитических и препаративных целях. Определение подвижности используется также для характеристики вещества.

Итак, величина заряда частицы определяется природой самой частицы, а также находящимися в растворе ионами. Ионы дисперсионной среды сильно влияют на величину и знак заряда частиц, главным образом, благодаря способности адсорбироваться на поверхности частицы.

Так, на величину ζ - потенциала значительно влияют водородные и гидроксильные ионы, сложные органические ионы алкалоидов и красителей благодаря большой адсорбционной способности.

На величину электрокинетического потенциала оказывает влияние концентрация добавленных ионов. Добавление в дисперсионную среду ионов противоположно заряженных частиц приводит к тому, что ионная атмосфера, окружающая поверхность частицы, сжимается, становится более плотной, все большее количество противоионов при этом переходит в адсорбционный слой. В результате этого происходит снижение величины ζ - потенциала поверхности частицы. По мере добавления электролитов можно добиться значительного снижения толщины диффузного слоя, а также можно изменить знак заряда частицы на противоположный за счет добавления большой концентрации многовалентных ионов.

Измерить электрокинетический потенциал коллоидов и клеточных поверхностей можно при помощи различных методов, применяемых для измерения потенциала любых дисперсных систем. Но среди этих методов наиболее широкое применение получил метод электрофореза. Как правило, используют два основных метода – макро- и микроскопический электрофорез.

Макрометод в большинстве случаев применяют для разделения веществ, находящихся в смеси, и препаративного их выделения.

Микрометод используют для изучения подвижности клеток и частиц в электрическом поле, величины электрокинетического потенциала, а также электрохимических свойств поверхности исследуемых объектов.

2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

В рамках естественнонаучных исследований наиболее часто используют электрофорез. Электрофорез занимает центральное место среди методов биофизических и биохимических исследований белков и нуклеиновых кислот и служит для оценки функционального и патологического состояния клеток или одноклеточных организмов.

Использование такого метода позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры или молекулярная масса, пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд. Причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности.

С точки зрения физики этот метод можно представить следующим образом. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависит от pH среды. Если этот раствор заключить в канал из изолирующего материала, а затем пропустить через него ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т.е. сформируется электрическое поле. Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода. Ограничивающим фактором при этом движении является трение макромолекул об окружающую среду. Отсюда вытекает и сущность этого метода: различные скорости миграции макромолекул в зависимости от величины заряда и размеров молекулы.

Одна из разновидностей электрофореза – диск-электрофорез. Диск-электрофорез (от англ. “discontinuous” – прерывистый) представляет собой метод разделения, в котором используется неоднородная (“прерывистая”) разделяющая система с полиакриламидным гелем (ПААГ) в качестве носителя. При диск-электрофорезе используют пары буферов разного состава и с разными значениями pH, а носитель состоит из отдельных слоев геля, отличающихся друг от друга по размерам пор. Благодаря этому разделяемые вещества концентрируются сначала в очень узкой стартовой зоне, что имеет решающее значение для четкого разделения смеси.

Высокая разрешающая способность диск-электрофореза позволяет не только разделять смеси, содержащие большое число разных видов макромолекул, но и характеризовать их по заряду, молекулярной массе и

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
I. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	4
1. Электрокинетические явления	4
2. Электрофорез	7
2.1. Способы приготовления гелей и аппаратура	8
2.2. Технические приемы организации электрофореза	11
2.3. Основные принципы препаративного электрофореза . Источники ошибок.	14
2.4. Электрофорез белков	16
2.5. Двумерный электрофорез	20
2.6. Электрофорез нуклеиновых кислот	22
2.7. Расчет молекулярного веса исследуемых молекул	22
3. Изоэлектрофокусирование	25
3.1. Аналитические варианты ИЭФ в горизонтальных пластинах ПААГ	28
3.2. Технические приемы организации ИЭФ	29
3.3. Расчет изоэлектрических точек исследуемых молекул	30
3.4. Техника безопасности	31
II. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	31
Работа №1. Электрофоретическое разделение белков плазмы крови	31
Работа №2. Электрофоретическое разделение легко- растворимых белков листьев растений	36
Работа №3. Изучение гетерогенности амилолитиче- ских ферментов в прорастающих семенах злаковых	37
Литература	39
Список использованных сокращений	41

Учебное издание

**Мазец Жанна Эмануиловна,
Спиридович Елена Владимировна,
Гончарова Людмила Владимировна**

ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ В КУРСЕ БИОФИЗИКИ

Учебно-методическое пособие

Редактор **А.В.Сидоренко**

Подписано в печать 27.09.2000. Бумага писчая. Формат 60×84¹/₁₆.

Офсетная печать. Усл. печ. л. 2,6 . Уч.-изд. л. 2,3

Тираж 100 экз. Заказ 855 . Цена 242 р.

Белорусский государственный педагогический университет
имени Максима Танка

Лицензия ЛІВ № 196 от 04.02.98 г.

Ротапринт БГПУ им. М.Танка. 220050, Минск, ул. Советская, 18