

УДК 535.36+535-7+577.29

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ В РЕЖИМЕ ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ

*Е.А. Савченко, Е.Н. Величко, Е.Т. Аксенов*

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
г. Санкт-Петербург, 195251, Россия*

### Аннотация

С появлением лазера и благодаря достижениям в электронике оптические методы такие, как электронная сканирующая микроскопия, нефелометрия, метод статического и динамического рассеяния света, оказались универсальными, информативными и точными при определении параметров наноразмерных объектов. Наиболее эффективным является метод электрофоретического светорассеяния, имеющий существенный потенциал в изучении биологических макромолекул и их свойств. В настоящей работе исследование биологических макромолекул методом электрофоретического светорассеяния проводилось в режиме полного внутреннего отражения. В качестве объекта исследования был выбран раствор альбумина. Для расчета параметров исследуемого объекта были построены автокорреляционные функции интенсивности обратно рассеянного раствором светового поля в режиме броуновского движения и под действием внешнего электрического поля. Основным результатом работы является выявленная зависимость автокорреляционной функции от величины напряжения приложенного электрического поля и вычисленные значения электрофоретической подвижности. При значениях напряжения, больших чем 10 В, увеличивается влияние тепловых колебаний. Полученные результаты свидетельствуют о применимости данного метода при анализе биологических макромолекул.

**Ключевые слова:** альбумин, электрофоретическое светорассеяние, полное внутреннее отражение, оптические методы, электрофоретическая подвижность, биологические макромолекулы

### Введение

Биологические макромолекулы – белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды – находятся в водном растворе в виде частиц, которые по своим размерам соответствуют коллоидным частицам, несущим определённый электрический заряд благодаря электрической диссоциации. Например, в каждой белковой молекуле содержится множество групп, способных отдавать или принимать протоны, что приводит к образованию отрицательно и положительно заряженных групп. Преобладание одного из этих процессов зависит от состава данного белка, от окружения и от pH среды. Водные растворы биологических макромолекул по оптическим свойствам являются неоднородными поглощающими средами со средним показателем преломления, большим, чем у воздуха, поэтому на границе раздела молекула – воздух часть излучения отражается, а остальная часть проникает в раствор. При распространении излучения в среду с биологическими макромолекулами существенную роль играют процессы светорассеяния [1]. Рассеянное излучение несет

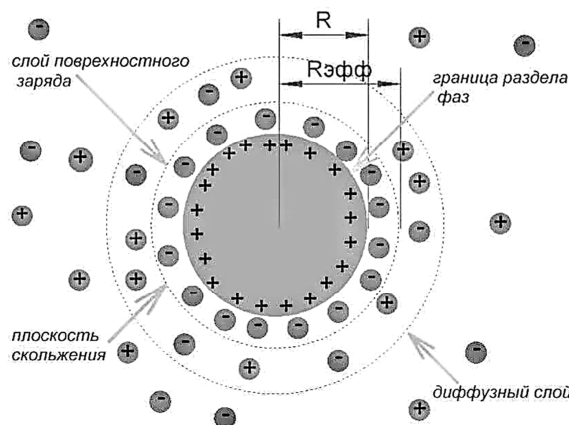


Рис. 1. Равномерно заряженная коллоидная частица в растворе электролита

информацию о формирующих биологические макромолекулы факторах, таких как размеры и форма структурных элементов, их ориентация, оптические постоянные и др. Для того чтобы иметь возможность извлечь эту информацию и интерпретировать результаты экспериментов по светорассеиванию, необходимо построить адекватную оптическую модель соответствующей молекулы и на ее основе решить задачу распространения излучения в данной среде [2]. Как известно, электрофорез стал одним из наиболее универсальных методов разделения белков в клинических исследованиях. Преимущества электрофореза привели к созданию новых вариантов его реализации, позволяющих измерить одновременно несколько физических параметров. Одной из таких реализаций, сочетающей методы светорассеяния и электрофореза, является электрофоретическое светорассеяние, основанное на анализе параметров обратно рассеянного светового поля корреляционными способами. По найденным зависимостям интенсивности рассеянного излучения от времени можно получить такие параметры, как радиус, коэффициент диффузии, электрофоретическая подвижность, дзета-потенциал.

### 1. Электрофоретическое рассеяние света

Понятие электрофореза тесно связано с понятием двойного электрического слоя. Механизм образования двойного электрического слоя представлен на рис. 1.

Частицы в коллоидной системе находятся в броуновском движении, а воздействие электрического поля вызывает их направленный дрейф. На поверхности частиц (на границе раздела частица–жидкость) возникает двойной электрический слой [3]. На поверхности частицы закрепляется прежде всего слой ионов определенного знака, равномерно распределенных по поверхности. Этот слой создает на ней поверхностный заряд (потенциалопределяющие ионы). К этому слою из жидкой среды притягиваются ионы противоположного знака (противоионы). При движении частицы двойной электрический слой разрывается. Место разрыва называется плоскостью скольжения. Плоскость скольжения лежит на границе между диффузными и адсорбционными слоями либо в диффузном слое вблизи этой границы. Потенциал на плоскости скольжения называют электрокинетическим, или дзета-потенциалом ( $\zeta$ -потенциал) [3]. Другими словами,  $\zeta$ -потенциал – это разность потенциалов дисперсионной среды и неподвижного слоя жидкости, окружающей частицу.

Для молекул и частиц, которые достаточно малы, высокий  $\zeta$ -потенциал будет означать стабильность, то есть раствор или дисперсия будут устойчивы по отношению к агрегации. Когда  $\zeta$ -потенциал низкий, притяжение превышает отталкивание, и устойчивость дисперсии будет нарушаться. Так, коллоиды с высоким  $\zeta$ -потенциалом являются электрически стабилизированными, в то время как коллоиды с низким  $\zeta$ -потенциалом склонны коагулировать. Для измерения  $\zeta$ -потенциал и других параметров исследуемого раствора используют метод электрофоретического рассеяния света. Как и в методе динамического рассеяния света, интенсивность рассеянного светового поля детектируется с помощью оптической системы, содержащей фотодетектор и систему обработки сигналов, которая позволяет проводить спектральный или корреляционный анализ частиц [4]. В силу того, что спектр рассеянного света описывается лоренцевой кривой, автокорреляционная функция интенсивности описывается убывающей экспонентой [2]

$$|G^1(\tau)| = a \exp(-(\Gamma)\tau) + b, \quad (1)$$

где  $a$  и  $b$  – константы,  $\Gamma$  – диффузное уширение спектра. Таким образом, становится возможным использование аппроксимации вида

$$|G^1(\tau)| = \int_0^{\infty} F(\Gamma) e^{-\Gamma\tau} d\Gamma, \quad (2)$$

где  $F(\Gamma)$  – вклад в суммарную интенсивность компоненты излучения, рассеянного на частицах одного размера. При этом диффузное уширение связано с коэффициентом диффузии  $D$  соотношением [2]

$$\Gamma = 1/(t_c) = Dq^2, \quad (3)$$

где  $t_c$  – время спада (корреляционная функция быстрее спадает для мелких частиц),  $q$  – волновой вектор рассеяния

$$q = (4\pi n/\lambda)(\sin \theta/2). \quad (4)$$

Здесь  $n$  – коэффициент преломления среды,  $\lambda$  – длина волны,  $\theta$  – угол регистрации рассеяния.

Воспользовавшись формулой Стокса–Эйнштейна

$$D = k_b T / 6R\eta\pi, \quad (5)$$

где  $\eta$  – вязкость среды,  $k_b$  – постоянная Больцмана,  $T$  – температура,  $R$  – радиус, можно вычислить гидродинамический радиус исследуемых частиц [2]. При воздействии поля частицы начинают двигаться с некоторой скоростью к противоположно заряженному электроду. Влияние электрического поля учитывается в автокорреляционной функции при допущении, что переориентация частиц и химические реакции отсутствуют [5]

$$|G^1(\tau)| = \int_0^{\infty} F(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau e^{iq\mu E \cos(\theta/2)}) d\Gamma, \quad (6)$$

где  $E$  – значение приложенного поля,  $\mu$  – электрофоретическая подвижность.

В электрическом поле корреляционная функция будет промодулирована косинусоидальной функцией, частота которой определяется электрофоретической подвижностью, а скорость затухания – коэффициентом диффузии, следовательно,

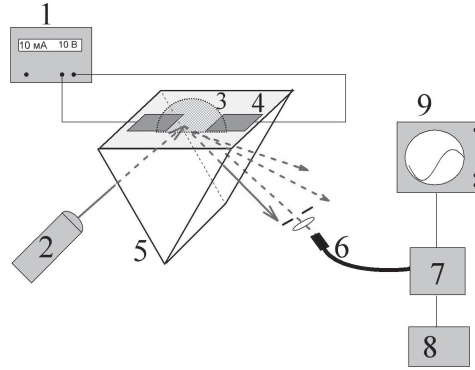


Рис. 2. Схема экспериментальной установки: 1 – источник напряжения, 2 – лазерный модуль, 3 – образец, 4 – электроды (для реализации свободного электрофореза), 5 – призма полного внутреннего отражения, 6 – оптоволокно, 7 – фотоприемник, 8 – источник питания фотоприемника, 9 – осциллограф

радиусом рассеивателей. Зная электрофоретическую подвижность частиц, можно вычислить скорость рассеивателей [6]

$$v_{eff} = \mu/E, \tag{7}$$

Электрофоретическая подвижность частиц также пересчитывается в  $\zeta$ -потенциал на основе теории Смолуховского с введением поправок на толщину двойного электрического слоя [5]

$$\zeta = (3E\mu\eta)/2\varepsilon. \tag{8}$$

Здесь  $\zeta$  –  $\zeta$ -потенциал,  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость.

## 2. Экспериментальная установка

Структурная схема экспериментальной установки изображена на рис. 2. Сфокусированный световой пучок от полупроводникового лазера с длиной волны  $\lambda = 655$  нм падает на боковую грань призмы полного внутреннего отражения под углом большим, чем критический угол для достижения требуемого эффекта. Значение величины критического угла определяется по формуле [7]:

$$\theta_c = \cos^{-1}(n_2/n_1), \tag{9}$$

где  $n_1, n_2$  – показатели преломления граничащих сред. В данном случае величина критического угла составила  $\theta_c = 28.2^\circ$ .

Поток излучения, падающий при углах больше критического угла, испытывает полное отражение от границ раздела, возвращается в среду с показателем преломления  $n_1$ . В оптически менее плотной среде с показателем преломления  $n_2$  в области вблизи границы существует конечное значение электромагнитного поля, однако поток энергии через границу отсутствует. Глубина проникновения излучения в среду с показателем преломления  $n_2$  определяется как расстояние, на котором амплитуда электромагнитного поля в оптически менее плотной среде убывает в  $e$  раз и зависит угла падения и длины волны падающего света.

Проникающее в образец световое поле рассеивается и тем самым формируется спекл-поле, интенсивность которого детектируется с помощью рпн-фотодиода, расположенного под углом  $15^\circ$  относительно максимума отраженного светового поля.

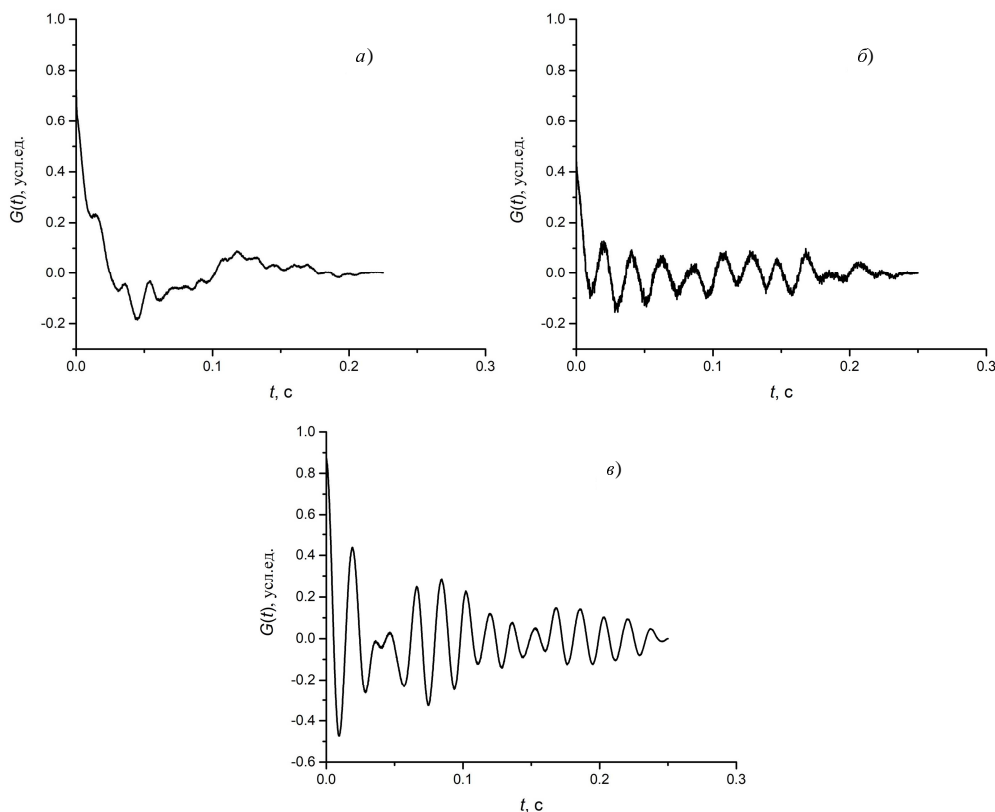


Рис. 3. Автокорреляционные функции для раствора альбумина в зависимости от напряжения приложенного электрического поля: 10 В (а), 20 В (б), 30 В (в)

Далее сигнал поступает на цифровой осциллограф с последующей записью данных на электронный носитель для дальнейшей обработки результатов. В рамках настоящей работы режим электрофоретического светорассеяния реализовывался в режиме свободного электрофореза, без геля и капилляра. На верхнюю грань призмы были нанесены два прямоугольных электрода размером  $2 \times 4$  мм с зазором 1 мм.

### 3. Результаты

В качестве объекта исследования был выбран 4%-ный раствор альбумина. Образец в виде капли объемом 10 мкл помещался на зазор между электродами. Протекание тока в жидкостях сопровождается выделением теплоты. В наших экспериментах при напряжении 30 В капля достаточно быстро высыхала. Для увеличения электропроводности раствора и учета тепловых эффектов в него был добавлен раствор  $\text{KNO}_3$ .

В ходе работы были вычислены автокорреляционные функции для раствора альбумина при наложении электрического поля напряжением 10, 20, 30 В. Вид рассчитанных автокорреляционных функций представлен на рис. 3.

Электрофоретическая подвижность в случае монодисперсного раствора может быть вычислена по формуле

$$\Delta t = \frac{2\pi}{\mu E q \cos(\theta/2)}. \quad (10)$$

где  $\Delta t$  – период колебания автокорреляционной функции, значение которого можно найти из полученных экспериментальных зависимостей. В нашей работе величины электрофоретической подвижности при наложении электрического поля напряжением 10, 20, 30 В равнялись 55.3, 143.4, 202.7 мм<sup>2</sup>/с<sup>2</sup>В соответственно. При увеличении напряжении электрофоретическая подвижность частиц в растворе растет, что совпадает с теоретическими данными [5].

### Заключение

Результаты экспериментальных исследований позволяют сделать ряд выводов. Во-первых, предложенная методика реализации электрофоретического светорассеяния в режиме полного внутреннего отражения позволяет выявить динамические характеристики биологических макромолекул в растворе. Во-вторых, полученный вид автокорреляционных функций соответствует расчетным и позволяет охарактеризовать динамику светорассеивателей и вычислить электрофоретическую подвижность. Существенным преимуществом предложенной методики электрофоретического светорассеяния в режиме полного внутреннего отражения являются быстроедействие, малое количество образца и малые управляющие напряжения, что при проведении экспериментов с биологическими макромолекулами является существенным ограничением. Таким образом, методика электрофоретического светорассеяния в режиме полного внутреннего отражения является перспективной для решения широкого круга научных и практических задач.

### Список литературы

1. *Тучин В.В.* Оптическая биомедицинская диагностика // Изв. Сарат. ун-та. Новая серия. Серия Физика. – 2005. – Т. 5, № 1. – С. 39–53.
2. *Непотнышчайя Е.К., Savchenko E.A., Velichko E.N., Aksenov E.T.* Investigation of albumin-fullerenol interaction by laser correlation spectroscopy: The algorithm // J. Biomed. Photonics Eng. – 2016. – V. 2, No 4. – Art. 040309, P. 1–6. – doi: 10.18287/JBRE16.02.040309.
3. *Сердюк И., Зажкаи Н., Зажкаи Дж.* Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика: в 2 т. Т. 1. – М.: КДУ, 2009. – 568 с.
4. *Kokufuta E.* Light scattering and electrophoretic light scattering of biopolymers // Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science / Ed. by H. Ohshima. – Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2016. – P. 619–627. – doi: 10.1002/9781119075691.ch51.
5. *Ware B.R., Flygare W.H.* The simultaneous measurement of the electrophoretic mobility and diffusion coefficient in bovine serum albumin solutions by light scattering // Chem. Phys. Lett. – 1971. – V. 12, No 1. – P. 81–85. – doi: 10.1016/0009-2614(71)80621-8.
6. *Фатхуллина Д.Г., Жукова Е.В., Маргарянц Н.Б.* Исследование слоя красителя методом спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения // Науч.-техн. вестн. информ. технологий, механики и оптики. – 2016. – Т. 16, № 3. – С. 416–421.

Поступила в редакцию  
15.11.17

---

**Савченко Екатерина Александровна**, инженер Высшей школы прикладной физики и космических технологий

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого  
ул. Политехническая, д. 29, г. Санкт-Петербург, 195251, Россия  
E-mail: [savchenko-spbstu@mail.ru](mailto:savchenko-spbstu@mail.ru)

**Величко Елена Николаевна**, кандидат технических наук, доцент, директор Высшей школы прикладной физики и космических технологий

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого  
ул. Политехническая, д. 29, г. Санкт-Петербург, 195251, Россия  
E-mail: *velichko-spbstu@yandex.ru*

**Аксенов Евгений Тимофеевич**, доктор физико-математических наук, профессор Высшей школы прикладной физики и космических технологий

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого  
ул. Политехническая, д. 29, г. Санкт-Петербург, 195251, Россия  
E-mail: *et.aksenov@gmail.com*

---

---

ISSN 2541-7746 (Print)

ISSN 2500-2198 (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA.  
SERIYA FIZIKO-MATEMATICHESKIE NAUKI  
(Proceedings of Kazan University. Physics and Mathematics Series)

2018, vol. 160, no. 1, pp. 108–115

---

---

**Determination of the Parameters of Biological Macromolecules  
by the Electrophoretic Light Scattering Method  
in the Total Internal Reflection Regime**

*E.A. Savchenko\**, *E.N. Velichko\*\**, *E.T. Aksenov\*\*\**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia*

E-mail: *\*savchenko-spbstu@mail.ru*, *\*\*velichko-spbstu@yandex.ru*, *\*\*\*et.aksenov@gmail.com*

Received November 15, 2017

**Abstract**

Electrophoretic light scattering application for the analysis of biological macromolecules has been discussed in the paper. The relevance of the study is due to the research of biological macromolecules using optical methods that are more sensitive, less expensive, and have a high speed as compared to the traditional methods of biochemical analysis. The purpose of the study is to develop a method for analyzing biological macromolecules in the regime of total internal reflection based on electrophoretic light scattering. The following tasks have been set for fulfilling the purpose of the work: firstly, to develop of an experimental setup for the regime of total internal reflection on a prism; secondly, to calculate the parameters of the light field for implementation of the regime of total internal reflection; thirdly, to develop a method for calculating the parameters of the scattered light field. Albumin solution 4% has been chosen as a sample of the study. The preliminary experimental data on the electrophoretic properties of albumin have been obtained. The regime of total internal reflection has been used to analyze the samples to increase its sensitivity and reduce the sample volume. The characteristic changes of electrophoretic mobility have been recorded while applying the electric field. The obtained results demonstrate the applicability of studying of biological macromolecules using electrophoretic light scattering and can be important in medical practice. The measured parameters of biological macromolecules are indicative of their structural changes, which are most often caused by various diseases.

**Keywords:** albumin, electrophoretic light scattering, total internal reflection, optical methods, electrophoretic mobility, biological macromolecules

### Figure Captions

Fig. 1. The uniformly charged colloid particle in electrolyte solution.

Fig. 2. Experimental setup scheme: 1 – voltage source, 2 – laser module, 3 – sample, 4 – electrodes (to allow free electrophoresis), 5 – total internal reflection prism, 6 – optical fiber, 7 – photoelectric detector, 8 – photoelectric detector power supply, 9 – oscillograph.

Fig. 3. Autocorrelation functions for the albumin solution depending on the voltage of the applied electric field: 10 V (a), 20 V (b), 30 V (c).

### References

1. Tuchin V.V. Optical biomedical diagnostics. *Izv. Sarat. Univ. Nov. Ser. Ser. Fiz.*, 2005, vol. 5, no. 1, pp. 39–53. (In Russian)
2. Nepomnyashchaya E.K., Savchenko E.A., Velichko E.N., Aksenov E.T. Investigation of albumin-fullerenol interaction by laser correlation spectroscopy: The algorithm. *J. Biomed. Photonics Eng.*, 2016, vol. 2, no. 4, art. 040309, pp. 1–6. doi: 10.18287/JBPE16.02.040309.
3. Serdyuk I., Zaccai N., Zaccai J. *Metody v molekulyarnoi biofizike: struktura, funktsiya, dinamika* [Methods in Molecular Biophysics: Structure, Function, Dynamics]. Vol. 1. Moscow, KDU, 2009. 568 p. (In Russian)
4. Kokufuta E. Light scattering and electrophoretic light scattering of biopolymers. In: Ohshima H. (Ed.) *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science*. Hoboken, N. J., John Wiley & Sons Inc., 2016, pp. 619–627. doi: 10.1002/9781119075691.ch51.
5. Ware B.R., Flygare W.H. The simultaneous measurement of the electrophoretic mobility and diffusion coefficient in bovine serum albumin solutions by light scattering. *Chem. Phys. Lett.*, 1971, vol. 12, no. 1, pp. 81–85. doi: 10.1016/0009-2614(71)80621-8.
6. Fatkhullina D.G., Zhukova E.V., Margaryants N.B. The study of ink layer by the method of attenuated total reflectance spectroscopy. *Nauchno-Tekh. Vestn. Inf. Tekhnol., Mekh. Opt.*, 2016, vol. 16, no. 3, pp. 416–421. (In Russian)

---

**Для цитирования:** Савченко Е.А., Величко Е.Н., Аксенов Е.Т. Определение параметров биологических макромолекул методом электрофоретического светорассеяния в режиме полного внутреннего отражения // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Физ.-матем. науки. – 2018. – Т. 160, кн. 1. – С. 108–115.

**For citation:** Savchenko E.A., Velichko E.N., Aksenov E.T. Determination of the parameters of biological macromolecules by the electrophoretic light scattering method in the total internal reflection regime. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Fiziko-Matematicheskie Nauki*, 2018, vol. 160, no. 1, pp. 108–115. (In Russian)