2.1.2.38. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ

Общая фармакопейная статья соответствует аналогичному тексту, гармонизированному в рамках Фармакопейной дискуссионной группы (PDG). Негармонизированный текст обозначен символами «♦ ♦».

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) – это один из видов электрофореза, в котором разделение белков происходит в соответствии с их изоэлектрической точкой. Разделение проводится в пластине из полиакриламидного или агарозного геля, содержащего смесь амфотерных электролитов (амфолитов). Под действием электрического поля амфолиты мигрируют в геле, создавая градиент pH. В некоторых случаях используют гели с иммобилизированным (фиксированным) градиентом pH, полученные путем включения слабых кислот и оснований в определенные участки геля во время его приготовления. Когда нанесенные белки достигают участки геля, который имеет значение pH, совпадающее с их изоэлектрической точкой (pI), заряд данных белков нейтрализуется, и миграция прекращается. Градиенты pH могут быть в различных диапазонах в зависимости от выбранной смеси амфолитов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Белок, находящийся в положении своей изоэлектрической точки, не имеет заряда и не может мигрировать в матрице геля под действием электрического поля, однако его миграция может происходить в результате диффузии. Градиент pH вынуждает белок оставаться в положении изоэлектрической точки, тем самым концентрируя его. Такое концентрирование называется «фокусированием». Увеличение приложенного напряжения или уменьшение количества нанесенного образца улучшает разделение зон. Величина приложенного напряжения ограничена выделяющейся теплотой, которую необходимо отводить. Использование тонких слоев геля, а также подложек с эффективным охлаждением, контролируемым циркуляционным термостатом, предотвращает перегревание геля и в тоже время способствует четкому фокусированию. Разделение оценивают по минимальной разности pI (ΔpI), которая необходима для разделения двух соседних полос:

$$\Delta\mathrm{pI} = 3 \times \sqrt{\frac{D(\mathrm{dpH}/\mathrm{d}x)}{E(-\mathrm{d}\mu/\mathrm{dpH})}}$$

где:
- D – коэффициент диффузии белка;
- $\frac{\mathrm{dpH}}{\mathrm{d}x}$ – градиент pH;
- E – напряженность электрического поля, в вольтах на сантиметр;
- $-\frac{\mathrm{d}\mu}{\mathrm{dpH}}$ – изменение подвижности растворенного вещества при изменении pH в области, близкой к pI.

Поскольку D и $-\frac{\mathrm{d}\mu}{\mathrm{dpH}}$ для конкретного белка не могут быть изменены, улучшить разделение можно при использовании более узкого диапазона pH и при увеличении напряженности электрического поля.

Разрешение между зонами белков в случае использования ИЭФ-геля, содержащего амфолиты-носители, может быть достаточно хорошим. Улучшить разрешение можно при

использовании иммобилизированных градиентов pH, для получения которых применяются различные компоненты буферных систем, аналогичные амфолитам-носителям, сополимеризованные с матрицей геля. При использовании геля, содержащего амфолиты-носители, могут быть разделены белки, значения pI которых отличаются на 0,02 единицы pH, в то время как иммобилизированные градиенты pH позволяют разделить белки, значения pI которых различаются приблизительно на 0,001 единицы pH.

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Особое внимание уделяют характеристикам образца и (или) его подготовке. Наличие солей в образце может вызвать ряд проблем, поэтому при его приготовлении следует использовать деионизированную воду или 2 % раствор амфолитов, используя при необходимости диализ или гель-фильтрацию.

Время, необходимое для завершения фокусирования в тонком слое полиакриламидных гелей, определяют путем нанесения окрашенного белка (например, гемоглобина) в различные области поверхности геля и приложения электрического поля: стабильное состояние достигается тогда, когда все нанесения дают идентичный профиль (паттерн) полос. В некоторых процедурах завершение фокусирования определяется временем, прошедшим после нанесения образца.

ИЭФ может использоваться в качестве испытания на подлинность, когда профиль (паттерн) миграции на геле сравнивается с профилем (паттерном) подходящего препарата сравнения (такого как стандартный образец) и с калибровочными белками для ИЭФ. ИЭФ может быть использовано в качестве испытания на предельное содержание, при этом интенсивность полосы на ИЭФ-геле субъективно сравнивается с интенсивностью полос препарата сравнения, или для испытаний на количественное содержание, когда интенсивность измеряется с использованием денситометра или подобных приборов для определения относительной концентрации белка в полосах, что подлежит валидации.

ОБОРУДОВАНИЕ

Оборудование для ИЭФ состоит из:

– управляемого генератора для создания постоянного напряжения, тока и мощности; используется напряжение величиной 2500 В: оно считается оптимальным для используемых условий работы; рекомендуется источник тока, имеющий постоянную мощность до 30 Вт;

– жесткой полимерной ИЭФ камеры, в которой находится охлаждаемая подложка из подходящего материала, служащая основой для нанесения геля;

– полимерной крышки с платиновыми электродами, которые соединены с гелем с помощью бумажных фитилей подходящей ширины, длины и толщины, пропитанных растворами анодных и катодных электролитов.

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЯХ: ПОДРОБНАЯ МЕТОДИКА

Следующая методика представляет собой подробное описание процедуры ИЭФ в толстых пластинах полиакриламидного геля, используемой при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГЕЛЕЙ

Форма для приготовления гелей. Форма (см. рисунок 2.1.2.38.-1) состоит из стеклянной пластинки (A), на которую для облегчения работы с гелем помещена полиэфирная пленка (B), одной или нескольких прокладок (спейсеров) (C), второй стеклянной пластинки (D) и зажимов, скрепляющих всю конструкцию.

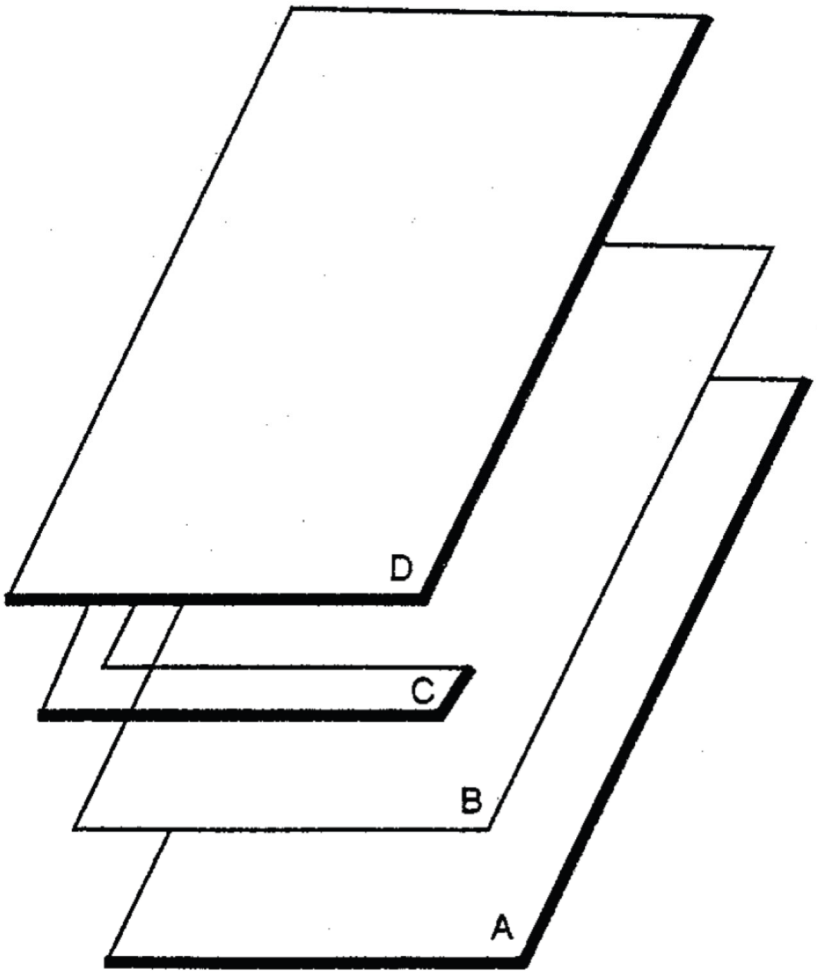

Рисунок 2.1.2.38.-1. *Форма для приготовления гелей*

Раствор для получения 7,5 % полиакриламидного геля. 29,1 г *акриламида Р* и 0,9 г *метиленбисакриламида Р* растворяют в 100 мл *воды Р*. К 2,5 объемам полученного раствора прибавляют смесь амфолитов, указанных в частной фармакопейной статье, и доводят *водой Р* до 10 объемов. Раствор тщательно перемешивают и дегазируют.

Приготовление формы. Полиэфирную пленку помещают на нижнюю стеклянную пластинку, вставляют прокладку, помещают вторую стеклянную пластинку и скрепляют конструкцию зажимами. Перед использованием раствор помещают на магнитную мешалку и прибавляют 0,25 объема 100 г/л раствора *аммония персульфата Р* и 0,25 объема *тетраметилэтилендиамина Р*. Немедленно заполняют раствором пространство между стеклянными пластинками формы.

МЕТОДИКА

Форму разбирают на составные части и, используя полиэфирную пленку, переносят гель на охлажденную подложку, увлажненную несколькими миллилитрами подходящей жидкости, избегая образования воздушных пузырьков. Готовят испытуемые растворы и растворы сравнения в соответствии с указаниями в частной фармакопейной статье. Помещают полоски бумаги размером приблизительно 10 мм × 5 мм на поверхность геля и пропитывают каждую указанным количеством испытуемого раствора и раствора сравнения. Также наносят указанное количество раствора белков с известными значениями изоэлектрических точек, служащих в качестве маркеров pH для калибровки геля. В некоторых процедурах вместо пропитанных бумажных полосок используют гель, который имеет лунки, предназначенные для помещения раствора образца. Вырезают две полоски

бумаги по длине геля, и пропитывают их растворами электролитов: кислотным для анода и щелочным для катода (составы анодного и катодного растворов приводятся в частной фармакопейной статье). Эти бумажные фитили помещают на каждую сторону геля на расстоянии нескольких миллиметров от края. Устанавливают крышку так, чтобы электроды контактировали с фитилями (соответственно, анодным и катодным полюсами). Выполняют изоэлектрическое фокусирование, используя параметры электрического поля, указанные в частной фармакопейной статье. Когда миграция смеси стандартных белков стабилизируется, отключают источник питания. С помощью пинцета удаляют полоски, предназначенные для нанесения образца, и 2 электродных фитиля. Погружают гель в *фиксирующий раствор для изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле Р*. Выдерживают, осторожно встряхивая, при комнатной температуре в течение 30 мин. Сливают раствор, прибавляют 200 мл *обесцвечивающего раствора Р*, выдерживают при встряхивании в течение 1 ч. Высушивают гель, прибавляют *Кумасси красящий раствор Р*, выдерживают в течение 30 мин. Обесцвечивают гель путем пассивной диффузии *обесцвечивающего раствора Р* до тех пор, пока на чистом фоне не будут четко видны полосы. Положение и интенсивность полос на электрофореграмме, определяют в соответствии с указаниями в частной фармакопейной статье.

ИЗМЕНЕНИЯ ПОДРОБНОЙ МЕТОДИКИ, ПОДЛЕЖАЩИЕ ВАЛИДАЦИИ

В тех случаях, когда приведена ссылка на общую методику изоэлектрического фокусирования, изменения в методологии или методике изоэлектрического фокусирования могут подлежать валидации. К таким изменениям относятся:

– использование коммерческих гелей и наборов для окрашивания и обесцвечивания;

– использование иммобилизированных градиентов pH;

– использование гелей в колонках;

– использование кассет геля различных размеров, включая ультратонкие (0,2 мм) гели;

– изменения в процедуре нанесения образца, включающие различные объемы образца или использование шаблонов для нанесения или небумажных фитилей;

– использование альтернативных условий электрофокусирования, включающих изменения электрического поля в зависимости от оборудования и размеров геля, а также использование фиксированных времен миграции вместо субъективной интерпретации стабильности полосы;

– включение стадии предварительного фокусирования;

– использование автоматизированного оборудования;

– использование агарозных гелей.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ

При использовании альтернативных методик по отношению к описанной методике, они должны быть валидированы. Для валидации разделения могут быть использованы следующие критерии:

– образование устойчивого градиента pH с необходимыми характеристиками, оцениваемого, например, с помощью окрашенных маркеров pH с известными значениями изоэлектрических точек;

– сравнение электрофореграммы, прилагаемой к стандартному образцу, с электрофореграммой, полученной при испытании;

– любые другие критерии валидации, указанные в частной фармакопейной статье.

ПРЕДУСМОТРЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЩЕЙ МЕТОДИКИ

Изменения общей методики, необходимые при анализе конкретных веществ, могут быть подробно описаны в частных фармакопейных статьях. Эти изменения включают:

– добавление в гель мочевины (обычно 3 М концентрация достаточна для поддерживания белка в растворенном состоянии, также может быть использована концентрация до 8 М): некоторые белки в изоэлектрической точке выпадают в осадок, в данном случае для того, чтобы белок оставался в растворе, в гель вводится мочевина. Следует использовать только свежеприготовленные растворы мочевины, чтобы не допустить карбамоилирования белка;

– использование альтернативных способов окрашивания;

– использование добавок для геля, таких как неионные детергенты (например, октилглюкозид) или цвиттер-ионные детергенты (например, *CHAPS* или *CHAPSO*), и добавление амфолита к образцу для предотвращения процессов агрегации и преципитации белков.

ПОЛОЖЕНИЯ, ТРЕБУЮЩИЕ ВНИМАНИЯ

Образцы могут наноситься на любой участок поверхности геля, но для того, чтобы защитить белки от экстремальных значений pH, образцы не должны наноситься в непосредственной близости от электродов. При разработке методики аналитик может нанести белок на гель в трех местах (посередине и на обоих концах). Получаемые профили (паттерны) для белков, нанесенных на противоположные концы геля, могут быть не идентичными.

При чрезмерно длительном фокусировании в геле может возникнуть процесс, называемый катодным дрейфом, при котором градиент pH с течением времени разрушается. Хотя данное явление недостаточно изучено, факторами, вызывающими катодный дрейф, могут быть электроэндоосмос и поглощение диоксида углерода. Катодный дрейф наблюдается при миграции фокусируемых белков от катодного конца геля. Для решения этой проблемы могут быть использованы иммобилизированные градиенты pH.

Во время проведения фокусирования важно обеспечить эффективное охлаждение (около 4 °C) подложки, на которую помещен гель. Высокая напряженность электрического поля, используемая во время изоэлектрического фокусирования, может приводить к перегреванию и влиять на качество геля для фокусирования.