

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Электрофорез

ОФС.1.2.1.0023.15

в полиакриламидном геле

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод молекулярной биологии и биохимии – электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ), используемый для разделения белков и нуклеиновых кислот, который основан на движении заряженных биологических макромолекул в постоянном электрическом поле. Разделение в полиакриламидном геле происходит за счёт различий заряда разделяемых молекул и отличий молекулярных масс, а также в зависимости от конфигурации молекул. Изменяя концентрацию полимера, можно получать гели с широким диапазоном размеров пор, позволяющих проводить разделение белков и пептидов с молекулярными массами от 2 до 300 тыс. кДа. Можно также изменять электрический заряд макромолекул (путем вариации рН буферного раствора) и их конформацию за счет введения в буферный раствор денатурирующих агентов или детергентов.

Протекание через жидкость электрического тока неизбежно связано с выделением тепла, поэтому следует обеспечивать теплоотвод и стабильность температурного режима с целью исключения изменений вязкости, проводимости и скорости потока и, следовательно, искажения зон анализируемых компонентов.

Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые молекулы, но не взаимодействуют с ними, причем

скорость миграции наиболее подвижных макромолекул пробы должна быть несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда фронт красителя достигает противоположной границы геля, электрофорез прекращают.

Разделившиеся зоны биополимеров во избежание их диффузии немедленно фиксируют. Для этого гель извлекают из стеклянной формы и выдерживают в смеси кислоты со спиртом так, что белки или нуклеиновые кислоты фиксируются в том самом месте, где закончилась их миграция. После фиксации или одновременно с ней проводят окрашивание зон путем выдерживания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с белком или нуклеиновой кислотой. Излишек красителя удаляют.

Вместо окрашивания или наряду с ним могут использоваться радиоактивные метки и приемы регистрации полос на фотопленке посредством автордиографии или флюорографии и различные способы счета радиоактивности в геле с помощью жидкостных сцинтилляционных счетчиков.

Характеристики полиакриламидных гелей

Гель полиакриламида имеет ряд преимуществ, определяющих его широкое использование. Он прозрачен, химически стабилен, инертен, устойчив к изменениям pH и температуры, нерастворим в большинстве растворителей, и, наконец, в нем практически отсутствуют адсорбция и электроосмос.

Разделяющие свойства полиакриламидных гелей (ПААГ) определяются трехмерной сетью волокон и пор, которая сформирована за счет бифункциональных бисакриламидных связей между смежными полиакриламидными цепями. Полимеризация катализируется системой, производящей свободные радикалы, составленной из аммония персульфата и тетраметилэтилендиамина.

С увеличением концентрации акриламида в геле эффективный размер пор уменьшается. Эффективный размер пор геля определяет его разделяющие свойства, то есть сопротивление геля к перемещению

макромолекул. Существуют пределы концентраций акриламида, которые могут использоваться. При высоких концентрациях акриламида гели становятся более ломкими и трудны в обращении. С уменьшением размера пор геля уменьшается скорость перемещения белка через гель. Регулируя размер пор геля путем изменения концентрации акриламида, можно оптимизировать разрешающую способность метода для конкретного анализируемого образца. Таким образом, физическое состояние ПААГ характеризуется по составу акриламида и бисакриламида. Обычно используются гели, в которых общая концентрация мономера и сшивающего агента находится в диапазоне от 3 до 30 %, а количество сшивающего агента обычно составляет от одной десятой до одной двадцатой от количества мономера. При этом содержание сшивающего агента тем меньше, чем выше общая концентрация геля.

Электрофорез белков в полиакриламидных гелях с натрия додецилсульфатом

Электрофорез в полиакриламидных гелях с использованием натрия додецилсульфата (SDS) – наиболее распространенный способ электрофореза, используемый для оценки подлинности и чистоты белковых продуктов. Денатурированные под воздействием высокой температуры полипептиды, связываясь с анионным детергентом SDS, становятся отрицательно заряженными и приобретают конформацию, при которой радиус Стокса является функцией молекулярной массы независимо от типа белка. Поскольку количество связанного SDS почти всегда пропорционально молекулярной массе полипептида и не зависит от последовательности аминокислот в полипептиде, SDS-полипептидные комплексы мигрируют через полиакриламидные гели с подвижностью, прямо пропорциональной молекулярной массе полипептида.

Молекулярная масса белка может быть оценена по его относительной подвижности на прокалиброванном геле, и обнаружение отдельной полосы в таком геле является критерием чистоты.

Однако, наличие у полипептида радикалов типа N- или O-связанных гликозидов оказывает существенное влияние на оценку молекулярной массы белка, поскольку SDS не связывается с углеводной частью молекулы так же, как с полипептидной. Таким образом, пропорциональность отношения «заряд к массе» не выдерживается и электрофоретическая подвижность белков, подвергшихся посттрансляционным модификациям, не является истинным отражением молекулярной массы полипептидной цепи.

Восстанавливающие условия

Трехмерная структура белков часто поддерживается за счет дисульфидных связей. Цель анализа SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях состоит в том, чтобы разрушить эту структуру путем расщепления дисульфидных связей. Денатурация и дезагрегация белков заключается в обработке их 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитолом (DTT), в результате которой происходит разрыв S-S связей, разворачивание полипептидной цепи и последующее связывание с SDS. В этих условиях молекулярная масса полипептидных субъединиц может быть рассчитана методом линейной регрессии при использовании подходящих стандартов молекулярных масс.

Невосстанавливающие условия

Без обработки восстанавливающими агентами типа 2-меркаптоэтанола или DTT дисульфидные ковалентные связи остаются неповрежденными и деления на полипептидные субъединицы не происходит. Невосстановленные белки не могут полностью насыщаться SDS и, следовательно, не могут связывать детергент в постоянном массовом отношении. Это делает определение молекулярных масс этих молекул методом SDS-ПААГ менее стандартизованным, чем исследование полностью денатурированных полипептидов. Однако, выявление одной полосы в таком геле (т.е. отсутствие любых компонентов, отличных от основного компонента) является показателем чистоты белка.

Электрофорез белков в полиакриламидных гелях с натрия додецилсульфатом (SDS-PAGE), как правило, проводится в неоднородной

буферной системе, которая описывается ниже.

Электрофорез в геле с неоднородной буферной системой (диск-электрофорез)

Метод диск-электрофореза, благодаря своей высокой разрешающей способности, рекомендуется для характеристики смесей белков и для обнаружения примесей, которые могут иметь подвижность, близкую к подвижности главного компонента.

Метод подразумевает использование прерывистой системы, состоящей из двух отличных гелей: разделяющего (нижнего) геля и концентрирующего (верхнего) геля. Эти два геля имеют различную пористость (верхний – крупнопористый, нижний – мелкопористый). Кроме степени пористости, эти два геля резко различаются по рН и молярности буферов, в которых они полимеризуются. Пористость, длина и тип буфера для нижнего геля определяются точно такими же соображениями, что и для простого непрерывного электрофореза.

Отличительной особенностью данного вида электрофореза является обязательное использование в составе электродного буферного раствора подвижных ионов, мигрирующих в том же направлении, что и белки; например, применение иона Cl^- для щелочных буферных растворов или иона K^+ – для кислых. В этом буферном растворе подвижность иона, мигрирующего в том же направлении, что и белок, должна сильно зависеть от рН. Для этого удобно использовать цвиттерионы: например, простые аминокислоты (глицин и β -аланин). Их изоэлектрические точки лежат в нейтральной области рН (для глицина $pI=5,97$).

Под действием электрического поля ионы глицина, входящие в состав электродного буферного раствора, следуют за белками в концентрирующий гель. Область перемещающихся границ быстро формируется под действием высоко подвижных хлорид-ионов во фронте и относительно медленных замыкающих ионов глицина. Хлорид-ион из-за его небольшого размера мигрирует быстрее, чем любой из белков, присутствующих в образце.

Величина рН образца и концентрирующих слоев выбирается так, чтобы быть приблизительно на 3 единицы ниже, чем верхнее значение pK_a глицина. Поэтому, на пересечении этих слоев только около 0,1% глициновых молекул имеют отрицательный заряд. Таким образом, быстро движущиеся хлорид-ионы постепенно замещаются ионами глицина, которые при рН 6,8 в концентрирующем геле нейтрализуются и перестают участвовать в проведении тока. Сопротивление верхней части концентрирующего геля резко возрастает, а вместе с ним возрастает и напряженность поля. Локализованные зоны высоковольтного градиента между передним и задним ионными фронтами вызывают относительно высокую скорость миграции белков в концентрирующем геле, которая не ограничивается благодаря крупнопористой структуре этого геля.

На границе концентрирующего и разделяющего гелей белки достигают высокоплотных слоев геля и замедляются из-за уменьшающегося размера пор разделяющего геля. Более высокое значение рН, с которым фронт электродного буферного раствора встречается в разделяющем геле, также заставляет глицинат мигрировать быстрее, и напряженность поля падает, что также снижает скорость движения белков. Таким образом, происходит концентрирование пробы и все компоненты образца, независимо от первоначальной высоты столбика пробы в лунке, входят в нижний гель практически одновременно в виде узкой зоны с высокой концентрацией белка.

В мелкопористом разделяющем геле начинается процесс медленной миграции белков и их фракционирования в зависимости от молекулярных масс, а то обстоятельство, что процесс разделения начинается с узкой исходной зоны, обеспечивает высокую разрешающую способность системы в целом.

Оборудование

Прибор для электрофореза состоит из:

- 1) источника постоянного тока с регулируемым напряжением и со

стабилизатором напряжения;

2) камеры для электрофореза, служащей для размещения пластинки или трубки геля и поддержания постоянных условий проведения анализа. Камера обычно имеет прямоугольную форму, изготовлена из стекла или твердой пластмассы с двумя изолированными буферными резервуарами (анодным и катодным), содержащими раствор электролита. В каждый резервуар погружен электрод (например, платиновый), подключенный к соответствующему полюсу источника тока. Должен поддерживаться одинаковый уровень электролитов в резервуарах, чтобы предотвратить поток жидкости и гидростатическое давление на гель. Камера для электрофореза оснащена крышкой, которая предотвращает испарение растворителей и обеспечивает равномерно насыщенную влагой атмосферу во время всего процесса. Предпочтительно использование предохранителя для отключения электропитания, когда крышка камеры снята. Если мощность тока, приложенного к электрофоретической пластинке, превышает 10 Вт, то рекомендуется применять охлаждение камеры.

3) устройства для заливки геля, представляющего собой стеклянную трубку, стеклянную пластину или пару прямоугольных пластин (ячейку), служащих для формирования поддерживающей среды, в которой непосредственно проводится процесс электрофоретического разделения. Пластины могут быть расположены в камере вертикально или горизонтально (вариант горизонтального электрофореза обычно применяется для агарозных гелей) и должны быть погружены или иметь контакт посредством фитилей с катодным и анодным изолированными буферными резервуарами, содержащими раствор электролита. Преимуществом пластин для проведения процесса является возможность сравнения образцов в одной общей ячейке геля, что более информативно по сравнению с набором гелей из ряда трубок. Преимущество горизонтальных пластин по сравнению с вертикальными заключается в отсутствии проблемы герметизации швов, а недостаток – в большой поверхности контакта с воздухом и, соответственно, риске

испарения жидкости.

Сборку прибора и его очистку после использования проводят в соответствии с инструкцией производителя.

Перед заливкой геля основание и боковые стороны ячейки закрывают подходящими прокладками, толщина которых определяет толщину рабочего геля (при этом после полимеризации геля прокладку в основании убирают). Ячейку заполняют раствором мономера с поперечно-сшивающим агентом и катализатором. Растворы должны быть дегазированы перед полимеризацией и гели должны использоваться свежеприготовленными. Заливку растворов проводят таким образом, чтобы исключить попадание внутрь ячейки пузырьков воздуха.

Гребенку, имеющую зубцы соответствующего размера (в зависимости от объемов наносимого образца), устанавливают в верхнюю часть ячейки на разделяющий гель и оставляют там до окончания полимеризации геля. Формирование геля обычно занимает не менее 30 мин и может считаться законченным, когда между гелем и водным слоем появляется четкая граница. После удаления гребенки из геля, прошедшего полимеризацию, остается ряд лунок.

Заполняют нижний и верхний резервуары камеры предписанным электродным буферным раствором. Готовят испытуемый и стандартный растворы, содержащие краситель и сахарозу или другой плотный и вязкий растворитель. Наносят образцы шприцем или микропипеткой в основания лунок, сразу включают электрический ток и начинают электрофорез, соблюдая предписанные условия (температуру и величину напряжения).

После окончания процесса (когда краситель достигает нижней границы пластины) ток выключают, пластину удаляют из камеры, зоны фиксируют, окрашивают и при необходимости пластину высушивают.

Подготовка полиакриламидного геля для вертикального электрофореза с SDS в неоднородной буферной системе

Сначала готовят и заливают в подготовленную ячейку нижний

разделяющий гель, а затем сверху наслаивают концентрирующий гель.

Приготовление разделяющего геля

В конической колбе готовят рассчитанное в зависимости от объема ячейки количество раствора для разделяющего геля, содержащего требуемую концентрацию акриламида, используя значения, приведенные в Таблице 1. Смешивают компоненты в указанном порядке. В тех случаях, где требуется, перед добавлением раствора аммония персульфата и тетраметилэтилендиамина (TEMED) раствор фильтруют, и, если необходимо, дегазируют раствор через мембрану из ацетата целлюлозы (с диаметром пор 0,45 мкм) под вакуумом при перемешивании. Добавляют соответствующие количества раствора аммония персульфата и TEMED как указано в табл. 1, перемешивают и немедленно заливают в промежуток между двумя стеклянными пластинами ячейки. Оставляют достаточное место для концентрирующего геля (длина зубцов гребенки плюс 1 см). Используя суженную стеклянную пипетку, тщательно наслаивают на гель сверху воду или изобутанол. Оставляют гель в вертикальном положении при комнатной температуре до завершения полимеризации.

Приготовление концентрирующего геля

После окончания полимеризации воду или изобутанол сливают и промывают верхнюю часть геля несколько раз водой, чтобы удалить остатки неполимеризованного акриламида и изобутанола, если он использовался. Сливают с верхней части геля так много жидкости, как только возможно и затем удаляют любую оставшуюся влагу фильтровальной бумагой.

В конической колбе готовят соответствующее количество раствора, содержащего требуемую концентрацию акриламида, используя значения, приведенные в табл. 2. Смешивают компоненты в том же порядке и с использованием тех же приемов фильтрации и дегазирования, что и для разделяющего геля. После добавления соответствующих количеств раствора аммония персульфата и TEMED, как указано в табл.2, перемешивают и немедленно заливают в промежуток между двумя стеклянными пластинами

ячейки непосредственно на поверхность полимеризованного разделяющего геля. Немедленно, но с осторожностью, вставляют чистую тетрафторполиэтиленовую гребенку в раствор концентрирующего геля так, чтобы избежать попадания в гель воздушных пузырей. Добавляют избыточное количество раствора концентрирующего геля так, чтобы полностью заполнить пространство между зубцами гребенки.

Таблица 1 – Приготовление разделяющего геля

Компоненты раствора	Объем компонента (мл) на ячейку заданного объема							
	5 мл	10 мл	15 мл	20 мл	25 мл	30 мл	40 мл	50 мл
1	2	3	4	5	6	7	8	9
4% акриламида								
Вода очищенная	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,6
Раствор акриламида ¹⁾	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
1,5М Трис (pH 8,8) ²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS ³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS ⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED ⁵⁾	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8% акриламида								
Вода очищенная	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
Раствор акриламида ¹⁾	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3
1,5М Трис (pH 8,8) ²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS ³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS ⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED ⁵⁾	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10% акриламида								
Вода очищенная	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
Раствор акриламида ¹⁾	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
1,5М Трис (pH 8,8) ²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS ³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS ⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED ⁵⁾	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12% акриламида								
Вода очищенная	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
Раствор акриламида ¹⁾	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
1,5М Трис (pH 8,8) ²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS ³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS ⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED ⁵⁾	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Компоненты раствора	Объем компонента (мл) на ячейку заданного объема							
	5 мл	10 мл	15 мл	20 мл	25 мл	30 мл	40 мл	50 мл
1	2	3	4	5	6	7	8	9
14% акриламида								
Вода очищенная	1,4	2,7	3,9	5,3	6,6	8,0	10,6	13,8
Раствор акриламида ¹⁾	2,3	4,6	7,0	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
1,5 М Трис (рН 8,8) ²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS ³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS ⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED ⁵⁾	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15% акриламида								
Вода очищенная	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
Раствор акриламида ¹⁾	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
1,5М Трис (рН 8,8) ²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS ³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS ⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED ⁵⁾	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Таблица 2 – Приготовление концентрирующего геля

Компоненты раствора	Объем компонента (мл) на ячейку заданного объема							
	1 мл	2 мл	3 мл	4 мл	5 мл	6 мл	8 мл	10 мл
Вода очищенная	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
Раствор акриламида ¹⁾	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
1,0М Трис (рН 6,8) ⁶⁾	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
100 г/л SDS ³⁾	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
100 г/л APS ⁴⁾	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
TEMED ⁵⁾	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

¹⁾ Раствор акриламида: 30% раствор акриламида/бисакриламида (29:1)

²⁾ 1,5М Трис (рН 8,8): 1,5 М буферный раствор трис-гидрохлорида, рН 8,8

³⁾ 100 г/л SDS: раствор натрия додецилсульфата 100 г/л

⁴⁾ 100 г/л APS: раствор аммония персульфата 100 г/л. Аммония персульфат является источником свободных радикалов, которые управляют полимеризацией акриламида и бисакриламида. Таким образом, раствор аммония персульфата должен добавляться медленно.

⁵⁾ TEMED: тетраметилэтилендиамин.

⁶⁾ 1,0М Трис (рН 6,8): 1 М буферный раствор трис-гидрохлорида, рН 6,8

Гель со вставленной гребенкой оставляют в вертикальном положении при комнатной температуре до окончания полимеризации.

Если в фармакопейной статье нет других указаний, то определение молекулярных масс проводят при нагрузке на лунку 10 мкг общего белка, а

определение чистоты – при нагрузке 40 мкг при окрашивании Кумасси бриллиантовым R250, а при окрашивании нитратом серебра достаточно 2–5 мкг белка на лунку.

Толщина гребенки выбирается точно в соответствии с толщиной используемых прокладок, а размер зубцов – в соответствии с предполагаемым объемом образцов. Необходимый и достаточный объем формируемой лунки определяется как произведение длины, ширины и высоты (в микрометрах) одного зубца гребенки: $V = L \cdot D \cdot H$.

Объем наносимого образца вычисляют следующим образом:

$$V_x = k \cdot X/C,$$

где: k – коэффициент разбавления пробы буферным раствором для образца;

X – требуемое для нанесения на гель количество белка в зависимости от целей анализа, в мкг;

C – концентрация общего белка, определяемая по методу Лоури, в мкг/мл.

Установка геля в прибор для электрофореза и процесс разделения

После окончания полимеризации аккуратно удаляют гребенку, немедленно ополаскивают лунку водой, чтобы удалить любые остатки неполимеризованного акриламида. Если необходимо, выправляют зубцы концентрирующего геля при помощи тупой подкожной иглы, насаженной на шприц.

Устанавливают гель в прибор для электрофореза согласно инструкциям изготовителя оборудования. Добавляют электродный буферный раствор в верхнюю и нижнюю буферные емкости. Обычно, если нет других указаний в фармакопейной статье, в качестве электродного буферного раствора используется трис-глициновый буферный раствор с рН 8,3-8,4.

Удаляют любые пузыри, которые могут появиться у основания геля между стеклянными пластинами. Не следует включать электрический ток до внесения образцов, так как это уничтожит неоднородность буферных систем.

Готовят испытуемый раствор и раствор сравнения в рекомендованном

буферном растворе для образцов в соотношении, указанном в фармакопейной статье или нормативной документации.

Обычно для обеспечения полной денатурации образец в смеси с буферным раствором подвергают дополнительно температурной обработке, режим которой должен быть указан в фармакопейной статье или нормативной документации.

Наносят соответствующие объемы каждого из растворов в лунки концентрирующего геля. Начинают электрофорез, используя условия, рекомендуемые изготовителем оборудования.

Изготовители оборудования для SDS-ПААГ могут обеспечивать применение гелей различной площади и толщины. Соответственно продолжительность электрофореза и сила тока (или напряжение) могут быть изменены, как описано изготовителем прибора, чтобы достичь оптимального разделения, что проверяют по скорости перемещения фронта индикатора в разделяющем геле.

Когда индикатор достигает основания геля, электрофорез останавливают. Удаляют ячейку с гелем из прибора и отделяют стеклянные пластины. Удаляют прокладки, срезают и удаляют концентрирующий гель и немедленно проводят процедуру окрашивания. Для того, чтобы можно было выявить присутствие в исследуемом образце агрегатов и других компонентов, не входящих в гель, концентрирующий гель рекомендуется обрезать не полностью, оставляя 2–3 мм.

Так называемые, «готовые к использованию» коммерческие гели и наборы реактивов к ним могут быть применены при условии, что они дают результаты, отвечающие валидационным критериям, приведенным ниже в разделе «Оценка пригодности системы».

Обнаружение белков в гелях

Окрашивание Кумасси бриллиантовым R250 – наиболее распространенный метод окрашивания белков с пределом обнаружения порядка от 1 до 10 мкг белка в полосе. Окрашивание нитратом серебра –

более чувствительный метод окрашивания белков в гелях, позволяющий выявлять до 1 нг белка.

Для селективного окрашивания гликозилированных белков или липопротеидов иногда применяют другие красители или их смеси, о чем должно быть сделано дополнительное указание в фармакопейной статье или нормативной документации.

Все процедуры окрашивания геля проводят, как правило, при комнатной температуре и при слабом перемешивании в любом удобном контейнере. При окрашивании геля следует использовать одноразовые перчатки, иначе на геле могут быть прокрашены отпечатки пальцев.

Окраска раствором Кумасси

Погружают гель в большой избыток красящего раствора Кумасси раствора и выдерживают, по крайней мере, 1 ч. Поскольку кислотнo-спиртовой состав окрашивающего раствора не позволяет полностью фиксировать белки на геле, это может приводить к потерям некоторых низкомолекулярных белков во время окрашивания и обесцвечивания тонких гелей. Полная фиксация возможна при выдерживании геля в 10 % растворе трихлоруксусной кислоты в течение 1 ч перед погружением в окрашивающий Кумасси раствор.

Для ускорения процедуры окрашивания допускается подогрев геля в окрашивающем растворе в микроволновой печи. Режим подогрева должен быть описан в фармакопейной статье или нормативной документации. Затем окрашивающий раствор удаляют и гель промывают водой.

Обесцвечивают гель избытком обесцвечивающего раствора. Заменяют порции обесцвечивающего раствора несколько раз до тех пор, пока окрашенные полосы белка не станут ясно различимы на прозрачном фоне. Чем более полно обесцвечен гель, тем меньшие количества белка могут быть обнаружены этим методом. Обесцвечивание может быть ускорено при добавлении в обесцвечивающий раствор нескольких граммов анионообменной смолы или маленького кусочка пористого материала.

После обесцвечивания гель промывают водой и либо высушивают, либо оставляют в воде для хранения при температуре от 2 до 8 °С.

Окраска раствором нитрата серебра

Погружают гель в большой избыток фиксирующего раствора и выдерживают в течение 1 ч. Фиксирующий раствор сливают, добавляют новую порцию того же раствора и инкубируют, по крайней мере 1 ч или оставляют на ночь. Сливают фиксирующий раствор и промывают гель в большом избытке воды в течение 1 ч. После этого пропитывают гель в течение 15 мин в 1 % растворе глутарового альдегида. Промывают гель дважды по 15 мин большим количеством воды. Выдерживают гель в темноте в свежеприготовленном 2 % растворе серебра нитрата в течение 15 мин. Промывают гель три раза по 5 мин в большом количестве воды. Погружают гель приблизительно на 1 мин в проявляющий раствор, пока не будет достигнуто удовлетворительное окрашивание. Окрашивание прекращают в момент проявления полосы в треке с минимальным количеством препарата (например, 0,001 мкг). Останавливают развитие окраски погружением в стоп-раствор на 15 мин. Ополаскивают гель водой.

Целесообразно использовать готовые наборы реактивов для окрашивания гелей серебра нитратом.

Высушивание проявленных SDS-полиакриламидных гелей

В зависимости от используемого метода окрашивания подготовку геля к высушиванию проводят различными способами:

– при окраске Кумасси после процедуры обесцвечивания гель выдерживают в смеси 10,0 г глицерина и 92 мл воды очищенной не менее 2 ч (возможна инкубация «на ночь»);

– при окраске нитратом серебра гель после заключительной процедуры ополаскивания выдерживают в течение 5 мин в смеси 2,0 г глицерина и 98 мл воды очищенной.

Погружают два листа пористой целлюлозной пленки в воду и выдерживают в течение 5–10 мин. Растягивают один из листов на рамке для

высушивания. Аккуратно помещают пропитанный в глицериновом растворе гель на натянутую целлюлозную пленку. Удаляют все случайно попавшие воздушные пузыри, и заливают вокруг граней геля несколько миллилитров воды. Помещают второй лист пленки сверху и снова удаляют все воздушные пузыри. Заканчивают сборку рамки для сушки геля и помещают ее в сушильный шкаф или оставляют при комнатной температуре до полного высыхания.

Определение молекулярных масс белков

Молекулярные массы белков определяют по сравнению их подвижностей с подвижностью нескольких белков-маркеров известной молекулярной массы. Готовые смеси белков с точно известными молекулярными массами (маркеры) для калибрования гелей предлагаются производителями материалов и оборудования для электрофореза в различных диапазонах молекулярных масс. Концентрированные исходные растворы полипептидов известной молекулярной массы готовят в соответствующем буферном растворе для образцов и наносят на гель одновременно с образцом испытуемого белка.

Сразу после того, как электрофорез завершен, следует отметить положение полосы красителя бромфенолового синего, которая соответствует электрофоретическому ионному фронту. Это может быть сделано при помощи меток-надрезов в геле или путем прокола геля в зоне окрашенного фронта иглой, предварительно обмакнутой в черную тушь или другой подходящий контрастный краситель.

После окрашивания геля измеряют расстояния пробега для каждой полосы белка (маркеров и испытуемого образца) от вершины разделяющего геля. Вычисляют отношение расстояния пробега каждого белка к расстоянию пробега фронта красителя. Нормализованные расстояния пробега, вычисленные таким образом, называются относительными подвижностями белков (относительно фронта красителя) и обозначаются как R_f .

$$R_f = \frac{R}{R_s},$$

где: R – расстояние пробега белка;

R_s – расстояние пробега красителя

Строят график зависимости логарифма относительных молекулярных масс стандартов белка (M_r) от значения R_f . Неизвестные молекулярные массы могут быть оценены методом линейной регрессии или интерполяцией кривых зависимости $\log M_r$ от R_f в том случае, если значения, полученные для испытуемых образцов, находятся в линейной части графика.

Количественное определение примесей

В тех случаях, когда в фармакопейной статье указан предел примесей, то перед анализом должен быть приготовлен раствор сравнения, соответствующий этому уровню примеси, путем разбавления испытуемого раствора. Например, в случае 5 % предела, раствор сравнения должен быть приготовлен разведением испытуемого раствора в соотношении 1:20. При этом примесь (полоса, отличная от главной полосы) на электрофореграмме с испытуемым препаратом не должны быть интенсивнее, чем полоса, полученная с раствором сравнения. При наличии нескольких полос примесей должно быть предусмотрено требование к содержанию каждой из них и к содержанию суммы примесей.

Приемлемым условием определения примесей может считаться метод количественной нормализации с использованием денситометрического интегрирования. В этом случае предварительно должна быть показана линейность отклика прибора.

ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ СИСТЕМЫ

Результаты анализа считаются достоверными только в том случае, если:

- белки маркера молекулярных масс распределены приблизительно на 80 % длины геля и охватывают весь требуемый диапазон разделения (например, диапазон молекулярных масс продукта и его димера или продукта и родственных примесей);
- зависимость логарифма молекулярной массы белков-маркеров и

R_f – линейна в необходимом диапазоне.

Дополнительные требования приемлемости результатов анализа должны быть описаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Примечания.

1) Приготовление 30% раствора акриламида/бисакриламида. В мерный стакан вместимостью 250 мл помещают 29,2 г акриламида и 0,8 г N,N'-метиленабисакриламида, растворяют в воде очищенной при перемешивании, доводят объем раствора водой до 100 мл и вновь перемешивают (при необходимости раствор фильтруют, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации). Раствор хранят во флаконе из темного стекла при температуре 4–6 °С не более 1 мес.

2) Приготовление раствора натрия додецилсульфата. В мерный стакан вместимостью 250 мл помещают 10,0 г натрия додецилсульфата, растворяют в воде очищенной при аккуратном перемешивании, избегая вспенивания, доводят объем раствора до 100 мл и вновь перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре.

3) Приготовление раствора аммония персульфата. Растворяют 100,0 мг аммония персульфата в 1,0 мл воды очищенной. Раствор используют свежеприготовленным.

4) Приготовление 1,5М буферного раствора трис-гидрохлорида (pH 8,8). В мерный стакан вместимостью 500 мл помещают 90,8 г трис(гидроксиэтил)аминометана и растворяют в 400 мл воды. Доводят pH раствора до 8,8 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты, затем доводят объем раствора тем же растворителем до 500 мл и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4–6 °С не более 1 мес.

5) Приготовление 1,0 М буферного раствора трис-гидрохлорида (pH 6,8). В мерный стакан вместимостью 500 мл помещают 60,6 г трис(гидроксиэтил)аминометана и растворяют в 400 мл воды. Доводят pH раствора до 6,8 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты, затем доводят объем раствора тем же растворителем до 500 мл и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4–6 °С не более 1 мес.

6) Приготовление электродного буферного раствора (10×) (pH 8,3). В мерный стакан, вместимостью 1000 мл помещают 30,0 г трис(гидроксиэтил)аминометана, 144,0 г глицина и 10,0 г натрия додецилсульфата, растворяют в воде и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Фильтруют и измеряют pH раствора, который должен быть 8,3 - 8,4. Доводить pH раствора кислотой или щелочью до необходимого значения не допускается.

Раствор хранят при комнатной температуре не более 3 мес.

Непосредственно перед анализом 1 часть приготовленного раствора

смешивают с 9 частями воды очищенной.

7) Приготовление буферного раствора для образцов (4×) для электрофореза в восстанавливающих условиях с 2-меркаптоэтанолом. В химическом стакане смешивают 4,7 мл воды очищенной, 0,5 мл 1М буферного раствора трис-гидрохлорида (рН 6,8), 0,8 мл глицерина, 1,6 мл 10% раствора натрия додецилсульфата, 0,4 мл 2-меркаптоэтанола и 2 мг бромфенолового синего. Раствор хранят при температуре 4–6 °С не более 1 мес.

8) Приготовление буферного раствора для образцов (4×) для электрофореза в восстанавливающих условиях с дитиотреитолом. В химическом стакане тщательно перемешивают 5,0 мл воды очищенной, 0,5 мл 1М буферного раствора трис-гидрохлорида (рН 6,8), 0,8 мл глицерина, 1,6 мл 10% раствора натрия додецилсульфата, 0,06 г 1,4-дитиотреитола и 2 мг бромфенолового синего. Раствор используют свежеприготовленным.

9) Приготовление буферного раствора для образцов (4×) для электрофореза в невосстанавливающих условиях. В химическом стакане тщательно смешивают 5,1 мл воды очищенной, 0,5 мл 1М буферного раствора трис-гидрохлорида (рН 6,8), 0,8 мл глицерина, 1,6 мл 10% раствора натрия додецилсульфата и 2 мг бромфенолового синего. Раствор хранят при температуре 4–6 °С не более 3 мес.

10) Приготовление красящего раствора Кумасси. Раствор готовят по одному из способов приготовления (№ 1 или № 2):

Раствор № 1. Растворяют 0,3 г Кумасси бриллиантового R250 в смеси 100 мл спирта метилового или этилового и 100 мл воды очищенной. Перемешивают до полного растворения (в течение 1 ч). Добавляют 25 мл ледяной уксусной кислоты, доводят объем раствора водой очищенной до 250 мл и перемешивают. Хранят окрашивающий раствор в темной бутылки при комнатной температуре. Раствор хранят при температуре 18-25 °С в течение 2 мес.

Раствор № 2. 1,0 г Кумасси ярко-голубого R-250 помещают в химический стакан, доводят до объема 250,0 мл этиловым спиртом, перемешивают не менее 3,5 часов до полного растворения красителя, добавляют 100,0 мл кислоты ледяной уксусной и доводят объем деионизованной водой до 1000,0 мл. Раствор хранят при температуре 18-25 °С в течение 2 мес.

11) Приготовление обесцвечивающего раствора. К 400 мл спирта метилового или этилового добавляют 100 мл ледяной уксусной кислоты, доводят объем раствора до 1000 мл и перемешивают.

12) Приготовление фиксирующего раствора. К 250 мл спирта метилового или этилового добавляют 0,27 мл 37 % раствора формальдегида, доводят объем раствора водой очищенной до 500 мл и перемешивают.

13) Приготовление 1 % раствора глутарового альдегида. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 4 мл 25 % глутарового альдегида или 2 мл 50 % глутарового альдегида, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

14) Приготовление раствора серебра нитрата. Смешивают 2,75 мл 25 %

раствора аммиака и 40 мл 1 М раствора натрия гидроксида, прибавляют по каплям при постоянном перемешивании 8 мл 20 % раствора серебра нитрата, доводят объем раствора водой очищенной до 200 мл и перемешивают.

15) Приготовление 20 % раствора серебра нитрата. Растворяют в воде очищенной 2,0 г (точная навеска) серебра нитрата, доводят объем раствора водой до 10 мл и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

16) Приготовление проявляющего раствора. Смешивают 2,5 мл 2,0 % раствора лимонной кислоты и 0,27 мл 37 % раствора формальдегида, доводят объем раствора водой очищенной до 500 мл и перемешивают.

17) Приготовление стоп-раствора. К 50 мл воды прибавляют 10 мл ледяной уксусной кислоты, доводят объем раствора водой очищенной до 100 мл и перемешивают.

В случае использования других реактивов и растворов они должны быть описаны в фармакопейной статье или нормативной документации.