**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Изоэлектрическое фокусирование** |  | **ОФС** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.7.2.0021.15** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод изоэлектрического фокусирования – метод электрофореза, основанный на разделении белков в соответствии с их изоэлектрическими точками. Разделение проводят на пластине из полиакриламидного или агарозного геля, содержащего смесь амфотерных электролитов (амфолитов). При действии электрического поля амфолиты мигрируют в геле, создавая градиент рН. В некоторых случаях используют гели с фиксированным градиентом рН, полученные путём включения слабых кислот или оснований в определённые места геля во время его приготовления. Когда нанесённые белки достигают фракции геля, которая имеет такое же значение рН, что и их изоэлектрическая точка (pI), заряд данных белков нейтрализуется и миграция прекращается. Градиенты могут быть созданы в различных диапазонах рН в зависимости от выбранной смеси амфолитов. В некоторых случаях используют гели с фиксированным градиентом рН, формируемом при распределении слабых кислот или оснований внутри пространства полимерной матрицы на этапе приготовления. При достижении молекулами области геля с рН, совпадающим со значением изоэлектрической точки (pI), заряд белка нейтрализуется, и миграция останавливается. Градиенты могут быть сформированы для различных диапазонов рН в зависимости от используемых амфолитов.

**Теоретические аспекты**

В изоэлектрической точке молекула белка не заряжена и не может передвигаться в матрице геля под действием электрического поля. Её перемещение, однако, может происходить в результате диффузии. Градиент рН вынуждает белок оставаться в изоэлектрическом состоянии, фокусируя данное вещество. Увеличение приложенного напряжения или уменьшение количества нанесённого вещества улучшает разделение полос. Величина приложенного напряжения ограничена выделяющейся теплотой, которая должна быть рассеяна. Использование тонких слоёв геля, а также пластин с эффективным охлаждением, контролируемых термостатирующим устройством, предотвращает возгорание геля и в то же время обеспечивает точное фокусирование. Разделение оценивают по минимальной разности pI (), которая необходима для разделения двух соседних полос:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *D* | – | коэффициент диффузии белка; |
|  |  | – | градиент рН; |
|  | *E* | – | напряжённость электрического поля, В/см; |
|  |  | – | изменение подвижности вещества при изменении рН в диапазоне,близком к pI. |

Поскольку *D* и для определённого белка не могут быть изменены, разделение улучшают путём использования более узкого диапазона рН либо увеличения напряжённости электрического поля.

Разрешение между полосами белков в случае использования ИЭФ-геля, содержащего амфолиты-носители, достаточно хорошее. Разрешение улучшают использованием фиксированных градиентов рН, для создания которых применяют буферные вещества, аналогичные амфолитам-носителям, сополимеризованные с матрицей геля. При использовании геля, содержащего амфолиты-носители, разделяют белки, значения pI которых отличаются в пределах 0,02 единиц pH, в то время как фиксированные градиенты рН позволяют разделить белки, изоэлектрические точки которых различаются приблизительно на 0,001 pH.

**Практические аспекты**

Уделяют особое внимание характеристикам и/или подготовке образца. Наличие солей в образце может вызвать ряд проблем, поэтому для разбавления используют деионизированную воду или 2 % раствор амфолитов, при необходимости, проводят обессоливание доступным способом.

Время, необходимое для завершения фокусирования в тонком слое полиакриламидных гелей, определяют путём нанесения окрашенного белка (например, гемоглобина) в различные области поверхности геля: стабильное состояние достигается тогда, когда все нанесения дают идентичный образец полос. В ряде случаев о завершении фокусирования судят по времени, прошедшему после нанесения образца.

Метод изоэлектрического фокусирования может быть применён:

- для подтверждения подлинности, когда подвижность испытуемого образца сравнима с подвижностью стандартного образца или маркера pI;

- для оценки примесей по интенсивности окрашивания полос относительно основных компонентов по сравнению со стандартным образцом;

- для количественного определения по интенсивности окраски полос с помощью денситометра или аналогичного оборудования.

**Оборудование**

Прибор для проведения изоэлектрофокусирования состоит из:

- высоковольтного источника питания с программой, специально разработанной для изоэлектрофокусирования в полиакриламидных гелях, с максимальным напряжением не менее 3000 В, током 300 мA и мощностью 300 Вт;

- электрофорезной камеры из жёсткой пластмассы, содержащей охлаждающую пластину из соответствующего материала для поддержания геля;

- платиновых электродов, которые соединяются с гелем посредством электродных (бумажных или гелевых) полосок необходимой ширины, длины и толщины, пропитанных анодным и катодным буфером.

**Изоэлектрическое фокусирование в полиакриламидных гелях**

***Методика***

Ниже приведён пример методики ИЭФ в пластинах полиакриламидного геля.

*Матрица формования*. Матрица формования (рис. 1) состоит из стеклянной пластинки (A), на которую для облегчения работы с гелем помещена полиэфирная плёнка (B), одной или нескольких распорных деталей (C), второй стеклянной пластинки (D) и зажимов, скрепляющих всю конструкцию.

*Раствор акриламида 7,5 %.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 29,1 г акриламида и 0,9 г метиленбисакриламида, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки 100 мл воды. В мерную колбу вместимостью 10 мл прибавляют 2,5 млполученного раствора и подходящую смесьамфолитов, доводят объём водой до 10 мл.Раствор тщательно перемешивают и дегазируют.

*Приготовление формы.* Полиэфирную плёнку помещают на нижнюю стеклянную пластинку, вставляют распорную деталь, помещают вторую стеклянную пластинку и скрепляют конструкцию зажимами. Перед использованием раствор акриламида 7,5 % помещают на магнитную мешалку и прибавляют к нему по 0,25 объёма аммония персульфата раствора 10 % и тетраметилэтилендиамина.Немедленно заполняют раствором пространство между стеклянными пластинками формы.



Рисунок 1 – Матрица формования

Форму разбирают на составные части и, используя полиэфирную плёнку, переносят гель на охлаждённую подложку, увлажнённую несколькими миллилитрами подходящей жидкости, избегая образования воздушных пузырьков.

Готовят испытуемые растворы и растворы сравнения. Для нанесения образца на поверхность геля помещают полоски бумаги размером приблизительно 10 мм × 5 мм и пропитывают каждую из них указанным количеством испытуемого раствора и раствора сравнения. Также наносят соответствующее количество раствора белков с известными величинами изоэлектрических точек, служащих в качестве маркеров рН для калибровки геля. В некоторых протоколах вместо импрегнированных бумажных полосок используют гель, который имеет лунки, предназначенные для помещения раствора образца. Отрезают 2 полоски бумаги длиной, соответствующей длине геля, и пропитывают их растворами электролитов: кислотой для анода и щёлочью для катода (составы анодного и катодного растворов приводятся в фармакопейной статье). Эти бумажные фитильки помещают на каждую сторону геля на расстоянии нескольких миллиметров от его границы. Устанавливают крышку так, чтобы электроды контактировали с полосками бумаги (соответственно, анодным и катодным полями). Выполняют изоэлектрическое фокусирование, используя соответствующие параметры электрического поля. Когда миграция смеси стандартных белков стабилизируется, отключают источник питания. С помощью пинцета удаляют полоски, предназначенные для нанесения образца, и 2 электродных фитилька. Погружают гель в фиксирующий раствор для изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле*.* Выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин, осторожно встряхивая. Сливают раствор и прибавляют 200 мл обесцвечивающего раствора*.* Выдерживают при перемешивании в течение 1 ч. Высушивают гель, прибавляют Кумасси красящий раствор. Выдерживают в течение 30 мин и обесцвечивают гель путём пассивной диффузии обесцвечивающего растворадо тех пор, пока на чистом фоне не будут хорошо видны полосы. Отмечают положение и интенсивность полос на электрофореграмме.

***Изменения методики (предмет валидации)***

Предметом валидации могут быть изменения в методологии или методике изоэлектрического фокусирования.

Изменения включают в себя:

- использование имеющихся в продаже коммерчески доступных гелей, а также готовых окрашивающих и обесцвечивающих наборов;

- использование альтернативного режима фокусирования, включающего изменения электрического поля в зависимости от размеров геля и типа оборудования, а также использование установленного времени фокусирования вместо субъективной оценки стабильности полос;

- использование фиксированных градиентов рН;

- использование стержневых гелей;

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

- изменения в методике нанесения образца, включающие различные объёмы образца или использование шаблонов или фитильков, изготовленных не из бумаги;

- использование альтернативных условий перемещения, включающих изменения электрического поля в зависимости от размеров геля и оборудования, а также использование фиксированных значений времени миграции вместо субъективной интерпретации стабильности полосы;

- включение стадии предварительного фокусирования;

- использование автоматизированного оборудования;

- использование гелей агарозы;

- использование pI маркеров.

***Валидация методики изоэлектрического фокусирования***

При использовании альтернативных методик по отношению к описанной методике, они должны быть валидированы.

Для валидации разделения могут быть использованы следующие критерии:

- формирование воспроизводимого градиента рН с желаемыми характеристиками, оцениваемыми, например, с помощью окрашенных маркеров рН с известными величинами изоэлектрических точек;

- сравнение электрофореграммы, прилагаемой к стандартному образцу, сэлектрофореграммой, полученной при проведении испытания;

- оценка степени разделения использованных pI маркеров;

- для валидации чувствительности методики проводится установление значений минимальных концентраций при которых возможна регистрация интенсивности окраски полос на электрфореграммах растворов стандартного образца с заданными концентрациями;

- любые другие критерии валидации, указанные в фармакопейной статье.

***Пригодность системы***

Испытания пригодности системы являются неотъемлемой частью методики и используют для того, чтобы убедиться в надлежащем функционировании системы для изоэлектрического фокусирования и обеспечить выполнение предъявляемых к ней требований. Выбор параметров зависит от типа испытания.

Проводят оценку разделительной способности системы (разрешения между полосами) и оценку воспроизводимости значений pI анализируемых полос, а так же оценку чувствительности и воспроизводимости относительной интенсивности окраски анализируемых полос (при необходимости).

При использовании маркеров pI они должны разделяться в установленном интервале значений;

Значения pI полос маркеров должны соответствовать требованиям и находиться в пределах установленных допусков;

Значения относительной интенсивности окраски полос стандартного образца в пределах одного трека должны находиться в установленных пределах.

**Особые изменения общей методики**

Особенности конкретных субстанций могут потребовать внесения изменения общей методики:

- добавление в гель мочевины (обычно 3 M концентрация достаточна для поддерживания белка в растворённом состоянии, но может быть использована концентрация до 8 M): некоторые белки в изоэлектрической точке выпадают в осадок, в этом случае для того, чтобы белок оставался в растворе, в гель вводится мочевина; при использовании мочевины следует применять только свежеприготовленные растворы, чтобы не допустить карбамилирования белка;

- использование альтернативных способов окрашивания;

- использование добавок для геля, таких как неионные детергенты (например, октилглюкозид) или цвиттер-ионные детергенты (например,   
3-[(3- Холамидопропил)диметиламмоний-]-1-пропансульфонат)*,* и добавление амфолита к образцу для предотвращения процессов агрегации и преципитации белков.

**Положения, которые следует принимать во внимание**

Образцы могут наноситься на любой участок поверхности геля, но для того, чтобы защитить белки от экстремальных значений рН, образцы не должны наноситься в непосредственной близости от электродов. При разработке методики наносят белок на гель в трёх местах (посередине и на обоих концах). Образцы белка, наносимые на противоположные концы геля, могут быть различными.

При слишком продолжительном фокусировании в геле может возникнуть процесс, называемый катодным дрейфом, при котором градиент рН с течением времени разрушается. Причины данного явления изучены не до конца, однако электроэндоосмос или поглощение углекислого газа из окружающего воздуха могут стимулировать подобный дрейф. Для устранения подобного воздействия рекомендуется использовать гели с иммобилизованным градиентом рН.

Во время проведения фокусирования обеспечивают эффективное охлаждение (приблизительно 4 °C) подложки, на которую помещён гель. Высокие напряжения электрического поля, используемые во время изоэлектрического фокусирования, приводят к перегреванию и влияют на качество фокусируемого геля.