ОПРЕДЕЛЕНИЕ **ЧИСТОТЫ** И **ГЕТЕРОГЕННОСТИ БЕЛКОВ** МЕТОДАМИ КАПИЛЛЯРНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И КАПИЛЛЯРНОГО ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Антитела, белковые фармацевтические препараты и другие рекомбинантные белки - важные продукты фармацевтического и биотехнологического производства. Определение их чистоты, стабильности и гетерогенности является очень важной задачей, так как посттрансляционные модификации, а также процессы разложения белков после биосинтеза могут радикально изменить их биологическую активность.

МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Для определения показателей качества белковых препаратов используют два основных метода - **капиллярный гель-электрофорез (КГЭ, англ. CGE)** и **капиллярное изоэлектрическое фокусирование (КИЭФ, англ. CIEF)**. Первый метод применяют для разделения белков с разной молекулярной массой, второй – для разделения белков с примерно одинаковой молекулярной массой, но с различными изоэлектрическими точками (разделение изоформ с разным зарядом).

В методе **капиллярного гель-электрофореза** используют капилляр, заполненный буфером с полимерными добавками. Перед анализом образец белка денатурируют нагреванием в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) в редуцирующих (с восстанавливающим агентом) или в нередуцирующих условиях. После быстрого охлаждения образец вводят в капилляр, прикладывают высокое напряжение, и белки начинают двигаться сквозь полимерный буферный раствор. Как и в классическом гель-электрофорезе разделение достигается за счет различий в молекулярных массах (т.н. ситовой эффект). Метод позволяет разделять белки, отличающиеся по массам на 4 % и более.

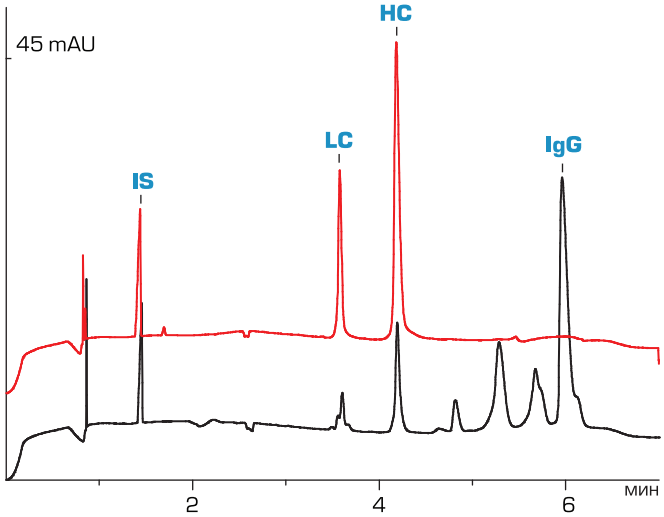
В методе **капиллярного изоэлектрического фокусирования** капилляр заполняют смесью буферного раствора, амфолитов и пробы. На первом этапе (фокусировка), прикладывают высокое напряжение, в результате чего в капилляре возникает градиент pH, и молекулы белка в соответствии со своими изоэлектрическими точками (и.э.т.) фокусируются в узкие зоны, в которых они теряют заряд и электрофоретическую подвижность. На втором этапе (мобилизация) выходную виалу заменяют на виалу с мобилизирующим раствором и снова прикладывают высокое напряжение, после чего сфокусированные зоны начинают двигаться к детектору. При помощи данного метода могут быть разделены белки с изоэлектрическими точками, отличающимися на 0.04 единицы pI.

Для обоих методов существует прямая пропорциональная зависимость логарифма молекулярной массы белков (в случае КГЭ) или изоэлектрической точки (в случае КИЭФ) от времени миграции. Это даёт возможность определять молекулярную массу или и.э.т. у неизвестных белков при использовании в анализе добавленных маркеров с заранее известными параметрами.

ПРИМЕРЫ АНАЛИЗА

Метод: **капиллярный гель-электрофорез**
Фоновый электролит: гель для анализа белков
Капилляр: $L_{эфф}/L_{общ}$=32/42 см; ID=75 мкм
Напряжение: + 20 кВ
Температура: 25 °C
Длина волны: 220 нм

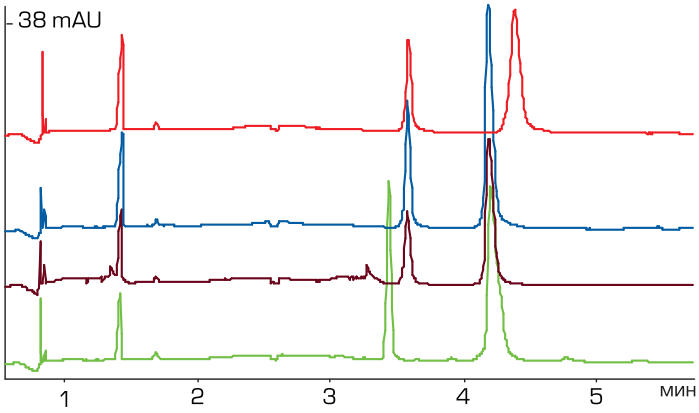
Проба: рекомбинантный иммуноглобулин IgG, редуцирующие (**красный**) и нередуцирующие (**черный**) условия
IS – внутренний стандарт,
LC – короткая цепь (25 kDa),
HC – длинная цепь (55 kDa),
IgG – антитело (146 kDa).
Остальные пики – продукты разложения антитела



Метод: **капиллярный гель-электрофорез**
Фоновый электролит: гель для анализа белков
Капилляр: $L_{эфф}/L_{общ}$=32/42 см; ID=75 мкм
Напряжение: +20 кВ
Температура: 25 °C
Длина волны: 220 нм

Пробы: четыре разных препарата IgG, анализ в редуцирующих условиях

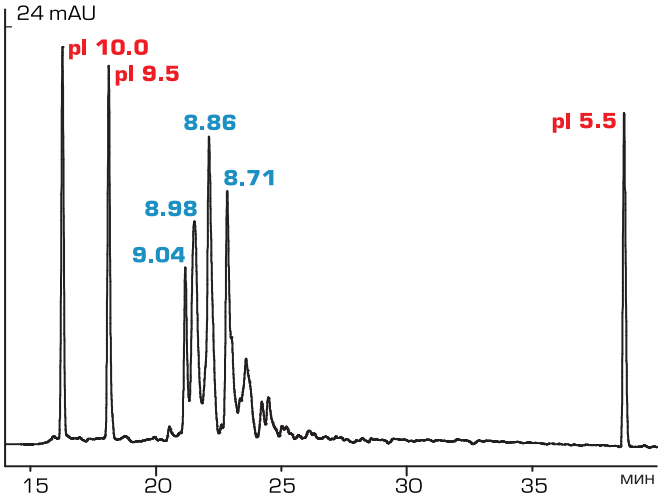
Результаты: наблюдаются пики короткой и длинной цепей. Отличия в массе: 2 kDa для короткой цепи (**зеленая** ЭФГ) и 5 kDa для длинной цепи (**красная** ЭФГ)



Метод: **капиллярное изоэлектрическое фокусирование**
Фоновый электролит: для КИЭФ
Капилляр: покрытый, $L_{эфф}/L_{общ}$=32/42 см; ID=50 мкм
Напряжение: + 25 кВ
Длина волны: 280 нм

Проба: рекомбинантный препарат IgG

Результаты: разделены 4 изоформы белка с незначительно отличающимися pI. Для определения pI изоформ белка (показаны **синим**) добавлены маркеры (показаны **красным**).

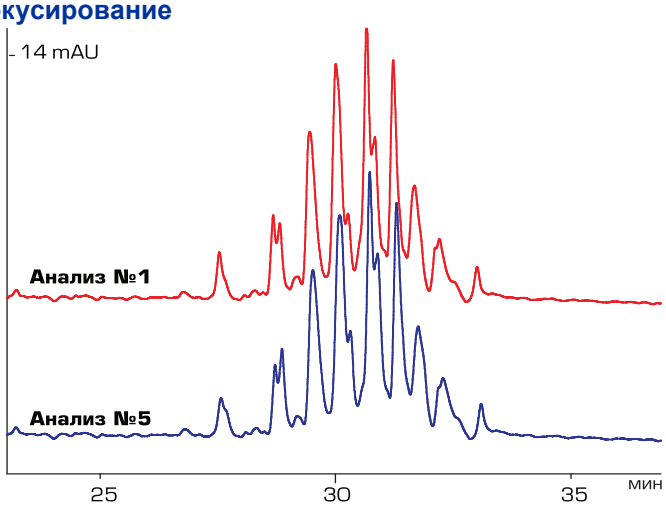


Воспроизводимость анализа

Метод: **капиллярное изоэлектрическое фокусирование**

Проба: белковый препарат

Результаты: разделены несколько различно заряженных изоформ, показывающих гетерогенность белкового препарата (в геле на пластинке было показано, что белковый препарат гомогенен). Серия анализов была проведена в течение нескольких дней для оценки воспроизводимости. Анализ №5 (**синий**) был проведен двумя днями позже анализа №1 (**красный**).



ОБОРУДОВАНИЕ

Система КЭ «КАПЕЛЬ®-105М» с функцией ускоренной промывки капилляра или «КАПЕЛЬ®-205».

Вся информация в данной листовке является справочной. По вопросу получения более подробной информации следует обращаться к разработчику систем КЭ «КАПЕЛЬ®» – Группе компаний «ЛЮМЭКС».

Центральный офис «ЛЮМЭКС»: 195220, г. Санкт-Петербург, ул. Обручевых, д. 1, лит. Б
Тел./Факс: +7 (812) 335-03-36 E-mail: methodists@lumex.ru
Почтовый адрес: 190900, г. Санкт-Петербург, BOX 1234