

Время выдерживания геля в фиксирующем, окрашивающем растворах, время отмывания геля и регистрация положения и интенсивности полос должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Примечания

1. Приготовление растворов. Описание приготовления растворов 10 % раствора аммония персульфата, раствора ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин); фиксирующего раствора, 25 % раствора спирта этилового и 8 % раствора уксусной кислоты указано в ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

2. Особенности методики, требующие внимания. Исследуемые образцы могут наноситься на любой участок поверхности геля, но для защиты белков от экстремальных величин pH пробы не должны наноситься в непосредственной близости от электродов. При валидации метода пробы могут быть нанесены на гель в трех позициях: посередине геля и на его концах. Следует не допускать слишком длительное фокусирование, т.к. в геле может возникнуть процесс, называемый катодным дрейфом, при котором с течением времени градиент pH разрушается. Причины данного явления не до конца изучены. Одними из факторов могут быть электроэндоосмос и абсорбция диоксида углерода. Катодный дрейф наблюдается в виде миграции сфокусированной белковой полосы от катодного конца геля. Для решения этой проблемы могут быть использованы иммобилизованные гели.

Во время фокусирования необходимо обеспечить эффективное охлаждение пластины, на которую помещен гель, при температуре от 8 до 10 °C. Высокое напряжение электрического поля, используемого при изоэлектрическом фокусировании, может привести к перегреванию и влиять на качество разделения.

Особенности методики, требующие внимания, должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Возможные модификации методики

Особенности некоторых исследуемых веществ могут потребовать внесения следующих изменений в методику:

– из-за снижения растворимости белков вблизи изоэлектрической точки и опасности их осаждения в состав геля вводят мочевины. Допускается добавление в гель от 3М до 9М растворов мочевины. Для предотвращения