

избыточное количество расщепляющего реагента, вместе с тем, его количество должно быть минимизировано, чтобы предотвратить вклад реагента в структуру пептидной карты.

В большинстве случаев протеин, подвергаемый гидролизу, и реагент берут в соотношении от 10:1 до 500:1.

Для оптимизации процедуры расщепления может потребоваться добавление расщепляющего агента в два или более этапов.

При этом степень разведения реагирующей смеси должна оставаться достаточно небольшой для обеспечения следующего этапа пептидного картирования — разделения. Для того, чтобы исключить наличие артефактов, т.е. пиков не относящиеся к белку и их влияние на результаты пептидного картирования, при процедуре расщепления пептидных связей необходимо предусмотреть проведение контрольного определения со всеми реагентами за исключением анализируемого белка.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

Для разделения пептидных фрагментов используются различные методы. Выбор метода зависит от белка, для которого составляется пептидная карта.

Методы, наиболее часто используемые для разделения пептидных фрагментов:

- 1) Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная
хроматография;
- 2) Ионообменная хроматография;
- 3) Хроматография гидрофобного взаимодействия;
- 4) Капиллярный электрофорез.

Наиболее часто используемым методом является метод обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Хроматографические условия.

Хроматографическая колонка. Для каждого белка выбор колонки осуществляется эмпирически.