

При элюировании рекомендуется низкая скорость изменения состава. Градиент оптимизируют, добиваясь четкого разделения между всеми реперными пиками, выбранными в качестве «маркерных» пиков для проводимого испытания.

Детектирование

Наиболее распространенным детектором при пептидном картировании является спектрофотометрический детектор, с определением поглощения при аналитической длине волны в интервале от 200 нм до 280 нм (обычно 214 (215) нм, могут использоваться так же длины волн 210, 256 нм). Для повышения информативности, используются также флуориметрический и масс-спектрометрический детекторы.

Другие параметры.

Для достижения хорошей воспроизводимости, как правило, требуется контроль температуры колонки, которая варьируется в широких пределах от 25 до 60 °C. Скорость подвижной фазы составляет от 0,1 мл/мин до 2,0 мл/мин.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК

Целью валидированного метода характеристики протеина методом пептидного картирования является определение как минимум 95 % теоретического состава структуры белка.

Использование стандартного образца параллельно с испытуемым пептидом является необходимым условием при разработке и валидации методик пептидного картирования.

Разработка методики.

В ходе разработки методики пептидного картирования осуществляется подбор условий подготовки белка к гидролизу и описываются последовательности аминокислот для каждого пептидного фрагмента, получаемого в результате гидролиза.

Установление первичной структуры пептидных фрагментов (последовательности аминокислот), образованных в ходе гидролиза