

毛细管凝胶电泳（CE-SDS）对胶原蛋白纯度分析

Analysis of Purity of recombinant collagen by CE-SDS analysis

兰朝辉，高铁，陈泓序，郭立海

Lan Zhaohui, Gao Tie, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX, 中国

SCIEX, China

关键词：CE-SDS；胶原蛋白；纯度

1、前言

胶原蛋白（collagen）是一类哺乳动物细胞外基质中的主要结构蛋白，广泛地存在于皮肤、骨骼、肌肉等组织中，主要参与细胞的增殖、分化、迁移等生理生化行为。对组织细胞等起着支撑、修复、保护的作用。由于胶原蛋白具有良好的生物学特征，其在组织工程、临床医学、食品工业、包装材料、化妆品、医疗美容、生物材料以及医疗器械等方面都有广泛的应用。

重组胶原蛋白作为一种广泛应用的生物材料，其纯度和含量对研究成果和临床应用至关重要。而重组胶原蛋白的纯度及含量测定则成为了评价其质量的重要指标之一，用以确保产品的质量和安全性，为后续产品的生产和应用提供可靠的保障。2022年8月1号正式实施的《重组胶原蛋白》行业标准的鉴别项中推荐使用电泳法检测重组胶原蛋白的纯度，而毛细管电泳技术在多个领域均已取代传统电泳法进行蛋白的纯度分析，相比而言，毛细管电泳技术的优势是分离度高、定量准确性高、自动化程度高、重复性好。本文以一个高碱性的重组人源化胶原蛋白为例，使用SCIEX PA800 Plus药物分析系统与蛋白纯度分析试剂盒对其进行纯度分析（图1），该方法准确度高，重复性好，可作为重组胶原蛋白纯度鉴别的分析方法。



图1. PA800 Plus药物分析系统及蛋白纯度分析试剂盒

2、仪器与方法

2.1试剂

Sciex公司IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit（PN：A10663），该试剂盒内容见表1。碘乙酰胺（Sigma-Aldrich PN I1149）。

250 mM碘乙酰胺配置：称取碘乙酰胺46 mg，加入去离子水1 mL。盖紧瓶盖然后充分混匀直到完全溶解，尽快取用并避免光照。碘乙酰胺需用现配，避光保存。

表1. IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit

成分	规格
Gel Buffer, 专利配方, pH 8, 0.2% SDS	140mL
Sample Buffer-100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1%SDS	50mL
熔融石英毛细管, 50 μ m I.D.	-
IgG Control Standard	1 mL
Internal Standard, 10 kDa protein, 5 mg/mL	0.4 mL
酸性冲洗液, 0.1N HCl	100mL
碱性冲洗液, 0.1N NaOH	100mL

2.2 样品前处理

由于胶原蛋白中没有半胱氨酸，因此没有二硫键存在，本次实验中均用非还原方法(NR)处理样品。胶原蛋白浓度为10 mg/mL，且盐浓度小于50 mM,准备两个1.5 mL离心管，分别依次加入5 μ L碘乙酰胺溶液、90 μ L样品缓冲液（100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1%SDS），其中一个离心管加入10 μ L胶原蛋白溶液作为样品，另一个离心管加入10 μ L去离子水溶液作为空白对照。盖上瓶盖，充分混合后离心1 min。然后置于70 $^{\circ}$ C金属浴10 min。取出后冷却即可上机实验。

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	
1		Rinse - Pressure	70.0 psi	3.00 min	BI:D1	BO:D1	reverse, In / Out vial inc 8	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface - Automatic
2		Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:E1	BO:E1	reverse, In / Out vial inc 8	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface - Automat
3		Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:F1	BO:F1	reverse, In / Out vial inc 8	Water rinse to remove the acid residue - Automatic incr
4		Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	reverse, In / Out vial inc 8	SDS Gel rinse to fill the capillary with SDS gel - Automa
5		Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 8	ddH2O, use to clean capillary tip - Automatic increment
6		Wait		0.00 min	BI:A4	BO:A4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use to clean capillary tip - Automatic increment
7		Inject - Voltage	5.0 KV	20.0 sec	BI:C1	SO:A1	Override, normal polarity	Sample injection
8		Wait		0.00 min	BI:B4	BO:B4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use to avoid sample carry over - Automatic inc
9	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	15.00 min	BI:C1	BO:C1	1.00 Min ramp, normal polarity, both, In / Out vial inc 8	SDS Gel for separation - Automatic increment every 8 r
10	2.00	Autozero						
11								

图2. CE-SDS分离程序

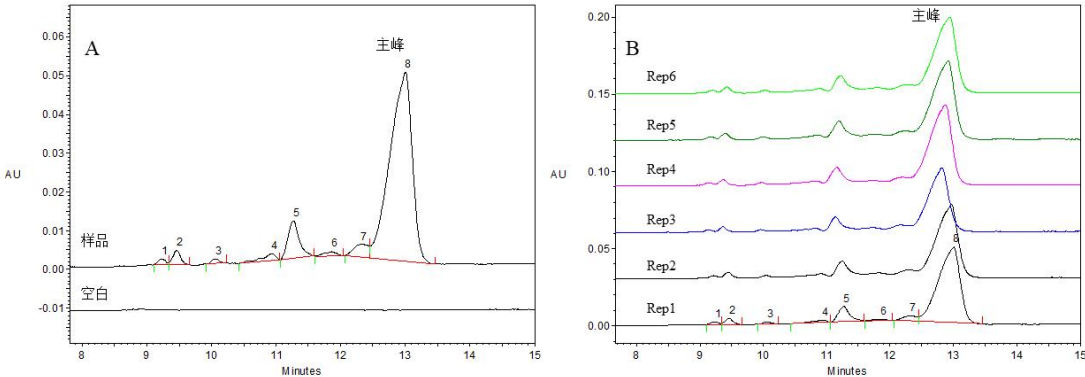


图3. CE-SDS方法下对胶原蛋白非还原样品的分析。A.样品分析电泳图，B.6针重复性考察电泳图（n=6）

2.3 仪器及方法

PA800 Plus药物分析系统；检测器：UV，214 nm，采集频率：4 Hz；样品室温度:25 ℃；毛细管温度：25 ℃；窗口狭缝：2号（100×200 μm）；毛细管：熔融石英毛细管，50 μm内径，20/30.2 cm有效长度/总长度。

使用CE-SDS方法对胶原蛋白及空白样品进行分析分离程序见图2。

3、分析与讨论

CE-SDS方法对胶原蛋白样品的分析见图3。使用碘乙酰胺进行样品非还原处理，图3A中显示，对比空白，共检测到8个峰，其中8号峰为主峰（胶原蛋白），其余均为分子量较小的片段杂质，胶原蛋白的含量为78.77%。；考察了方法的重复性，连续运行6针胶原蛋白-NR样品，叠加谱图见图3B。

CE-SDS方法下6针样品的迁移时间，校正峰面积百分比的重现

性数据见表2。主峰迁移时间 RSD < 0.6%，且第1针和6针主峰的绝对迁移时间仅相差0.17 min，校正峰面积百分比 RSD < 0.4%。

表2. CE-SDS分离方法下胶原蛋白-NR重复性数据统计（n=6）（MT: 迁移时间，min；CAP: 校正峰面积百分比，%）

Rep	MT主峰(min)	CAP主峰(%)
1	12.83	78.77
2	12.88	78.6
3	12.92	78.39
4	12.94	78.24
5	13	78.29
6	13	78.87
Average	12.93	78.53
RSD%	0.52%	0.33%

4、结论

本文方法使用CE-SDS方法对胶原蛋白纯度进行分析，分离时间仅需15 min/针，且连续6针样品采集结果显示各分析参数均具有良好的重现性。采集结果中主峰的迁移时间、校正峰面积百分比的RSD均小于0.6%。本方法准确度高，重复性好，可作为重组胶原蛋白纯度测定的分析方法。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-32737-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)