

# 毛细管等电聚焦电泳 ( CIEF ) 对重组胶原蛋白等电点的分析

## Analysis of isoelectric point of recombinant collagen by capillary isoelectric focusing electrophoresis (CIEF)

刘冬科, 高铁, 陈泓序, 郭立海

Liu Dongke, Gao Tie, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX, 中国

SCIEX, China

**Keywords:** CIEF; 重组胶原蛋白; 等电点

### 1. 前言

胶原蛋白是哺乳动物中含量最多的蛋白质, 约占蛋白总量的25-30%, 广泛分布于生物体软组织和硬结缔组织中, 如皮肤、骨骼、关节、眼睛等部位, 起到维持组织形态、修复损伤等作用, 在生物医用材料、功效护肤、保健食品等领域具有广泛的应用市场。与动物提取胶原蛋白相比, 重组胶原蛋白具有无病毒性隐患、优异的生物相容性和功效性、低免疫原性的特点。根据研究策略, 重组胶原蛋白可分为三类: 1. 重组人胶原蛋白: 表达人胶原蛋白特定型别基因编码的全长氨基酸序列, 有三螺旋结构; 2. 重组人源化胶原蛋白: 表达人胶原蛋白特定型别基因编码的全长或部分氨基酸序列片段, 或是含人胶原蛋白功能片段的组合; 3. 重组类胶原蛋白: 表达经设计、修饰后的特定基因编码的氨基酸序列或其片段, 或是这类功能性氨基酸序列片段的组合, 与人胶原蛋白氨基酸序列同源性低。

以上几类重组胶原蛋白氨基酸序列不同, 等电点并不完全一致。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, 规定等电点的检测可使用毛细管电泳法。本文以一个高碱性的重组人源化胶原蛋白为例, 使用毛细管等电聚焦电泳 ( CIEF ) 法测定其等电点, 该方法准确度高, 重复性好, 且对高pI的样品仍可准确测得其等电点, 可作为重组胶原蛋白等电点鉴别的分析方法。

### 2. 仪器及方法

PA800 Plus毛细管电泳仪; 检测器: UV, 214 nm, 采集频率:

4 Hz; 样品室温度:10 °C; 毛细管温度: 25 °C; 窗口狭缝: 2号 ( 100 × 200 μm ) ; 毛细管: 中性涂层毛细管 ( PN 477441 ), 50 μm 内径, 20/30.2 cm有效/总长。

PA 800 Plus进行胶原蛋白等电点分析的cIEF分离方法: 进样: 25 psi, 99 s; 聚焦 25 kV, 15 分钟; 化学迁移: 30 kV, 30 分钟。其他缓冲液托盘的放置及毛细管预冲洗、分离方法、关机方法请参考cIEF试剂盒说明书。

### 3. 试剂及样品

Advanced CIEF Starter KIT ( SCIEX PN A80976 ), 包含 CIEF Gel, CIEF Peptide Marker, 中性涂层毛细管。两性电解质 ( Pharmalyte 3-10 carrier ampholytes, GE Healthcare PN 17-0456-01 ), 阳极液 ( 200 mM磷酸, Sigma-Aldrich PN 345345 ), 阴极液 ( 300mM氢氧化钠, Sigma-Aldrich PN 72082 ), 化学迁移液 ( 350 mM醋酸, Sigma - Aldrich PN 537020 ), 阳极稳定液 ( 200mM亚氨基二乙酸, Sigma-Aldrich PN 220000 ), 阴极稳定液 ( 500 mM精氨酸, Sigma-Aldrich PN A5006 ), 尿素溶液 ( 4.3 M尿素, Sigma-Aldrich PN U0631 ), 3 M Urea-cIEF Gel。重组人源化胶原蛋白样品由某企业提供。

每个样品按照200 μL 3M Urea-cIEF胶、12 μL 3-10两性电解质、20 μL阴极稳定液、2 μL阳极稳定液、2 μL pI Marker ( 10.0, 9.5, 7.0 ) 的比例混合均匀后得预混液。取120 μL上述预混液与10 μL样品进行混合 ( 样品初始浓度10 mg/mL左右, 且盐浓度低于50 mM ), 得胶原蛋白样品。取120 μL预混液与10 μL水混合, 得空白样品。各取100 μL样品溶液至样品内插管内即可上机实验。

## 4. 结果与讨论

### 4.1 重组胶原蛋白最佳吸收波长

在 PDA 检测器下，以熔融石英毛细管为通道，以 50 psi，3 min 分别压力推注胶原蛋白溶液（10 mg/mL，以水溶解），检测其在 190-300 nm 的 UV 吸收光谱，结果见图 1，重组胶原蛋白呈现 190-230 nm 的末端吸收，在 280 nm 处无特征吸收。

### 4.2 重组胶原蛋白等电点检测

典型 CIEF 蛋白等电点分析是通过检测目标蛋白在 UV 280 nm 下的特征吸收来进行的。该波长下，蛋白峰不受两性电解质及其他试剂在 220 nm 末端吸收的干扰。但重组胶原蛋白主要由甘氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸组成，不含色氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸等的吡啶环结构，在 280 nm 波长下没有紫外吸收。

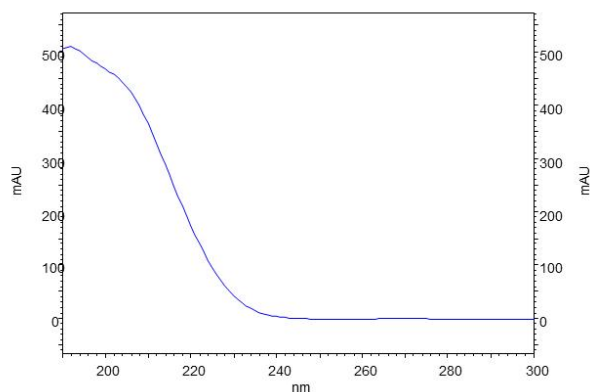


图1. 重组胶原蛋白溶液在190-300 nm的UV吸收光谱

因此，本实验将 CIEF 标准方法的 280 nm 检测波长改为 214 nm 进行胶原蛋白等电点的测定，结果见图 2，基线的波动来源于 214 nm 下样品中两性电解质等试剂的背景吸收，但通过与相应的空白对比，仍可定性样品出峰位置，并进行等电点计算。经计算，pI 10.0, 9.5, 7.0 三个 Marker 具有良好的线性，线性系数  $r=0.9995$ ，样品峰 pI 范围为 9.77-9.92，主峰 pI 值 9.92，与理论值（9.76）偏差为 1.7%。该检测结果具有较高的准确度。

### 4.3 重复性结果分析

将重组胶原蛋白样品重复进样 3 针，分别计算各自 pI 值并进行统计，结果见图 3、表 1，主峰 pI 平均值为 9.92，RSD 值为 0.05%，表明该方法具有良好的重复性。

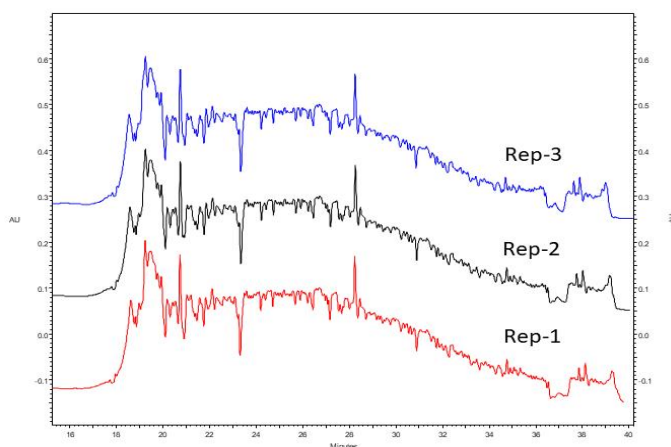


图3. 胶原蛋白样品重复性分析电泳叠加图

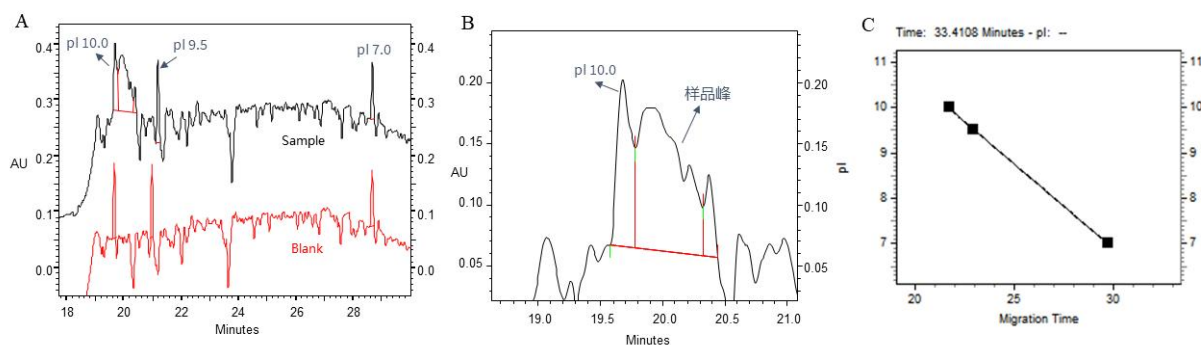


图2. 胶原蛋白样品等电点分析结果。（A：CIEF分析电泳图；B：样品峰放大图；C：pI Marker与迁移时间的线性曲线）

表1. 胶原蛋白样品pI值重复性统计

| 样品    | pI 范围     | 主峰pI值 | 主峰pI平均值 | 主峰pI值RSD |
|-------|-----------|-------|---------|----------|
| Rep-1 | 9.77~9.92 | 9.92  |         |          |
| Rep-2 | 9.77~9.92 | 9.92  | 9.92    | 0.05%    |
| Rep-3 | 9.78~9.93 | 9.93  |         |          |

## 5. 结论

本文使用CIEF方法在UV 214 nm下检测重组胶原蛋白的等电点，该方法准确度高，重复性好，且对高pI的样品仍可准确测得其等电点，可作为重组胶原蛋白等电点鉴别的分析方法。

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. RUO-MKT-02-15939-ZH-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](http://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](#)