

毛细管等电聚焦法（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)

兰朝辉，高铁，陈泓序，刘冰洁

Lan Zhaohui, Gao Tie, Chen Hongxu, Liu Bingjie

SCIEX, 中国

SCIEX, China

Key words: 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。毛细管等电聚焦法能够测得的等电点范围较大，可准确测得PI 3-10的样品等电点。本文以一个高碱性的重组人源化胶原蛋白（PI=10.20）为例，使用毛细管等电聚焦法（CIEF）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测定的分析方法。

2. 试剂耗材

2.1 试剂和样品

Advanced cIEF Starter KIT（SCIEX PN A80976），包含cIEF

Gel, cIEF Peptide Marker，中性涂层毛细管。其他试剂如下：两性电解质（Pharmalyte 3-10 carrier ampholytes，GE Healthcare PN 17-0456-01），阳极液（200.00 mM磷酸，Sigma-Aldrich PN 345345），阴极液（300.00 mM氢氧化钠，Sigma-Aldrich PN 72082），化学迁移液（350.00 mM醋酸，Sigma-Aldrich PN 537020），阳极稳定液（200.00mM亚氨基二乙酸，Sigma-Aldrich PN 220000），阴极稳定液（500.00 mM精氨酸，Sigma-Aldrich PN A5006），尿素溶液（4.30 M尿素，Sigma-Aldrich PN U0631）。重组胶原蛋白样品由某企业提供，样品原始浓度为5.00 mg/ml，（盐浓度<50.00mM）；理论等电点为10.20。

参考SCIEX毛细管等电聚焦分析试剂盒的说明书，根据重组胶原蛋白的理论等电点选择pI值为9.50、7.00和5.50的等电点标准品，配置可容纳多个样品的预混液，提高实验的重现性。如表1，再将10.00 μ L样品添加至一份预混液中，充分涡旋混合。

表1. 毛细管等电聚焦实验中样品预混液的配置

试剂	多个样品（n）所需体积（ μ L）
尿素胶	$200.00 \times (n+1)$
两性电解质	$12.00 \times (n+1)$
阴极稳定液	$20.00 \times (n+1)$
阳极稳定液	$2.00 \times (n+1)$
等电点标准品（9.50）	$2.00 \times (n+1)$
等电点标准品（7.00）	$2.00 \times (n+1)$
等电点标准品（5.50）	$2.00 \times (n+1)$

分析方法的时间程序见图1。

Instrument Setup								
Initial Conditions UV Detector Initial Conditions Time Program								
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	50.0 psi	3.00 min	BI:D1	BO:E1	forward, In / Out vial inc 6	Capillary Cleaning Solution Rinse
2		Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 6	Water Rinse
3		Inject - Pressure	25.0 psi	99.0 sec	SI:A1	BO:B1	Override, forward	Sample injection
4		Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 6	Water Dip
5	0.00	Separate - Voltage	25.0 kV	15.00 min	BI:C1	BO:C1	0.17 Min ramp, normal polarity, In / Out vial inc 6	Focusing Step
6	15.00	Separate - Voltage	30.0 kV	30.00 min	BI:C1	BO:D1	0.17 Min ramp, normal polarity, In / Out vial inc 6	Chemical Mobilization Step
7	45.00	Stop data						Stop cIEF Separation
8	45.10	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 6	Water rinse
9	47.20	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 6	Water Dip
10	47.30	End						Method End
11								

Apply

图1. cIEF实验分析方法的时间程序

3. 实验

3.1 仪器参数

仪器：SCIEX PA 800 Plus药物分析系统；毛细管：中性涂层毛细管，20/30.2 cm（有效/总长度）；毛细管温度：20℃；样品储存温度：10℃；进样条件：25 psi，99 s；聚焦条件：25 kV，15 min；迁移条件：30 kV，30 min；检测器及波长：紫外检测器（UV），280 nm。

4. 结果与讨论

4.1 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。重组胶原蛋白虽然不含色氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸等发色氨基酸，但是在cIEF实验中在280nm波长下也能检测到重组胶原蛋白的峰。因此，本实验在cIEF标准方法的280 nm检测波长下进行胶原蛋白等电点的测定，结果见图2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 9.50，7.00，5.50三个Marker具有良好的线性，样品峰 pI范围为9.80-10.21，主峰pI值10.21，与理论值（10.20）偏差为0.01个PI。该检测结果具有较高的准确度。

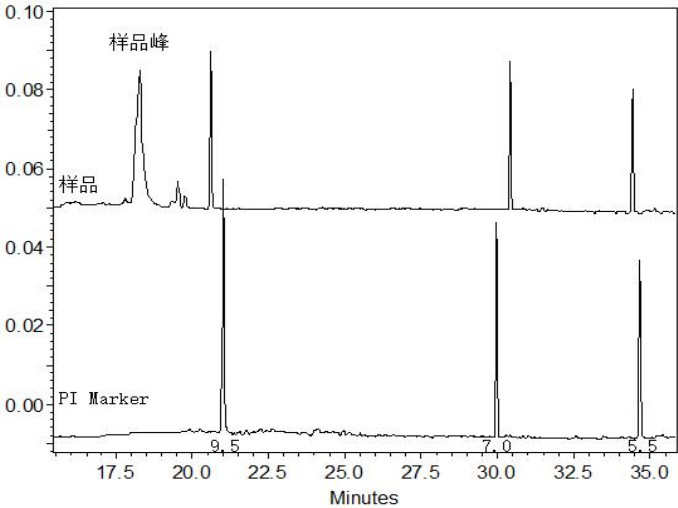


图2. 重组胶原蛋白等电点分析结果

4.2 方法重复性的考察

将重组胶原蛋白样品重复进7针，分别计算各自pI值并进行统计，结果见图3、表2，主峰pI平均值为10.20，RSD值为0.14%，表明该方法具有良好的重复性。

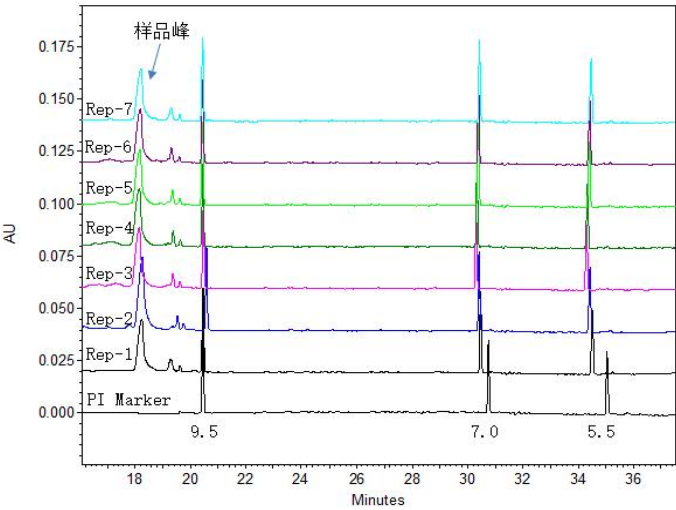


图3. 重组胶原蛋白7针重复性分析叠加图

表2. 重复性考察中等电点范围及主峰等电点的RSD值

样品	pI范围	主峰pI	主峰pI平均值	主峰pI RSD
Rep-1	9.80 ~ 10.21	10.21	10.20	0.14%
Rep-2	9.81 ~ 10.22	10.22		
Rep-3	9.80 ~ 10.21	10.21		
Rep-4	9.80 ~ 10.20	10.20		
Rep-5	9.82 ~ 10.21	10.21		
Rep-6	9.80 ~ 10.18	10.18		
Rep-7	9.80 ~ 10.19	10.19		

5. 结论

本文使用CIEF等电聚焦法检测重组胶原蛋白的等电点，（1）对高pI=10.20的样品仍可准确测得其等电点，（2）该方法测得的等电点准确：测得的样品实际等电点与理论等电点仅差0.01 pI；（3）该方法重复性好：7针重复性下主峰pI的RSD值< 0.2%；说明CIEF等电聚焦法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。

© 2025 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-34893-A



SCIEX中国
北京分公司
北京市昌平区生命科学园科学园路
18号院A座一层
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](#)