



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1805.2—2021

组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 第2部分：I型胶原蛋白分子量检测 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法

Tissue engineering medical device products—Collagen protein—
Part 2: Determination of molecular weight of type I collagen—
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

2021-09-06 发布

2022-09-01 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 原理 2

6 试剂及其配制 2

7 仪器和设备 2

8 操作方法 3

9 结果 4

10 可接受准则..... 5

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是 YY/T 1805《组织工程医疗器械产品 胶原蛋白》的第2部分。YY/T 1805 已经发布了以下部分：

——第2部分：I型胶原蛋白分子量检测 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会 (SAC/TC 110/SC 3)归口。

本文件起草单位：中国科学院过程工程研究所、四川省食品药品检验检测院、中国食品药品检定研究院。

本文件主要起草人：张贵锋、刘兴兰、高建萍、张乐、邢芳毓、胥彬、高小艳、范行良。

引 言

用于再生医疗的胶原蛋白类材料包括组织提取的胶原蛋白提取物和基因重组的胶原蛋白肽。其中, I 型胶原蛋白被广泛应用于各种医疗器械产品的研发。胶原蛋白类材料具有不同的特性, 如: 分子量的大小、纯度、种属及型别差异、三螺旋结构、细胞黏附特性等, 这些性能直接关系着胶原蛋白的质量和性能。“YY/T 1805 组织工程医疗器械产品 胶原蛋白”旨在建立胶原蛋白某些特殊性能的检测和表征方法, 拟由 4 个部分构成。

- 第 1 部分: 术语和定义。目的在于制定包括组织提取的胶原蛋白和基因重组胶原蛋白肽的各种术语和定义。
- 第 2 部分: I 型胶原蛋白分子量检测 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法。目的在于提供可用于胶原蛋白分子量检测的具体方法。
- 第 3 部分: 胶原蛋白含量检测 液相色谱-质谱法。目的在于给出可用于胶原蛋白含量的定量检测, 以及种属来源和型别鉴别的方法。
- 第 4 部分: 胶原蛋白三螺旋结构表征方法。目的在于建立胶原蛋白三螺旋结构的表征方法, 用于评价其三螺旋结构的有无及其完整性。

组织工程医疗器械产品 胶原蛋白

第2部分：I型胶原蛋白分子量检测

十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法

1 范围

本文件规定了用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定I型胶原蛋白分子量的方法。

本文件适用于组织提取的I型胶原蛋白(原材料)分子量的测定。

注：其他类型胶原蛋白或重组胶原蛋白，如果有对照品可参考本方法进行其分子量测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

YY/T 1453—2016 组织工程医疗器械产品 I型胶原蛋白表征方法

3 术语和定义

YY/T 1453—2016界定的及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE

一种变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳方法。根据大多数蛋白质都能与阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)按重量比结合成复合物，使所带负电荷远远超过天然蛋白质本身原有电荷，消除了不同蛋白质分子的电荷效应，使蛋白质按分子量大小分离。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Gly	甘氨酸(Glycine)；
HCl	盐酸(Hydrochloric acid)；
Marker	分子量标准品(Molecular weight standard)；
MBA	N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(N,N'-Methylenebisacrylamide)；
NaOH	氢氧化钠(Sodium hydroxide)；
SDS	十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate)；
TEMED	四甲基乙二胺(N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)；
Tris	三羟甲基氨基甲烷[Tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane]；
Tris-HCl	三羟甲基氨基甲烷盐酸[Tri(Hydroxymethyl) Amino Methane Hydrochloride]。

5 原理

SDS-PAGE 分离蛋白质的原理是根据大多数蛋白质都能与阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)按重量比结合成复合物,使所带负电荷远远超过天然蛋白质本身原有电荷,消除了不同蛋白质分子的电荷效应,使蛋白质按分子量大小分离。根据蛋白质分子量标准品在电泳中的迁移距离和其相对分子质量的对数值成正比的关系拟合标准曲线,根据样品的迁移率可计算出样品相对分子质量的近似值。

6 试剂及其配制

6.1 试剂要求

所用试剂均应符合以下要求:

- 所用试剂均为分析纯及以上;
- 纯化水电阻率不低于 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$;
- I 型胶原蛋白对照品建议用国家标准品;
- Marker 的分子量范围应涵盖供试品的分子量。

注:由于动物种属不同,其组织提取的胶原蛋白分子量存在差异,宜根据拟测试样品的动物种属不同选择相同种属动物组织来源的 I 型胶原蛋白对照品(如牛 I 型、猪 I 型)。

6.2 试剂及试剂配制

所用试剂均为分析纯,试剂配制方法如下:

- 30%丙烯酰胺(A液):精确称取丙烯酰胺 29.2 g 和 MBA 0.8 g 溶于 60 mL 水中,置 37°C 溶解,加水定容至 100 mL, $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 避光保存;
- 1 mol/L Tris-HCl 溶液(pH 6.8, B液):精确称取 Tris 12.1 g 加水溶解,用 HCl 调 pH 值至 6.8,加水定容至 100 mL, $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存;
- 1 mol/L Tris-HCl 溶液(pH 8.8, C液):精确称取 Tris 12.1 g,加水溶解,用 HCl 调 pH 值至 8.8,加水定容至 100 mL, $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存;
- 10%SDS 溶液(D液):精确称取 SDS 1.0 g 加水 5 mL 溶解,加水定容至 10 mL, $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存,一周内使用;
- 10%过硫酸铵(E液):精确称取过硫酸铵 1.0 g 加水 5 mL 溶解,加水定容至 10 mL,临用前配制;
- 甘氨酸电泳缓冲液(5×):精确称取 Tris 15.1 g, Gly 94.0 g, SDS 5.0 g,加水溶解,加水定容至 1 000 mL,室温保存,临用时做 5 倍稀释;
- SDS 样品缓冲液(5×):取 b)溶液 0.6 mL, d)溶液 2 mL, 溴酚蓝 0.01 g, 丙三醇 2.5 mL, 水 4.4 mL,临用前加 β -巯基乙醇 500 μL 混匀;
- 染色液:精确称取考马斯亮蓝 R-250 0.5 g,加入乙醇 225 mL、水 225 mL、冰醋酸 50 mL,混匀;
- 脱色液:量取乙醇 800 mL、水 100 mL、冰乙酸 100 mL 混匀。

注:以上试剂也可用市售成品。

7 仪器和设备

所用仪器和设备规格参照以下要求:

- a) 分析天平(0.000 1 g)；
- b) 电泳仪；
- c) 电泳槽；
- d) 微量注射器,5 μ L、10 μ L；
- e) 离心机；
- f) 水浴锅；
- g) 凝胶影像分析系统。

8 操作方法

8.1 样品变性处理

8.1.1 固体样品

称取供试品适量(胶原蛋白含量约 5 mg)加水 8 mL,SDS 样品缓冲液(5 $\times$)2 mL,混合后于 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 5 min~10 min 使蛋白质变性,离心(650 g,5 min~10 min)；

8.1.2 液体样品

取液体样品适量(胶原蛋白含量约 5 mg),加水至终体积为 8 mL,SDS 样品缓冲液(5 $\times$)2 mL,混合后于 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 5 min~10 min 使蛋白质变性,离心(650 g,5 min~10 min)。

注：如果样品溶解后的 pH 值非中性时需要在加 SDS 样品缓冲液之前用 NaOH 或 HCl 调整 pH 值至中性。

8.2 电泳凝胶制备

8.2.1 凝胶溶液组成

不同凝胶的组成见表 1。

表 1 凝胶溶液组成

试液	凝胶种类	
	分离胶溶液(7.5%)/mL	浓缩胶溶液(5%)/mL
水	2.82	2.1
A 液	1.5	0.5
C 液	2.28	—
B 液	—	0.38
D 液	0.06	0.03
E 液	0.06	0.03
TEMED	0.008	0.005
注：以上试剂也可用市售凝胶成品或凝胶溶液,凝胶中丙烯酰胺 5%~15%,分离胶和浓缩胶比例为推荐条件,可进行适当调整。		

8.2.2 分离胶制备

根据表 1 配制分离胶溶液,灌入凝胶板内至一定高度,加水封顶,室温下聚合(室温不同,聚合时间

不同)。

8.2.3 浓缩胶制备

根据表 1 配制浓缩胶溶液,待分离胶溶液聚合后,用滤纸吸取上面的水层,再灌入浓缩胶溶液(用前加 TEMED),插入样品梳,注意避免气泡出现。

8.3 加样

待浓缩胶溶液聚合后小心拔出样品梳,将电极缓冲液注满电泳槽的前后槽,在加样孔中加入蛋白 Marker 5 μL , I 型胶原蛋白对照品 10 μL 和待测样品 10 μL 。

8.4 电泳

将电泳缓冲液加入电泳槽内,安装好凝胶板,可采用恒压或者恒流电泳模式。参考电泳条件为:推荐采用恒压电泳,初始电压为 80 V,进入分离胶时调至 120 V~150 V;恒电流模式推荐条件为:以恒流 10 mA 条件下开始电泳,至供试品溶液进入分离胶后将电流调至 20 mA,直至电泳结束。

注:可根据不同电泳仪设置不同参数。电泳结束时电泳前沿不能离开分离胶。

8.5 染色

电泳完毕后取出胶片,置染色液中轻轻晃动条件下染色 1 h~2 h,或能看到蓝色清晰条带时取出。

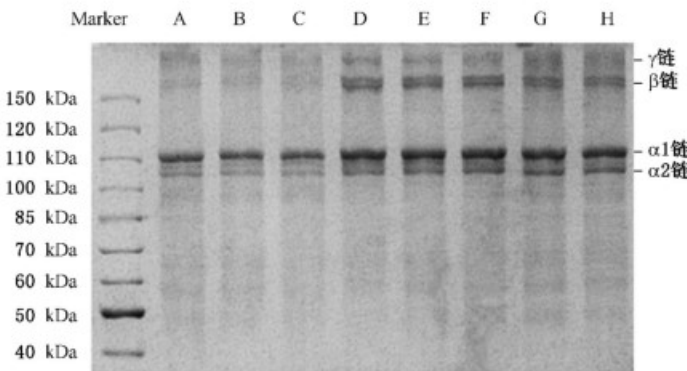
8.6 脱色

染色后的凝胶先用水冲洗表面的多余染料,再用脱色液浸泡脱色。更换脱色液,至凝胶背景透明为止。

9 结果

9.1 电泳图谱

利用凝胶电泳成像仪拍照,示意图见图 1。



条带序号说明:

A、B、C —— I 型胶原蛋白对照品,进样量 5 μL ;

D、E、F、G、H —— I 型胶原蛋白对照品,进样量 10 μL 。

图 1 I 型胶原蛋白对照品电泳图谱

9.2 分子量计算

a) 迁移率

用卡尺或用凝胶影像分析系统测量溴酚蓝指示剂和蛋白迁移距离。每条谱带距分离胶顶部的距离为迁移距离,将每条蛋白质谱带的迁移距离除以染料前沿的迁移距离,即为蛋白的相对迁移率。按式(1)计算迁移率:

$$R'_m = D_p / D_B \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

R'_m —— 相对迁移率;

D_p —— 蛋白迁移距离;

D_B —— 溴酚蓝指示剂迁移距离。

供试品主要成分迁移率应与 I 型胶原蛋白对照品迁移率一致。

注:凝胶胶片的厚度不一样,可能会导致条带的移行距离出现差异,建议胶的厚度为 1.0 mm~1.2 mm。

b) 标准曲线

以 R'_m 为横坐标,Marker 各条带相对分子量(kDa)的对数值为纵坐标,拟合线性回归方程,绘制标准曲线,给出标准曲线方程的公式(2)。

$$\log M = aR'_m + b, R^2 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$\log M$ —— 蛋白 Marker 分子量(kDa)的对数值;

a —— 常数;

b —— 常数;

R'_m —— 相对迁移率;

R^2 —— 标准曲线回归常数。

c) 分子量计算

将供试品蛋白相对迁移率代入公式计算,由 Marker 的标准曲线求得供试品的单个条带分子量;

I 型胶原蛋白分子量(kDa)按式(3)计算:

$$M = 2M_{\alpha 1} + M_{\alpha 2} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

M —— I 型胶原蛋白分子量;

$M_{\alpha 1}$ —— $\alpha 1$ 链分子量;

$M_{\alpha 2}$ —— $\alpha 2$ 链分子量。

示例:牛 I 型胶原蛋白完整全链长分子量约为 406.93 kDa~419.64 kDa,螺旋区分子量约为 282.76 kDa~293.80 kDa。

10 可接受准则

- 用于绘制标准曲线的 Marker,其电泳图谱应包括不少于 5 个条带,并应符合说明书提供的谱带图示,在泳道中从上至下的分布范围与其标准蛋白分子量一致;
- 待测样品的分子量应包含在分子量标准梯度范围内,电泳图谱应给出完整的分离胶图像及必要的浓缩胶图像;
- 标准曲线回归常数 $R^2 \geq 0.95$;
- 供试品主成分相对迁移率应与对照品相对迁移率一致,两者相对迁移率偏差应不超过 5%。

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
组织工程医疗器械产品 胶原蛋白
第 2 部分：I 型胶原蛋白分子量检测
十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法

YY/T 1805.2—2021

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2021 年 9 月第一版

*

书号: 155066 · 2-35900

版权专有 侵权必究



YY/T 1805.2—2021