



# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

## 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 electriophoresis

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2020-7-6)

在提交反馈意见时，请将你所知道的相关专利连同支持性文件一并附上，

并对“建议本标准自发布之日起 12 个月实施”反馈意见。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发布



## 目 次

目 次.....	I
前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语及其定义.....	1
4 原理.....	1
5 缩略语.....	1
6 试剂及其配制.....	1
7 仪器和设备.....	2
8 操作方法.....	2
9 结果计算.....	4
10 可接受准则.....	5

标准草案

(征求意见稿)

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准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/TC110/SC3）归口。

本标准起草单位：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。

本标准主要起草人：

# 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

本标准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。本标准适用于组织提取的 I 型胶原蛋白分子量的测定。

注：重组胶原蛋白肽可参考本方法进行其分子量测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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  
《中华人民共和国药典》。

## 3 术语及其定义

YY T 1453-2016 中的术语和定义适用于本文件。

## 4 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，形成复合物，使蛋白质分子所带的负电荷远远超过天然胶原蛋白分子的净电荷，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。

## 5 缩略语

- a) 三羟甲基氨基甲烷：Tris；
- b) 三羟甲基氨基甲烷盐酸：Tris-HCl；
- c) 十二烷基硫酸钠：SDS；
- d) 四甲基乙二胺：TEMED；
- e) 分子量标准品：Marker；
- f) 甘氨酸：Gly；
- g) 盐酸：HCl。

## 6 试剂及其配制

### 6.1 试剂要求

- a) 所用试剂均为分析纯及以上；

- b) 纯化水电阻率不低于 18.2 MΩ·cm;
- c) I 型胶原蛋白标准品建议用国家标准品;
- d) 分子量标准品的分子量范围应含盖供试品的分子量。

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 型胶原蛋白标准品（如牛 I 型、猪 I 型等）。

## 6.2 试剂及试剂配制

a) 30% 丙烯酰胺 (A 液)：精确称取丙烯酰胺 29.2 g 和 N,N-甲叉双丙烯酰胺 0.8 g 溶于 60 mL 水中，置 37 °C 溶解，加水定容至 100 mL，2 °C~8 °C 避光保存；

b) 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 0.1 mol/L HCl 调 pH 值至 6.8，加水定容至 100 mL，2 °C~8 °C 保存；

c) 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 0.1 mol/L HCl 调 pH 值至 8.8，加水定容至 100 mL，2 °C~8 °C 保存；

d) 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 °C~8 °C 保存，一周内使用；

e) 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；

f) 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；

g) 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；

h) 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；

i) 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

- a) 分析天平 (0.001 g)；
- b) 电泳仪；
- c) 电泳槽；
- d) 微量注射器，5 μL、10 μL；
- 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

称取供试品适量 (蛋白含量约 5 mg) 加水 8 mL，SDS 样品缓冲液 (5×) 2 mL，混合后于 100 °C 水浴中加热 5 min~10 min 使蛋白质变性，离心 (650 g，5 min~10 min)。

a) 固体样品：称取供试品适量 (蛋白含量约 5 mg) 加水 8 mL，SDS 样品缓冲液 (5×) 2 mL，混合后于 100 °C 水浴加热 5 min~10 min 使蛋白质变性，离心 (650 g，5 min~10 min)。

b) 液体样品：取液体样品适量（蛋白含量约5 mg），加水至终体积为8 mL，SDS样品缓冲液（5×）2 mL，混合后于100 °C水浴加热5 min ~10 min使蛋白质变性，离心（650 g，5 min ~10 min），加样体积10 μL。

注：如果样品溶解后的pH值非中性时需要在加热变性之前调整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 (mL)	凝胶种类	
	分离胶溶液 (7.5%)	浓缩胶溶液 (5%)
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

### 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分子量标准品5 μL，I型胶原蛋白标准品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。

注：可根据不同电泳仪设置不同参数。

## 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~2h。

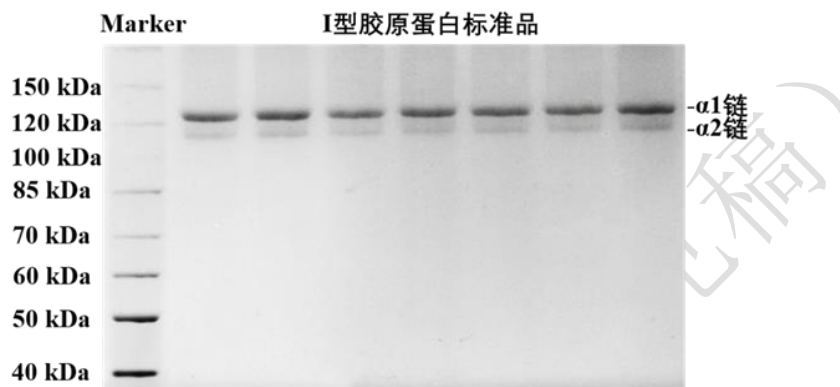
### 8.6 脱色

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。见示图1。



示图1 I型胶原蛋白电泳图谱

### 9.1 分子量计算

#### a) 迁移速率

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。按下式计算迁移速率：

$$\text{相对迁移速率} (R'_m) = \frac{\text{蛋白质迁移距离}}{\text{脱色后胶条长度}} \times \frac{\text{脱色前胶条长度}}{\text{溴酚蓝指示剂迁移距离}} \dots\dots\dots(1)$$

供试品主要成分迁移率应与 I 型胶原蛋白标准品迁移率一致。

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。

#### a) 标准曲线

以  $R'_m$  为横坐标，分子量标准蛋白各条带相对分子量的对数值为纵坐标，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。

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

式中，

$\log M$  ——蛋白分子量标准品的对数值；

$a$  ——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，由分子量标准蛋白的标准曲线求得供试品的单个条带分子量；



I型胶原蛋白分子量按下式计算：

$$\text{I型胶原分子量} = 2 \times \alpha 1 \text{链分子量} + \alpha 2 \text{链分子量} \dots \dots \dots (3)$$

#### 10 可接受准则

a) 用于绘制标准曲线的分子量标准品，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；

b) 标准曲线回归常数 $R^2 \geq 0.95$ 。

---

标准草案 (征求意见稿)