



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—201×

动物源性 I 型胶原蛋白成分测定 聚丙烯酰胺凝胶电泳法

Determination of animal type I collagen—
Polyacrylamide gel electrophoresis

201×-××-×× 发布

201×-××-×× 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：中国科学院烟台海岸带研究所、中国标准化研究院、上海海洋大学、中国海洋大学、山东弘博标准化服务事务所、中国科学院过程工程研究所。

本标准主要起草人：秦松、李杰、吴文惠、侯虎、马爱进、崔玉琳、陈军、韩春梅、黄永东。

动物源性 I 型胶原蛋白成分测定

聚丙烯酰胺凝胶电泳法

1 范围

本标准规定了用聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)测定动物源性 I 型胶原蛋白成分的方法。
本标准适用于动物源性胶原蛋白产品中 I 型胶原蛋白成分的测定。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

中华人民共和国药典(2015 年版)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

胶原蛋白 collagen

以纯化的(非交联的) I 型胶原蛋白为原料制备的左手螺旋的重复 Gly-X-Y 序列的 3 条肽链相互盘绕成右手超螺旋结构特征的结构蛋白。

注: Gly 是甘氨酸, X 通常是脯氨酸, Y 通常是羟脯氨酸或羟赖氨酸。

3.2

I 型胶原蛋白 type I collagen

由 2 条 $\alpha 1$ 链和 1 条 $\alpha 2$ 肽链组成的具有完整三螺旋结构的胶原蛋白。

4 原理

利用 I 型胶原蛋白具有其他蛋白质所没有的三股螺旋结构,配合特异性的胶原酶作用,通过考马斯亮蓝对牛血清白蛋白(BSA)染色极限的确定,利用 SDS-PAGE 法测定 I 型胶原蛋白的成分。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水

应符合 GB/T 6682 中的一级水规定。

5.2 20 mmol/L 磷酸二氢钠溶液, pH 7.4

称取无水磷酸二氢钠 0.54 g,加水、搅拌、定容至 1 L。测试 pH 值,微调至 pH 7.4 即可。

5.3 3%(体积分数)的乙酸溶液

量取 3 mL 的冰乙酸,注入 50.00 mL 水中,定容至 100.00 mL,混匀。

5.4 0.5 mg/mL 的盐酸溶液

取 1 mol/L 盐酸溶液 65.00 mL,加水定容至 1 000 mL。

5.5 胃蛋白酶溶液

用 20 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(pH 7.4,内含 0.1 mmol/L 氯化钙)溶解胃蛋白酶,配成含适当活性单位的胃蛋白酶溶液(例如 1.25 Unit/mL)。

5.6 胶原酶溶液

用 20 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(pH 7.4,内含 0.1 mmol/L 氯化钙)溶解胶原酶,配成含适当活性单位的胶原酶溶液(例如 1.25 Unit/mL)。

5.7 牛血清白蛋白(BSA)溶液

用水将 BSA 稀释成梯度浓度,浓度在 0.001 mg/mL~0.025 mg/mL。

5.8 1 mg/mL I 型胶原蛋白标准溶液

用 3%的乙酸将 I 型胶原蛋白标准品(Sigma-Aldrich,纯度≥99%)稀释成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液。

5.9 1 mol/L 浓缩胶缓冲液贮备液,pH 6.8

称取 6.06 g 三羟甲基氨基甲烷,加适量水溶解,用 0.5 mg/mL 的盐酸溶液调节 pH 值至 6.8,用水定容至 50.00 mL,4 ℃下保存。

5.10 1.5 mol/L 分离胶缓冲液贮备液,pH 为 8.8

取 9.08 g 三羟甲基氨基甲烷,加适量水溶解,用 0.5 mg/mL 的盐酸溶液调节 pH 值至 8.8,用水定容至 50.00 mL,4 ℃下保存。

5.11 电泳缓冲液(5×),pH 8.3

称取 15.1 g 三羟甲基氨基甲烷,72.0 g 甘氨酸,加入十二烷基磺酸钠 5 g,溶解,用盐酸调 pH 值至 8.3,加水定容至 1 000.00 mL,使用前稀释 5 倍。

5.12 样品缓冲液(5×)

取 5 mL 1 mol/L 浓缩胶(pH 6.8)缓冲液贮备液、2 g SDS、1.2 mL β-巯基乙醇、8 mL 甘油、0.02 g 溴酚蓝加入水中溶解,加水定容至 40 mL。

5.13 1.00 g/L 考马斯亮蓝染色液

称取 1.00 g 考马斯亮蓝 R-250,分别加入 450.00 mL 甲醇、100.00 mL 冰醋酸、450.00 mL 蒸馏水。

5.14 考马斯亮蓝脱色液

量取 400 mL 甲醇、100 mL 冰醋酸、500 mL 蒸馏水,配制成 1 L 的脱色液。

6 仪器设备

- 6.1 分析天平:感量 0.000 1 g。
- 6.2 冷冻离心机:12 000 r/min,4 ℃。
- 6.3 磁力搅拌器。
- 6.4 具塞离心试管。
- 6.5 电泳仪。
- 6.6 凝胶成像系统。

7 测定步骤

7.1 试样制备

7.1.1 液体样品

取 10 mL 样品,4 ℃磁力搅拌 4 h,形成匀浆,10 000 r/min 离心 30 min,上清液即为酸溶性胶原蛋白。随后,用 3%的乙酸将酸溶性胶原蛋白稀释成体积浓度为 1%的溶液。

7.1.2 固体样品

称取 1 g 样品,精确到 0.1 mg,加适量 3%的乙酸溶解,封口后于 4 ℃磁力搅拌器搅拌 4 h,定容至 10 mL,再按液体样品操作。

7.2 I 型胶原蛋白的鉴别

7.2.1 热处理

将 7.1 制备的溶液平均分成两组,每组两只试管。一组暂不做处理,称 A 管,另一组于 60 ℃水浴中加热 30 min,迅速冷却,称为 B 管。将两组样品中分别加入胃蛋白酶溶液,在 10 ℃下消解 24 h。取 A、B 管反应液,加入 5×样品缓冲液至终浓度为 1×,沸水浴加热 3 min~5 min,制备电泳样品。

7.2.2 电泳

按《中华人民共和国药典》(2015 年版)0541 电泳法第四法规定的方法进行,比较待测样品、I 型胶原蛋白标准品经过电泳分析后的条带。

7.2.3 结果分析

待凝胶完全透明后使用凝胶成像系统对凝胶进行扫描分析,转换成电子数据后再进行进一步处理。A、B 两组样品,经过电泳之后,如果 A 组蛋白没有分子质量小于 100 000 g/mol 以下的肽链,而 B 组样品中有分子质量小于 100 000 g/mol 以下的肽链出现,则可判定为此胶原蛋白具有完整的三螺旋结构;如果 A、B 两组蛋白均有分子质量小于 100 000 g/mol 以下的肽链出现,则可判定为此 I 型胶原蛋白三螺旋结构保留不完整。

7.3 I 型胶原蛋白成分的测定

7.3.1 考马斯亮蓝对 BSA 的染色极限分析

取各浓度 BSA 溶液 20 μL 上样。按照《中华人民共和国药典》(2015 年版)0541 电泳法第四法规定的方法进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后用凝胶成像系统对脱色后的胶片进行分析,确定考马斯亮蓝对 BSA 的染色极限。

7.3.2 样品中 I 型胶原蛋白成分测定

样品 a:用 3%的乙酸溶解样品,使样品浓度为 1 mg/mL;

样品 b:用胶原酶溶液溶解样品,配制成样品浓度和样品 a 相同,于 37 ℃水浴中加热 4 h。

样品 c:取超纯水加胶原酶溶液,使胶原酶的浓度与样品 b 的浓度相同。

上样分析:将上述样品置于 100 ℃水浴中 1 min~2 min,取出进行 SDS-PAGE 电泳。待测样品、BSA (取染色极限量)和分子量标准品上样体积均为 20 μL,电泳电压 110 V。电泳结束后用凝胶成像系统对脱色后的胶片进行分析,记录条带光密度。

8 结果计算

8.1 当样品 b 中所有条带光密度之和与样品 c 中所有条带光密度之和不相同,按式(1)计算:

$$X = A - (B - C) \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——待测样品中 I 型胶原蛋白成分,%;

A ——样品 a 中所有条带光密度之和,%;

B ——样品 b 中所有条带光密度之和,%;

C ——样品 c 中所有条带光密度之和,%。

8.2 当样品 b 中所有条带光密度之和与样品 c 中所有条带光密度之和相同时,按式(2)计算:

$$X = \frac{10\,000 - M}{10\,000} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X ——待测样品中 I 型胶原蛋白成分,%;

M ——BSA 极限值。

9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。
