

0541 电泳法

电泳是指溶解或悬浮于电解液中的带电荷的蛋白质、胶体、大分子或其他粒子，在电流作用下向其自身所带电荷相反的电极方向迁移。电泳法是指利用溶液中带有不同量电荷的阳离子或阴离子，在外加电场中使供试品组分以不同的迁移速度向对应的电极移动，实现分离并通过适宜的检测方法记录或计算，达到测定目的的分析方法。电泳法一般可分为两大类：一类为自由溶液电泳或移动界面电泳，另一类为区带电泳。

移动界面电泳是指不含支持物的电泳，溶质在自由溶液中泳动，故也称自由溶液电泳，适用于高分子的检测。区带电泳是指含有支持介质的电泳，带电荷的供试品(如蛋白质、核苷酸等大分子或其他粒子)在惰性支持介质(如纸、醋酸纤维素、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等)中，在电场的作用下，向其极性相反的电极方向按各自的速度进行泳动，使组分分离成狭窄的区带。区带电泳法可选用不同的支持介质，并用适宜的检测方法记录供试品组分电泳区带图谱，以计算其含量(%)。除另有规定外，各不同支持介质的区带电泳法，照下述方法操作。采用全自动电泳仪操作时，参考仪器使用说明书进行；采用预制胶的电泳时，参考各电泳仪标准操作规程进行；结果判断采用自动扫描仪或凝胶成像仪时，参考仪器使用说明书进行。

第一法 纸电泳法

纸电泳法以色谱滤纸作为支持介质。介质孔径大，没有分子筛效应，主要凭借被分离物中各组分所带电荷量的差异进行分离，适用于检测核苷酸等性质相似的物质。

(一) 仪器装置

包括电泳室及直流电源两部分。

常用的水平式电泳室装置如图，包括两个电泳槽 A 和一个可以密封的玻璃（或相应材料）盖 B；两侧的电泳槽均用有机玻璃（或相应材料）板 C 分成两部分；外格装有铂电极（直径 0.5~0.8cm）D；里格为可放滤纸 E 的有机玻璃电泳槽架 F，此架可从槽中取出；两侧电泳槽 A 内的铂电极 D 经隔离导线穿过槽壁与电泳仪外接电源相连。

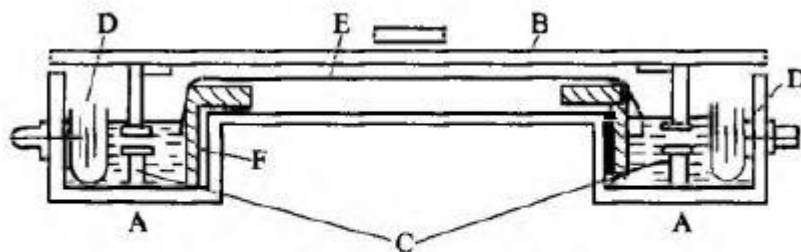


图 水平式电泳室装置

电源为具有稳压器的直流电源，常压电泳一般在 100~500V，高压电泳一般在 500~10

000V。

(二) 测定法

1. **电泳缓冲液** 枸橼酸盐缓冲液 (pH3.0)：取枸橼酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 39.04g 与枸橼酸钠 ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) 4.12g，加水 4000ml，使溶解。

2. **滤纸** 取色谱滤纸置 1mol/L 甲酸溶液中浸泡不少于 12 小时，取出，用水漂洗至洗液的 pH 值不低于 4，置 60℃ 烘箱烘干，备用。可裁成长 27cm、宽 18cm 的滤纸，或根据电泳室的大小裁剪，并在距底边 5~8cm 处划一起始线，每隔 2.5~3cm 做一点样记号。

3. **点样** 有湿点法和干点法。湿点法是将裁好的滤纸全部浸入枸橼酸盐缓冲液 (pH3.0) 中，湿润后，取出，用滤纸吸干多余的缓冲液，置电泳槽架上，使起始线靠近负极端，将滤纸两端浸入缓冲液中，然后用微量注射器精密点加供试品溶液，每点 10 μ l，共 3 点，并留 2 个空白位置。

干点法是将供试品溶液点于滤纸上，吹干，再点，反复数次，直至点完规定量的供试品溶液，然后将电泳缓冲液用喷雾器喷湿滤纸，点样处最后喷湿，本法适用于浓度低的供试品溶液。

4. **电泳** 于电泳槽中加入适量电泳缓冲液，浸没铂电极，接通电泳仪稳压电源，电压梯度调整为 18~20V/cm，电泳约 1 小时 45 分钟，取出，立即吹干，置紫外光灯 (254nm) 下检视，用铅笔划出紫色斑点的位置。

5. **含量测定** 剪下供试品斑点以及与斑点位置面积相近的空白滤纸，剪成细条，分别置试管中，各精密加入 0.01mol/L 盐酸溶液 5ml，摇匀，放置 1 小时，用 3 号垂熔玻璃漏斗滤过，也可用自然沉降或离心法倾取上清液，按各品种项下的规定测定滤纸或上清液的吸光度，并计算含量。

第二法 醋酸纤维素薄膜电泳法

醋酸纤维素薄膜电泳法以醋酸纤维素薄膜作为支持介质。介质孔径大，没有分子筛效应，主要凭借被分离物中各组分所带电荷量的差异进行分离，适用于血清蛋白、免疫球蛋白、脂蛋白、糖蛋白、类固醇激素及同工酶等的检测。

(一) 仪器装置

电泳室及直流电源同纸电泳。

(二) 试剂

(1) 巴比妥缓冲液 (pH8.6) 取巴比妥 2.76g、巴比妥钠 15.45g，加水溶解使成 1000ml。

(2) 染色液 常用的有以下几种，可根据需要，按各品种项下要求使用

① 氨基黑染色液 取 0.5g 的氨基黑 10B，溶于甲醇 50ml、冰醋酸 10ml 及水 40ml 的混合液中。

② 丽春红染色液 取丽春红 9.04g、三氯醋酸 6g，用水溶解并稀释至 100ml。

③ 含有醋酸的丽春红染色液 取丽春红 0.1g，醋酸 5ml，用水制成 100ml 的溶液。4℃ 保存。

④ 含有三氯醋酸和 5-磺基水杨酸的丽春红染色液 取丽春红 2g，三氯醋酸 30g，5-磺基水杨酸 30g，用水溶解并稀释至 100ml。

(3) 脱色液 取乙醇 45ml、冰醋酸 5ml 及水 50ml，混匀。

(4) 透明液 取冰醋酸 25ml, 加无水乙醇 75ml, 混匀。

(三) 测定法

(1) 醋酸纤维素薄膜 取醋酸纤维素薄膜, 裁成 2cm×8cm 的膜条, 将无光泽面向下, 浸入巴比妥缓冲液 (pH8.6) 中, 待完全浸透, 取出夹于滤纸中, 轻轻吸去多余的缓冲液后, 将膜条无光泽面向上, 置电泳槽架上, 经滤纸桥浸入巴比妥缓冲液 (pH8.6) 中。

(2) 点样与电泳 于膜条上距负极端 2cm 处, 条状滴加蛋白质含量约 5% 的供试品溶液 2~3 μ l, 一般应在 10~12V/cm 稳压或 0.4~0.6mA/cm[总电流=电流(mA/cm)×每条膜的宽度(cm)×膜条数]稳流条件下电泳至区带距离以 4~5cm 为宜

(3) 染色 电泳完毕, 将膜条取下浸于氨基黑或丽春红染色液中, 2~3 分钟后, 用脱色液浸洗数次, 直至脱去底色为止。

(4) 透明 将洗净并完全干燥后的膜条浸于透明液中, 一般浸泡 10~15 分钟, 待全部浸透后, 取出平铺于洁净的玻板上, 干后即成透明薄膜, 可用于与于相对含量、纯度测定和作标本长期保存。

(5) 含量测定 未经透明处理的醋酸纤维素薄膜电泳图可按各品种项下规定的方法测定, 一般采用洗脱法或扫描法, 测定各蛋白质组分的相对含量 (%)。

洗脱法 将洗净的膜条用滤纸吸干, 剪下供试品溶液各电泳图谱的电泳区带, 分别浸于 1.6% 的氢氧化钠溶液中, 振摇数次, 至洗脱完全, 照紫外-可见分光光度法(附录 0401), 在各品种项下规定的检测波长处测定洗脱液的吸光度。同时剪取与供试品膜条相应的无蛋白质部位, 同法操作作为空白对照。先计算吸光度总和, 再计算各蛋白质组分所占比率 (%)。

扫描法 将干燥的醋酸纤维素薄膜用薄层色谱扫描仪采用反射(未透明薄膜)或透射(已透明薄膜)方式在记录器上自动绘出各蛋白组分曲线图, 横坐标为膜条的长度, 纵坐标为吸光度, 计算各蛋白质组分的含量 (%)。亦可用微机处理积分计算。

第三法 琼脂糖凝胶电泳法

琼脂糖凝胶电泳法以琼脂糖作为支持介质。琼脂糖是由琼脂分离制备的链状多糖。其结构单元是 D-半乳糖和 3, 6-脱水-L-半乳糖。许多琼脂糖链互相盘绕形成绳状琼脂糖束, 构成大网孔型的凝胶。这种网络结构具有分子筛作用, 使带电颗粒的分离不仅依赖净电荷的性质和数量。还可凭借分子大小进一步分离, 从而提高了分辨能力。本法适用于免疫复合物、核酸与核蛋白等的分离、鉴定与纯化。

DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时有电荷效应和分子筛效应。DNA 分子在高于等电点的 pH 溶液中带负电荷, 在电场中向正极移动。由于糖-磷酸骨架在结构上的重复性质, 相同数量的双链 DNA 几乎具有等量的净电荷, 因此它们能以同样的速率向正极方向移动。在一定浓度的琼脂糖凝胶介质中, DNA 分子的电泳迁移率与其分子量的常用对数成反比; 分子构型也对迁移率有影响, 如共价闭环 DNA>直线 DNA>开环双链 DNA。适用于检测 DNA, PCR 反应中的电泳检测, 方法见各品种项下。

方法 1

1. 仪器装置 电泳室及直流电源同第一法纸电泳。

2. 试剂

(1) 醋酸-锂盐缓冲液 (pH3.0) 取冰醋酸 50ml, 加水 800ml 混合后, 再加氢氧化锂

固体适量调节 pH 值至 3.0, 再加水至 1000ml。

(2) 甲苯胺蓝溶液 取甲苯胺蓝 0.1g, 加水 100ml 使溶解。

3. 测定法

(1) 制胶 取琼脂糖约 0.2g, 加水 10ml, 置水浴中加热使溶胀完全, 加温热的醋酸-锂盐缓冲液 (pH3.0) 10ml, 混匀, 趁热将胶液涂布于大小适宜 (2.5cm×7.5cm 或 4cm×9cm) 的水平玻璃板上, 涂层厚度约 3mm, 静置, 待凝胶结成无气泡的均匀薄层, 即得。

(2) 对照品溶液及供试品溶液的制备 照各品种项下规定配制。

(3) 点样与电泳 在电泳槽内加入醋酸-锂盐缓冲液 (pH3.0), 将凝胶板置于电泳槽架上, 经滤纸桥与缓冲液接触。于凝胶板负极端分别点样 1 μ l, 立即接通电源, 在电压梯度约 30V/cm、电流强度 1~2mA/cm 的条件下, 电泳约 20 分钟, 关闭电源。

(4) 染色与脱色 取下凝胶板, 用甲苯胺蓝溶液染色, 用水洗去多余的染色液至背景无色为止。

方法 2

1. 仪器装置 电泳室及直流电源同第一法纸电泳。

2. 试剂

(1) 巴比妥缓冲液 (pH8.6) 称取巴比妥 4.14g、巴比妥钠 23.18g, 加水适量, 加热使之溶解, 放冷至室温, 再加叠氮钠 0.15g, 溶解后, 加水稀释至 1500ml。

(2) 1.5% 琼脂糖溶液 称取琼脂糖 1.5g, 加水 50ml 和巴比妥缓冲液 (pH8.6) 50ml, 加热使完全溶胀。

(3) 0.5% 氨基黑溶液 称取氨基黑 10B 0.5g, 溶于甲醇 50ml、冰醋酸 10ml 及水 40ml 的混合液中。

(4) 脱色液 量取乙醇 45ml、冰醋酸 5ml 及水 50ml, 混匀。

(5) 溴酚蓝指示液 称取溴酚蓝 50mg, 加水使之溶解, 并稀释至 100ml。

3. 测定法

(1) 制胶 取上述 1.5% 的琼脂糖溶液, 趁热将胶液涂布于大小适宜的水平玻璃板上, 涂层厚度约 3mm, 静置, 待凝胶凝固成无气泡的均匀薄层, 即得。

(2) 对照品和供试品溶液

对照品 正常人血清或其他适宜的对照品。

供试品溶液的制备 用生理氯化钠溶液将供试品稀释成蛋白质浓度为 1%~2% 的溶液。

(3) 点样与电泳 在电泳槽内加入巴比妥缓冲液 (pH8.6); 于琼脂糖凝胶板负极端的 1/3 处打孔, 孔径 2~3mm, 置于电泳槽架上, 经 3 层滤纸搭桥与巴比妥缓冲液 (pH8.6) 接触。测定孔加适量供试品溶液和 1 滴溴酚蓝指示液, 对照孔加适量对照品及 1 滴溴酚蓝指示液。100V 恒压条件下电泳 2 小时 (指示剂迁移到前沿), 关闭电源。

(4) 染色与脱色 取下凝胶板, 用 0.5% 氨基黑溶液染色, 再用脱色液脱色至背景无色。

第四法 聚丙烯酰胺凝胶电泳法

聚丙烯酰胺凝胶电泳法以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质。聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺单体和少量的交联剂甲叉双丙烯酰胺, 在催化剂作用下聚合交联而成的三维网状结构的凝胶。单体的浓度或单体与交联剂比例的不同, 其凝胶孔径就不同。使用聚丙烯酰胺凝胶作为

支持介质进行电泳，生物大分子保持天然状态，其迁移速率不仅取决于电荷密度，还取决于分子大小和形状。可以用来研究生物大分子的特性，如电荷、分子量、等电点等。根据仪器装置的不同分为水平平板电泳、垂直平板电泳和盘状电泳。根据制胶方式的不同又可分为连续电泳和不连续电泳。

(一) 仪器装置

通常由稳流电泳仪和圆盘电泳槽或平板电泳槽组成。其电泳室有上、下两槽，每个槽中都有固定的铂电极，铂电极经隔离电线接于电泳仪稳流挡上。使用垂直平板电泳槽的测定法参见第五法 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法^①，使用圆盘电泳槽方法如下。

(二) 试剂

(1) 溶液 A 取三羟甲基氨基甲烷 36.6g、四甲基乙二胺 0.23ml，加 1mol/L 盐酸溶液 48ml，再加水溶解并稀释至 100ml，置棕色瓶内，在冰箱中保存。

(2) 溶液 B 取丙烯酰胺 30.0g、次甲基双丙烯酰胺 0.74g，加水溶解并稀释至 100ml，滤过，置棕色瓶内，在冰箱中保存。

(3) 电极缓冲液 (pH8.3) 取三羟甲基氨基甲烷 6g、甘氨酸 28.8g，加水溶解并稀释至 1000ml，置冰箱中保存，用前稀释 10 倍。

(4) 溴酚蓝指示液 取溴酚蓝 0.1g，加 0.05mol/L 氢氧化钠溶液 3.0ml 与 90%乙醇 5ml，微热使溶解，加 20%乙醇制成 250ml。

(5) 染色液 取 0.25% (g/ml) 考马斯亮蓝 G250 溶液 2.5ml，加 12.5% (g/ml) 三氯醋酸溶液至 10ml。

(6) 稀染色液 取上述染色液 2ml，加 12.5% (g/ml) 三氯醋酸溶液至 10ml。

(7) 脱色液 7%醋酸溶液。

(三) 测定法

(1) 制胶 取溶液 A 2ml，溶液 B 5.4ml，加脲 2.9g 使溶解，再加水 4ml，混匀，抽气赶去溶液中气泡，加 0.56%过硫酸铵溶液 2ml，混匀制成胶液，立即用装有长针头的注射器或细滴管将胶液沿管壁加至底端有橡皮塞的小玻璃管 (10cm×0.5cm) 中，使胶层高度达 6~7cm，然后徐徐滴加水少量，使覆盖胶面，管底气泡必须赶走，静置约 30 分钟，待出现明显界面时即聚合完毕，吸去水层。

(2) 对照品/分子量标准品溶液及供试品溶液的制备 照各品种项下的规定。

(3) 电泳 将已制好的凝胶玻璃管装入圆盘电泳槽内，每管加供试品或对照品/标准品溶液 50~100 μ l，为防止扩散可加甘油或 40%蔗糖溶液 1~2 滴及 0.04%溴酚蓝指示液 1 滴，也可直接在上槽缓冲液中加入 0.04%溴酚蓝指示液数滴，玻璃管的上部用缓冲液充满，上端接负极，下端接正极。调节起始电流使每管为 1mA，数分钟后，加大电流使每管为 2~3mA，当溴酚蓝指示液移至距玻璃管底部 1cm 处，关闭电源。

(4) 染色和脱色 电泳完毕，用装有长针头并吸满水的注射器，自胶管底部沿胶管壁将水压入，胶条即从管内滑出，将胶条浸入稀染色液 10~12 小时或用染色液浸泡 10~30 分钟，以水漂洗干净，再用脱色液脱色至无蛋白区带凝胶的底色透明为止。

(四) 结果判断

将胶条置灯下观察，根据供试品与对照品/标准品的色带位置和色泽深浅程度进行判断。

(1) 相对迁移率 供试品和对照品/标准品的电泳区带有时可用相对迁移率 (R'_m) 进行比较。其计算式如下:

$$\text{相对迁移率 } (R'_m) = \frac{\text{进胶端到供试品或对照品/标准品区带的距离}}{\text{进胶端到溴酚蓝区带的距离}}$$

(2) 扫描 将清晰的胶条置双波长薄层扫描仪或凝胶电泳扫描仪中扫描并积分, 由各组分的峰面积计算含量 (%)。

第五法 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE 法)

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳-PAGE 法是一种变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳方法。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳本法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, 使蛋白质分子所带的负电荷远远超过天然蛋白质分子的净电荷, 消除了不同蛋白质分子的电荷效应, 使蛋白质按分子大小分离。

(一) 仪器装置

恒压或恒流电源、垂直板或圆盘电泳槽和制胶模具。

(二) 试剂

(1) 水 (~~电阻率不低手 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$~~)。

(2) 分离胶缓冲液 (4 \times , A 液) A 液 1.5mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 称取三羟甲基氨基甲烷 18.15g, 加适量水溶解, 用盐酸调 pH 至 8.8, 加水稀释至 100ml。

(3) 30% 丙烯酰胺溶液 (B 液) B 液 ~~30% 丙烯酰胺-0.8% N, N'-亚甲基双丙烯酰胺溶液~~ 称取丙烯酰胺 58.0g、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 2.0g, 加温水溶解并稀释至 200ml, 滤纸过滤 (避光保存)。

(4) ~~C 液 1% 十二烷基硫酸钠溶液~~ 10% SDS 溶液 (C 液) 称取十二烷基硫酸钠 10g, 加水溶解并稀释至 100ml。

(5) ~~D 液 10% N, N, N', N'-四甲基乙二胺~~ 四甲基乙二胺溶液 (TEMED, D 液) 商品化试剂。

(6) ~~E 液 10% 过硫酸铵溶液, 临用前配制~~ 10% 过硫酸铵溶液 (E 液) 称取过硫酸铵 10g, 加水溶解并稀释至 100ml。建议临用前配制, 或分装于 -20°C 可贮存 2 周。

(7) 浓缩胶缓冲液 (4 \times , F 液) 0.5mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 称取三羟甲基氨基甲烷 6.05g, 加适量水使溶解, 用盐酸调 pH 值至 6.8, 加水稀释至 100ml。

(8) 电极缓冲液 (10 \times) 称取三羟甲基氨基甲烷 330g、甘氨酸 14.4144g、十二烷基硫酸钠 410g, 加适量水溶解并稀释至约 800ml, 用盐酸调 pH 值至 8.1~8.8 之间, 加水稀释至 1000ml。

(9) 非还原性供试品缓冲液 (4 \times) 称取三羟甲基氨基甲烷 3.03g、溴酚蓝 20mg、十二烷基硫酸钠 0.88.0g, 量取盐酸 0.189ml、甘油 440ml, 加水溶解并稀释至约 1080ml。用盐酸调节 pH 值至 6.8, 加水稀释至 100ml。该缓冲液用于非还原型 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。如用于还原型 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 则再加 β -巯基乙醇 2ml。

(10) 还原性供试品缓冲液 (4 \times) 称取三羟甲基氨基甲烷 3.03g、溴酚蓝 20mg、十二烷基硫酸钠 8.0g, 量取甘油 40ml, 加水溶解并稀释至约 80ml, 加入 β -巯基乙醇 20ml, 用盐

酸调节 pH 值至 6.8, 加水稀释至 100ml (或称取三羟甲基氨基甲烷 3.03g、溴酚蓝 20mg、十二烷基硫酸钠 8.0g, 量取甘油 40ml, 加水溶解并稀释至约 80ml, 用盐酸调节 pH 值至 6.8, 加水稀释至 100ml。在使用前, 加入二硫苏糖醇至 100mmol/L)。

(4011)分子量标准品 所选用的标准品的分子量范围应须将供试品待测样品的分子量包括在其中。

~~(11)固定液(蓝染法) 称取三氯醋酸 5g, 加水 200ml 溶解后, 加甲醇 200ml, 再加水至 500ml。~~

~~固定液(银染 A 法) 取甲醇 250ml、冰醋酸 60ml, 加水稀释至 500ml。~~

~~固定液(银染 B 法) 取甲醇 50ml, 37% 甲醛溶液 54 μ l, 加水至 100ml。~~

~~(12)脱色液(银染 A 法) 取乙醇 100ml、冰醋酸 50ml, 加水稀释至 1000ml。~~

~~(13)辅染液(银染 A 法) 称取重铬酸钾 10g, 量取硝酸 2ml 加适量水溶解并稀释至 200ml, 用前 40 倍稀释。~~

~~(14)银染液(银染 A 法) 称取硝酸银 2.04g, 加水溶解并稀释至 1000ml。~~

~~硝酸银溶液(银染 B 法) 取硝酸银 0.8g, 加水至 4.0ml, 将此溶液滴加到 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 20ml 与 25% 氨溶液 1.5ml 的混合液中, 摇匀, 用水稀释至 100ml。~~

~~(15)显色液(银染 A 法) 称取碳酸钠 30g, 加适量水溶解, 加甲醛 0.5ml 并稀释至 1000ml。~~

~~显色液(银染 B 法) 取 1% 枸橼酸溶液 2.5ml, 37% 甲醛溶液 270 μ l, 加水至 500ml。~~

~~(16)终止液(银染 A 法) 取冰醋酸 10ml, 加水稀释至 1000ml。~~

~~终止液(银染 B 法) 取冰醋酸 100ml, 加水至 1000ml。~~

~~(17)考马斯亮蓝染色液 称取考马斯亮蓝 R250 1g, 加入甲醇 200ml、冰醋酸 50ml、水 250ml, 混匀。~~

~~(18)考马斯亮蓝脱色液 取甲醇 400ml、冰醋酸 100ml 与水 500ml, 混匀。~~

~~(19)保存液 取冰醋酸 75ml, 加水至 1000ml, 摇匀。~~

~~供试品溶液的制备 将供试品与供试品缓冲液按 3: 1 的比例混匀, 或照各品种项下的规定制备, 除另有规定外, 置水浴中 100 $^{\circ}$ C 加热 3~5 分钟, 对照品/标准品溶液同法操作。~~

(12) 考马斯亮蓝染色法溶液

固定液 称取三氯醋酸 5g, 加水 200ml 溶解后, 加甲醇 200ml, 再加水至 500ml。

染色液 称取考马斯亮蓝 R250 1g, 加入甲醇 (或乙醇) 200ml 充分溶解, 混匀后加入冰醋酸 50ml、水 250ml, 混匀。

脱色液 取甲醇 (或乙醇) 200ml、冰醋酸 100ml 与水 700ml, 混匀。

保存液 取冰醋酸 75ml, 加水至 1000ml, 摇匀。

(13) 银染法溶液

银染 A 法

固定液 量取无水乙醇 500ml、冰醋酸 100ml, 超纯水 400ml, 混匀。

脱色液 量取无水乙醇 300ml、加超纯水 700ml, 混匀。

增敏液 称取 0.1g 无水硫代硫酸钠置烧杯溶解后, 定容至 250ml。

银染液 称取硝酸银 0.5g, 加水溶解, 加入 250 μ l 甲醛, 加水稀释至 250ml。

显色液 称取无水碳酸钠 7.0g, 加适量水溶解, 加入 2ml 增敏液、250 μ l 甲醛、加水稀

释至 250ml，临用新配。

终止液 量取冰醋酸 25ml，加水 475ml，混匀。

银染 B 法

固定液 量取甲 250ml、37% 甲醛溶液 0.27ml，加水稀释至 500ml。

硝酸银溶液 取硝酸银 0.8g，加水至 4.0ml，将此溶液滴加到 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 20ml 与 25% 氨溶液 1.5ml 的混合液中，摇匀，用水稀释至 100ml。临用前配制，避光保存。

显色液 取 2% 枸橼酸溶液 2.5ml，37% 甲醛溶液 0.27ml，加水稀释至 500ml。

终止液 取冰醋酸 10ml，加水稀释至 1000ml。

~~(三)~~ 3. 测定法

3.1. 凝胶制备

(1) ~~制备分离胶溶液~~ 分离胶制备 根据不同分子量的需要，按 ~~下表~~ 表 1 制成分离胶溶液，灌入模具内至一定高度，加水封顶，室温下聚合(室温不同，聚合时间不同)。

凝胶种类	凝胶浓度	分离胶溶液						浓缩胶溶液
		5%	7.5%	10%	12.5%	15%	17.5%	
试液 (ml)	A 液	4	4	4	4	4	4	
	B 液	2.7	4	5.4	6.7	8	9.4	1.35
	C 液	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.9
	D 液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.07
	E 液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.07
	F 液							2.25
	H ₂ O	7.3	6	4.88	3.3	2.28	0.88	4.33

表 1 分离胶溶液制备

分离胶体积	各种分离胶体积中应加入溶液成分体积 (ml)					
	5	10	20	25	50	
7.5% 丙烯酰胺						
水	2.3	4.6		9.3	11.5	23.2
30% 丙烯酰胺溶液	1.25	2.7		5.3	6.7	13.3
分离胶缓冲液	1.25	2.5		5.0	6.3	12.5
10% SDS 溶液	0.05	0.1		0.2	0.25	0.5
10% 过硫酸铵溶液	0.05	0.1		0.2	0.25	0.5
TEMED 溶液*	0.003	0.006		0.012	0.015	0.03
10% 丙烯酰胺						
水	1.9	4.0	7.9	9.9	19.8	
30% 丙烯酰胺溶液	1.7	3.3	6.7	8.3	16.7	
分离胶缓冲液	1.3	2.5	5.0	6.3	12.5	

10%SDS 溶液	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5
10%过硫酸铵溶液	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5
TEMED 溶液*	0.002	0.004	0.008	0.01	0.02
12%丙烯酰胺					
水	1.6	3.3	6.6	8.2	16.5
30%丙烯酰胺溶液	2.0	4.0	8.0	10.0	20.0
分离胶缓冲液	1.3	2.5	5.0	6.3	12.5
10%SDS 溶液	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5
10%过硫酸铵溶液	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5
TEMED 溶液*	0.002	0.004	0.008	0.01	0.02
12.5%丙烯酰胺					
水	1.5	3.1	6.3	7.8	15.7
30%丙烯酰胺溶液	2.1	4.2	8.3	10.4	20.8
分离胶缓冲液	1.3	2.5	5.0	6.3	12.5
10%SDS 溶液	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5
10%过硫酸铵溶液	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5
TEMED 溶液*	0.002	0.004	0.008	0.01	0.02
15%丙烯酰胺					
水	1.1	2.3	4.6	5.7	11.5
30%丙烯酰胺溶液	2.5	5.0	10.0	12.5	25.0
分离胶缓冲液	1.3	2.5	5.0	6.3	12.5
10%SDS 溶液	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5
10%过硫酸铵溶液	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5
TEMED 溶液*	0.002	0.004	0.008	0.01	0.02

注：根据不同品种需求，如需配制不同比例或不同体积的分离胶，可参考此表进行适当调整。

*根据商品化试剂浓度、操作便利性需求，可调整浓度及加入体积。

(2) ~~制备浓缩胶溶液~~浓缩胶制备 待分离胶溶液聚合后，用滤纸吸去上面的水层，再灌入按表 2 配制的浓缩胶溶液(配方见上表)，插入样品梳，注意避免气泡出现。

表 2 浓缩胶溶液制备

溶液成分	各浓缩胶体积中应加入溶液成分体积 (ml)	
	5	10
水	2.9	5.8
30%丙烯酰胺溶液	0.75	1.5
浓缩胶缓冲液	1.25	2.5

10%SDS 溶液	0.05	0.1
10%过硫酸铵溶液	0.05	0.1
TEMED 溶液*	0.005	0.01

注：*根据商品化试剂浓度、操作便利性需求，可调整浓度及加入体积。

3.2 供试品溶液制备 除各论另有规定外，供试品溶液制备如下。

(1) 非还原供试品溶液制备 按各论要求制备供试品溶液，将供试品溶液与非还原型供试品缓冲液按 3:1 体积比混匀，置水浴或 100℃块状加热器中加热 5 分钟，冷却至室温。对对照品/标准品溶液同法操作。

(2) 还原供试品溶液制备 按各论要求制备供试品溶液，将供试品溶液与还原型供试品缓冲液按 3:1 体积比混匀，置水浴或 100℃块状加热器中加热 5 分钟，冷却至室温。对对照品/标准品溶液同法操作。

3.3 电泳 除各论中另有规定外，按照如下步骤操作。

(1) 上样 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。进行纯度和杂质检查时，在加样孔中加入供试品溶液与对照品/标准品溶液不低于 1μg（银染法）或 10μg 以上（考马斯亮蓝染色法）。进行鉴别和分子量测定试验时，可根据产品特性酌情降低上样量。

(2) 电泳

恒压电泳 初始电压为 80V，进入分离胶时调至 150~200V，当溴酚蓝迁移胶底处，停止电泳。

恒流电泳 以恒流 10mA 条件下开始电泳，至供试品溶液进入分离胶后将电流调至 20mA，直至电泳结束。

~~(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前后槽，在加样孔中加入供试品溶液与对照品/标准品溶液 5μg(银染法)或 10μg 以上(考马斯亮蓝染色法)。~~

~~(4) 电泳 垂直板电泳，恒压电泳，初始电压为 80V，进入分离胶时调至 150~200V，当溴酚蓝迁移胶底处，停止电泳。或恒流电泳，以恒流 10mA 条件下开始电泳，至供试品溶液进入分离胶后将电流调至 20mA，直至电泳结束。~~

~~圆盘电泳：调节电流使每管 8mA。~~

~~(5)3.4 固定与染色~~

~~① (1) 考马斯亮蓝法 电泳完毕，取出胶片(条)，置固定液中 30 分钟，取出胶片(条)，置染色液中 1~2 小时，用脱色液脱色至凝胶背景透明后保存在保存液中。取出电泳凝胶片，置固定液中 60 分钟，取出胶片置过量考马斯亮蓝染色液中 1~2 小时，弃去染色液，置过量脱色液中，根据需要多次更换脱色液，脱色至凝胶背景透明后保存在保存液中。~~

~~② (2) 银染法 除另有规定外，银染法一般不用于定量试验，做定性试验时，上样量可以适当增加，做纯度试验时，若结果的量效关系不成正比，建议用考马斯亮蓝法染色。~~

~~银染 A 法 将电泳后的凝胶浸入固定液中 10~12 小时，取出，用脱色液漂洗 3 次(温度应不低于 25℃)，每次 10 分钟，漂洗后的凝胶浸于辅染液中 7~10 分钟后取出，用水浸洗 3 次，每次 2 分钟，将浸洗后的凝胶浸于银染液中，置较强日光或类似光源下照射 30 分钟，~~

再于室内光线下放置 20 分钟；~~将凝胶自银染液中取出，用水浸洗 2 次，每次 1 分钟，然后将凝胶浸于显色液中，每隔 2 分钟换液 1 次，直至蛋白质条带显色完全；将凝胶浸于终止液中 10 分钟后，取出凝胶保存于水中。~~将电泳后的分离胶浸入超纯水漂洗数秒，弃去超纯水并浸入固定液中固定 30 分钟以上。取出，用脱色液漂洗 2 次，每次约 15 分钟；弃去脱色液并浸入超纯水中约 20 分钟；取出凝胶，浸入增敏液中约 3 分钟；用水浸洗 3 次，每次约 20 秒；将浸洗后的凝胶浸于银染液中，银染约 20 分钟；取出凝胶，用水浸洗 3 次，每次约 20 秒；弃去超纯水，将凝胶浸于显色液中，显色至蛋白质条带清晰；迅速弃去显色液并浸入超纯水漂洗 5~10 秒；迅速弃去超纯水并浸入终止液，终止显色反应 10 分钟；取出凝胶保存于水中。

银染 B 法 胶片浸在固定液中至少 2 小时后弃去固定液，用水浸洗至少 1 小时；胶片置 1% 戊二醛溶液中 15 分钟后，用水洗 2 次，每次 15 分钟；胶片置硝酸银溶液中于暗处浸泡 15 分钟，用水洗 3 次，每次 15 分钟；胶片置显色液中，待各带显出后置终止液中。

~~(四)4 结果判断~~

~~用卡尺或用扫描定位法测量溴酚蓝指示剂和蛋白迁移距离(如为圆盘电泳还应测量染色前后胶条长度，垂直板电泳胶片厚度低于 1mm，染色前后胶片长度基本不变)。按下式计算相对迁移率：~~

$$\text{相对迁移率 (R'm)} = \frac{\text{蛋白迁移率}}{\text{脱色后胶条长度}} \times \frac{\text{脱色前胶条长度}}{\text{溴酚蓝指示剂迁移距离}}$$

~~(1) 供试品主成分迁移率应与对照品迁移率一致。~~

~~(2) 分子量以 R'm 为横坐标，标准蛋白质的分子量对数值为纵坐标，进行线性回归，由标准曲线求得供试品的分子量。~~

~~(3) 纯度取凝胶置薄层扫描仪，以峰面积按归一化法计算。~~

~~如使用商品化的 SDS 聚丙烯酰胺预制胶电泳系统，生产厂家可能提供不同表面积和厚度的凝胶，为了达到最优的分离度，按厂家推荐的条件进行电泳，电泳时间和电流/电压需按照厂家说明进行调整。~~

凝胶显色处理完毕后，对其进行拍照或扫描，通常用商品化的带有数据分析软件的凝胶扫描系统进行拍照和分析，得到相对迁移率值或以其他形式如分子量等体现的相对迁移率。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，计算公式如下：

$$\text{相对迁移率(Rm)} = \text{蛋白迁移距离} / \text{溴酚蓝指示剂迁移距离}$$

然后根据需要进行以下结果分析。

4.1 鉴别试验

供试品主成分相对迁移率应与对照品相对迁移率一致，相对迁移率偏差应不得过 5%。

4.2 分子量测定

采用本通则进行蛋白分子量测定，通常适用于能够在 SDS-PAGE 体系内具有良好谱带行为的球形蛋白，对于难以形成均一带型或系统适用性不能符合本通则要求的复杂蛋白如复杂糖蛋白、PEG 修饰蛋白等，如需在各论中进行分子量测定，建议采取其他更准确的测定方法。

4.2.1 系统适用性试验要求：除另有规定外，应符合以下要求。

(1)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相一致。待测样品的分子量应包含在分子量标准梯度范围内。

(2)以商品化分子量标准蛋白各条带相对分子量的对数为纵坐标，以其相对迁移率为横坐标，按软件计算，线性回归，所得标准曲线回归常数 $R^2 \geq 0.95$ 。

4.2.2 分子量测定：将供试品蛋白相对迁移率代入计算，由分子量标准蛋白的标准曲线求得供试品分子量。

4.3 纯度和杂质分析：除另有规定外，应符合以下要求。

4.3.1 系统适用性试验要求

(1)每次试验应随行适宜的分子量蛋白标准品，其分离情况应符合 4.2.1 的要求。

(2)灵敏度要求：应配制灵敏度对照溶液随行分析以避免过度脱色等影响，在本方法推荐的进样量条件下，应保证相当于供试品浓度 1% 含量的条带能显色。

(3)在各论中规定杂质限度法检查的情况下，应通过稀释供试品溶液，制备与该杂质浓度相对应的对照溶液。例如，当限度为 5% 时，对照溶液应为供试品溶液的 1:20 稀释度。

(4)线性：按照特定品种分析范围要求，将供试品溶液稀释成从标准规定限度至 100% 供试品溶液浓度的 3~5 个浓度梯度，以各条带扫描光密度值为纵坐标，以其浓度为横坐标，经软件处理，进行线性回归， $R^2 \geq 0.95$ 。

4.3.2 纯度和杂质分析

(1)杂质限度分析：供试液电泳图中除主谱带外的任何谱带显色强度均不超过对照溶液的主谱带。

(2)纯度分析：经凝胶成像仪扫描，按峰面积归一化法计算结果。

方法适用性考虑

1. 供试品适用范围：SDS-PAGE 分析通常需要根据具体情况优化和证明对特定目标蛋白质和/或目标杂质以及样品基质的适用性。在开发和优化方法时以及随后的结果判定中，应考虑蛋白质的特性如分子大小、氨基酸序列和共价修饰。

(1)本法适用于对分子量范围为 14000~100000 道尔顿的单体蛋白质的分析。对于超出该分子量范围的蛋白质，可在本方法应用范围内，通过采用相关技术手段(如梯度凝胶，特定缓冲系统)实现分析目的。如采用三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)-SDS 凝胶，以 Tricine 作为电泳运行缓冲液中的拖尾离子，用于分离 10000 道尔顿以下至 15000 道尔顿的小分子量蛋白质和多肽。

(2)SDS-PAGE 用于经修饰的蛋白质或多肽(如糖基化、聚乙二醇化等)分析时，由于 SDS 不以类似于多肽的方式与碳水化合物基团结合，导致染色强度可能存在差异。此外，所测得的表观分子量可能与其真实分子量存在差异。再者，此类修饰可能引入异质性，导致染色蛋白质条带拖尾或变形。

(3)采用非还原条件 SDS-PAGE,保留了蛋白质的寡聚形式，与还原条件下 SDS 与蛋白质结合方式不同，标准蛋白和待测蛋白的泳动速率可能不成比例，因而非还原电泳通常不用于分子量的测定，主要用于纯度和杂质的测定。

2. 梯度浓度凝胶电泳

对于某些特定品种的分析,为达到更好的分离效果、分离更宽分子量范围的蛋白质,需要采用梯度浓度的分离胶。表3给出了梯度凝胶参考应用范围。经充分验证,可采用自制梯度凝胶或商品化预制梯度凝胶产品。

表3 梯度凝胶参考应用范围

丙烯酰胺(%)	蛋白质分子质量范围(kDa)
5~15	20~250
5~20	10~200
10~20	10~150
8~20	g~150

3. 染色方法的选择

本法常用染色方法为考马斯染色法和银染色法。采用考马斯染色法检测的蛋白质浓度通常约为1~10 µg 蛋白/谱带,银染色法通常可以检测到含10~100ng 的谱带。考马斯染色法通常比银染色法具有更好的线性,但其响应值和范围取决于蛋白质特性和染色时间。依据具体品种特性,经充分验证后,也可采用其他染色法和商品化试剂盒,如荧光染料染色法等。

4. 系统适用性要求

在新方法开发和验证过程中,应根据产品特性和分析项目需求,进行系统适用性试验,产品各论中应设置合理的系统适用性要求。

5. 商品化预制凝胶和预配制试剂

可使用商品化市售产品,代替本方法中所述的凝胶和试剂,前提是市售凝胶和试剂能够提供相当的结果,并且符合各论中规定的系统适用性要求。

第六法 等电聚焦电泳法

等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)电泳法是两性电解质在电泳场中形成一个pH梯度,由于蛋白质为两性化合物,其所带的电荷与介质的pH值有关,带电的蛋白质在电泳中向极性相反的方向迁移,当到达其等电点(此处的pH值使相应的蛋白质不再带电荷)时,电流达到最小,不再移动,从而达到检测蛋白质类和肽类供试品等电点的电泳方法。

本法用于蛋白质的定性鉴别、等电点测定、限度检查以及定量测定。

方法1: 垂直板电泳法

除各论中另有规定外,按以下方法测定。

1. 仪器装置 恒压或恒流电源、带有冷却装置的垂直板电泳槽和制胶模具。

2. 试剂

(1) 水(电阻率不低于18.2MΩ·cm)。

(2) A液 称取丙烯酰胺29.1g、亚甲基双丙烯酰胺0.9g,加适量水溶解,并稀释至100ml,双层滤纸滤过,避光保存。

(3) B液 10%过硫酸铵溶液,临用前配制或分装于-20℃可贮存2周。

(4) 供试品缓冲液(4倍浓度) 取甘油8ml、40%两性电解质(pH3~10)溶液4ml,加水至20ml。加0.1%甲基红溶液20µl。

(5) **标准品-pI 标准** 商品化试剂，所选用的**标准品-pI 标准**的等电点范围一般应涵盖供试品的等电点。

(6) 固定液 称取三氯乙酸 34.5g、磺基水杨酸 10.4g，加水溶解并稀释至 300ml。

(7) 脱色液(平衡液) 取 95%乙醇 500ml、冰醋酸 160ml，加水稀释至 2000ml。

(8) 染色液 称取考马斯亮蓝 G250(或 R250)0.35g，加脱色液 300ml，在 60~70℃水浴中加热，使溶解。

(9) 保存液 取甘油 30ml，加脱色液 300ml，混匀。

(10) 正极液(0.01mol/L 磷酸溶液) 取磷酸 1ml，加水至 1800ml。

(11) 负极液(0.01mol/L 氢氧化钠溶液) 称取氢氧化钠 0.4g，加水溶解并稀释至 1000ml。

3. 测定法

(1) 制胶 装好垂直平板电泳槽，压水，于玻璃板和玻璃纸之间加入 60%甘油 1ml。取水 12ml，甘油 2ml，A 液 4.0ml、两性电解质(pH3~10)溶液(或其他两性电解质)1.0ml，混匀，脱气，再加 B 液 72 μ l，N, N, N', N'-四甲基乙二胺 3 μ l，混匀后注入槽内聚合，插入样品梳，注意避免气泡出现。

(2) 供试品溶液的制备 将供试品对水透析(或用其他方法)脱盐后，与供试品缓冲液按 3: 1 体积比混匀。供试品溶液最终浓度应不低于 0.5mg/ml。或按照各品种项下的方法制备。

(3) 电泳 待胶溶液聚合后小心拔出样品梳，将电极缓冲液注满电泳槽前后槽，样品孔每孔加供试品缓冲液 20 μ l，接通冷却循环水，于 10℃、250V(约 10mA)条件下电泳 30 分钟。每孔分别加供试品溶液与标准品溶液各 20 μ l，于 10℃、500V(约 10mA)，上限电压 2000V 条件下，电泳约 3.5 小时。

(4) 固定与染色 电泳结束后，即将凝胶放入固定液中固定 20 分钟以上；取出，放入平衡液中 20~30 分钟；再放入染色液中 40~60 分钟，然后用脱色液浸洗至背景无色，取出放入保存液中 30 分钟；亦可做成干胶保存。

4. 结果判断

凝胶显色处理完毕后，对其进行拍照或扫描，通常采用商品化的带有数据分析软件的凝胶扫描系统。下述各项要求可基于数据分析软件给出结果进行判定。

4.1 鉴别 供试品主成分迁移距离应与标准品一致，迁移距离相对偏差应不得过 5%；或供试品等电点谱带分布情况与对照品相似。

4.2 等电点测定

4.2.1 系统适用性试验要求：除另有规定外，应符合以下要求。

等电点标准条带应符合说明书提供谱带图示，在泳道中的分布范围与其标准蛋白等电点相一致。每条带距凝胶正极端距离为迁移距离，以各标准品的等电点(pI)对其相应的迁移距离作线性回归，所得标准线性方程 $R \geq 0.95$ 。

4.2.2 等电点测定：将供试品的迁移距离代入线性回归方程，求出供试品的等电点。

4.3 纯度和有关物质检查

4.3.1 系统适用性试验要求：除另有规定外，应符合以下要求。

(1)每次试验应随行适宜的等电点蛋白标准品，其分离情况应符合 4.2.1 的要求。

(2)进行纯度分析时应进行灵敏度考察。除另有规定外，在各论要求的进样量条件下，相

当于供试品溶液浓度 1%的灵敏度对照溶液条带应显色。

(3)在进行有关物质限度检查的情况下,应通过稀释供试品溶液,制备与该有关物质限量浓度相对应的对照溶液。例如,当限度为 5%时,对照溶液应为供试液的 1:20 稀释度。

4.3.2 结果分析

(1)有关物质限度检查:除主谱带外,供试液 IEF 电泳图中任何谱带显色强度均不得过对照溶液的主谱带。

(2)纯度检查:经凝胶成像仪或其他相似仪器扫描,按峰面积归一化法定量计算结果。

方法 2:水平板电泳法

除各论中另有规定外,按以下方法测定。

1. 仪器装置

恒压或恒流电源、带有冷却装置的水平电泳槽和制胶模具。

2. 试剂

(1)水(电阻率不低于 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

(2)A 液 称取丙烯酰胺 ~~29.15.0g~~、亚甲基双丙烯酰胺 ~~0.90.15g~~,加适量水溶解,并稀释至 ~~100~~50ml,双层滤纸滤过,避光保存。

(3)B 液 10%过硫酸铵溶液,临用前新配制,或分装于 -20°C 可贮存 2 周。

(4)50%甘油 取甘油 50g,加水混合均匀后定容至 100ml。

~~(4)(5) 标准品-pI 标准 商品化试剂,所选用的标准品-pI 标准的等电点范围一般应涵盖供试品的等电点。~~

~~(5)(6) 固定液 称取三氯乙酸 34.5g, 氨基水杨酸 10.4g, 加水溶解并稀释至 300ml。甲基红试液 称取甲基红 5mg, 加 0.05mol/L 氢氧化钠 10ml 溶解, 混匀。~~

~~(6)(7) 脱色液(平衡液) 取 95%乙醇 500ml、冰醋酸 160ml, 加水稀释至 2000ml。固定液 20%三氯乙酸。~~

~~(7)(8) 染色液 称取考马斯亮蓝 G250 (或 R250) 0.35g, 加脱色液 300ml, 在 60-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热, 使溶解。染色贮备液称取考马斯亮蓝 G250(或 R250)1.0g,加水 20ml 溶解, 作为溶液 1;称取硫酸铵 125g,加水 400ml 溶解, 作为溶液 2;称取磷酸 20g,作为溶液 3;将溶液 3 加入到溶液 1 中, 加热搅拌待考马斯亮蓝 G250(或 R250)完全溶解后, 过滤, 加入溶液 2 混合, 并加水至 1L,混匀, 即得, 用前应充分摇匀。~~

~~(8)(9) 保存液 取甘油 30ml, 加脱色液 300ml, 混匀。工作染色液 取 60ml 染色贮备液, 与 30ml 甲醇(或乙醇)混匀, 临用新配。~~

~~(9)(10) 正极液(0.5mol/L 磷酸溶液) 量取磷酸 501.6ml,加水至 180050ml。~~

~~(10)(11) 负极液((1.0mol/L 或 0.2mol/L 氢氧化钠溶液) 称取氢氧化钠 8g, 加水溶解并稀释至 1000ml。1.0mol/L 氢氧化钠溶液:称取氢氧化钠 2g,加水溶解并稀释至 50ml。0.2mol/L 氢氧化钠溶液:称取氢氧化钠 0.4g, 加水溶解并稀释至 50ml。~~

3. 测定法

(1) 制胶

5%凝胶:量取 A 液 ~~6.25~~2.5ml、pH3~10 两性电解质(或各论项下规定的其他 pH 范围两性电解质)~~1.50~~1.35ml、水 ~~17.1~~1.25ml, 50%甘油 0.5ml, 混匀, 抽气 5~10 分钟, 加 B 液 ~~17.5~~25ml

和 N, N, N', N'-四甲基乙二胺 206 μ l(根据凝胶速度可适当调整试剂的加入量), 混匀后缓慢地注入水平模具内, 室温下聚合。如果无法聚合, 视情况增加 N,N,N',N'-四甲基乙二胺的量, 使得胶在 30~60 分钟内聚合。

7.5%凝胶: 取 A 液 7.5ml, pH3~10 的两性电解质(或各论项下规定的其他 pH 范围两性电解质)0.7ml, 水 0.8ml, 50%甘油 1.0ml, 混匀, 抽气 5~10 分钟, 加 B 液 50 μ l, N,N,N',N'-四甲基乙二胺 12 μ l, 混匀后缓慢地注入水平模具内, 室温下聚合。如果无法聚合, 视情况增加 N,N,N',N'-四甲基乙二胺的量, 使得胶在 30~60 分钟内聚合。

注: 根据制胶模具大小以及品种各论项下需求, 可按比例调整各溶液体积。

(2)预电泳 将已聚合的聚丙烯酰胺凝胶放在冷却板上, 其间涂以水、液体状石蜡或煤油并等适宜液体以避免产生气泡的产生。

(2)(3) 供试品溶液的制备 将供试品对水透析(或用其他方法)脱盐, 并使蛋白质或多肽含量调节在每 0.5~5mg/ml 范围, 或按照各品种项下的方法制备。按各论项下的样品前处理方法制备供试品溶液, 使其蛋白或多肽浓度在 0.5~5mg/ml, 然后在每 10~20 μ l 供试品溶液中加入 1pI 的甲基红试液, 加入 10%的两性电解质, 混合均匀。如需使用对照品溶液, 同法制备。

(2)(4) 电泳 用正极液与负极液分别润湿正极与负极电极条, 然后分别放手正极与负极上, 将加样滤纸放在凝胶上。分别加供试品溶液与标准品溶液各 5~30 μ l。将电极对准电极条的中心, 加盖, 在上限电压 2000V, 上限电流 50mA, 功率为每 1cm 胶 1W, 温度 4 $^{\circ}$ C 的电泳条件下, 开始电泳, 电泳 30 分钟后去掉加样滤纸, 待电流不再变化时停止电泳。如有必要可在起始电压 200V 下预电泳 30 分钟。将加样滤纸条以一定间隔置于凝胶上, 加入供试品、对照品及等电点标准溶液 10~20 μ l。选择恒压方式进行电泳, 起始电压为 200V。电泳 0.5~1 小时待甲基红迁出加样条后, 调高电压至 400V, 电泳至电流不再变化, 再适度调节至所需电压继续电泳, 待电流不再变化时停止电泳。预制凝胶的预电泳及电泳, 按照各等电聚焦电泳仪标准操作规程进行。

(2)(5) 固定与染色 同等电聚焦垂直板电泳。电泳完毕后, 取出胶片, 置于固定液中固定 20 分钟以上, 取出胶片, 置染色液中染色至待测条带清晰后(通常需要 30 分钟~1 小时)转入水中, 漂洗后取出晾干, 亦可做成干胶永久保存。

4. 结果判断 同等电聚焦垂直板电泳法。

方法适用性考虑

1. 等电聚焦分离特性 等电聚焦电泳中相邻两个条带间的分离效率通过确定最小 pI 差异(Δ pI)来评价:

$$\Delta pI = 3 \times \sqrt{\frac{D (dpH/dx)}{E (-d\mu/dpH)}}$$

式中 D 为蛋白质的扩散系数;

$\frac{dpH}{dx}$ 为 pH 梯度;

E 为电场的强度, V/cm;

$-\frac{d\mu}{dpH}$ 为在接近 pI 的区域，溶质迁移率随 pH 变化而变化。

对于某个给定的蛋白质分子， D 和 $-\frac{d\mu}{dpH}$ 是常数，不会改变，因此可以降低 pH 梯度范围以及提高电场强度来改善分离效果。例如，如果某个蛋白 pI 值在 $pH5$ 左右，则使用 $pH2.5\sim6.0$ 的范围比使用 $pH3\sim10$ 的范围更能够提升其与等电点相近蛋白之间的分离效果。

在使用载体两性电解质制备的 IEF 凝胶上，蛋白质谱带之间分离度可满足一般需求。使用固定化 pH 梯度可进一步提高分离度。使用载体两性电解质制备的凝胶通常能够分离 pI 差异约 $0.02pH$ 单位的蛋白，而固定 pH 梯度可以分离 pI 差异约 $0.001pH$ 单位的蛋白质。

2. 系统分离验证 建议在方法开发过程中进行此验证，无需列入常规检验的操作程序。本验证可包括以下要求。

2.1 该体系能够形成具有预期特征的稳定 pH 梯度，可采用已知等电点的预染 pH 标准蛋白进行评价。

2.2 将预染色蛋白(如血红蛋白)或其他指示剂在凝胶表面的不同位置点样，开始聚焦分析，当电泳达到稳态后，所有点样泳道应产生相似的谱带。例如，可尝试在凝胶中间和靠近两端选择 3 个位置点样观察。

2.3 将待测样品电泳图谱与其对照品的相比，应匹配，

2.4 满足各论中规定的任何其他验证标准。

3. 注意事项

3.1 样品中含有盐可能会产生问题，宜于去离子水或 2%两性电解质中制备样品，必要时使用透析或凝胶过滤。

3.2 为保护蛋白质免受极端 pH 环境的影响，点样位置不应过于靠近电极区域。

3.3 等电聚焦期间产生大量热量，应采取必要的冷却装置，并将凝胶冷却温度设置至 $4^{\circ}C$ 。

4. 系统适用性要求 在新方法开发和验证过程中，应根据产品特性和分析项目需求，进行系统适用性试验，产品各论中应设置合理的系统适用性要求。

5. 商品化预制凝胶和预配制试剂 可使用商品化产品代替本通则中所述的凝胶和试剂，前提是商品化凝胶和试剂能够提供相当的结果，并且符合各论中规定的系统适用性要求。