0541电泳法

第五法 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳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。

本法适用于蛋白质的定性鉴别、纯度和杂质控制以及定量测定。

1.仪器装置

恒压或恒流电源、垂直板电泳槽和制胶模具。

2.试剂

(1)水（去离子水，电阻率不低于18.2MΩ•cm)。

(2)分离胶缓冲液（4×，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值至8.8，加水稀释至100ml。

(3) 30%丙烯酰胺溶液（B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)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。

公示稿

(5)四甲基乙二胺溶液（TEMED，D液）：商品化试剂，通常浓度为10%的N,N,N',N'-四甲基乙二胺。

(6) 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℃可贮存2周。

(7)浓缩胶缓冲液（4×，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×）：称取三羟甲基氨基甲烷30g、甘氨酸144g、十二烷基硫酸钠10g ，加水溶解并稀释至约800ml，用盐酸调pH值至8.1-8.8之间，加水稀释至1000ml。

(9)非还原型供试品缓冲液（4×）：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，用盐酸调节至pH6.8，加水稀释至100ml。

(10)还原型供试品缓冲液（4×）：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，用盐酸调节至pH6.8，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80ml，用盐酸调节至pH6.8，加水稀释至100ml。在使用前，加入二硫苏糖醇至100mmol/L）。

(11)分子量标准品　所选用的标准品的分子量范围须将待测样品的分子量包括在其中。

（12）考马氏亮蓝染色法溶液：

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250μl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、250μl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 取甲醇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%柠檬酸溶液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。

3. 测定法

3.1 凝胶制备

公示稿

(1)分离胶制备：根据不同分子量的需要，按表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)。

表1　分离胶溶液制备

	各分离胶体积中应加入溶液成分体积（mL）				
分离胶体积	**5 mL**	**10 mL**	**20 mL**	**25 mL**	**50 mL**
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

	各分离胶体积中应加入溶液成分体积（mL）				
分离胶体积	**5 mL**	**10 mL**	**20 mL**	**25 mL**	**50 mL**
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，可参考上表进行适当调整。

(2) 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，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 mL	**10 mL**
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

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。

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。对照品/标准品溶液同法操作。

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。对照品/标准品溶液同法操作。

3.3 电泳

（1）上样：除各论中另有规定外，可参考下述上样量上样。

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。

3.4 固定与染色

1）考马斯亮蓝法：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）银染法：除另有规定外，银染法一般不用于定量试验。

银染A法　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30min以上。取出，用脱色液漂洗2，每次约15分钟；弃去脱色液并浸入超纯水中约20min；取出凝胶，浸入增敏液中约3min；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5-10s；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。

公示稿

4 .结果判定

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：

相对迁移率（R_m）= 蛋白迁移距离/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$R^2 \geqslant 0.95$。

公示稿

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

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，R2≥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得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。

方法概述：

1．聚丙烯酰胺凝胶特性

公示稿

聚丙烯酰胺凝胶的筛分特性通过采用双官能团交联，相邻的聚丙烯酰胺链组成的纤维和孔隙的三维网络来建立。聚合通常由过硫酸铵和N,N,N',N'-四甲基乙二胺（TEMED）组成的自由基生成系统催化。

随着凝胶中丙烯酰胺浓度的增加，其有效孔径减小。凝胶的有效孔径由其筛分特性规定，即其对大分子迁移的阻力。可以使用的丙烯酰胺浓度有限。在高丙烯酰胺浓度下，凝胶更容易破裂，而且难以处理。随着凝胶的孔径减小，蛋白质通过凝胶的迁移速率降低。对于给定的蛋白质产品，可以通过改变丙烯酰胺浓度，调整凝胶的孔径，优化该方法的分辨率。

2．SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法

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。在本方法应用范围内，可以使用各种技术（如梯度凝胶、特定缓冲系统）来扩大该分子量范围。例如，三甲基甘氨酸-SDS凝胶，以三甲基甘氨酸作为电泳运行缓冲液中的拖尾离子（而不是如本文所述方法中的甘氨酸），可以分离10000道尔顿以下至15000道尔顿的小分子量蛋白质和多肽。

示例方法所采用甘氨酸-SDS变性聚丙烯酰胺凝胶电泳是用于评估蛋白质产品药品质量的最常见电泳模式。通常，用于蛋白质分析的聚丙烯酰胺电泳条件要确保蛋白质解离成其单个蛋白质或多肽亚单位并尽量减少聚集。最常用的方法是使用强阴离子表面活性剂SDS同时进行加热，对蛋白质样品进行前处理。变性蛋白质或多肽与SDS结合后带负电荷，无论蛋白质类型如何，均表现出一致的荷质比。因为SDS的结合量几乎总是与蛋白质或多肽的分子量成比例，并且与其序列无关，故SDS-

公示稿

蛋白质或多肽复合物通过聚丙烯酰胺凝胶迁移，迁移率取决于蛋白质或多肽的大小。除凝胶组成外，蛋白质的状态是影响电泳迁移率的重要因素。对于蛋白质，电泳迁移率取决于带电基团的pK值和分子大小。其受缓冲液的种类、浓度和pH值、温度和场强以及支架材料的性质的影响。

SDS复合物将以可预测的方式向阳极迁移，低分子量复合物迁移得比大分子量复合物更快。因此，蛋白质的分子量可以通过其在校准的SDS-PAGE中的相对迁移率计算得到；，单个谱带的相对强度可用作纯度的评估。

蛋白质或多肽骨架的修饰（如糖基化、聚乙二醇化等）可以改变蛋白质的表观分子量，因为SDS不以类似于多肽的方式与碳水化合物基团结合，所以无法保持一致的荷质比。根据糖基化和其他翻译后修饰的程度，蛋白质的表观分子量可能不是蛋白质或多肽链分子量的真实反映。

还原条件：蛋白质中的亚单位和三维结构通常通过二硫键连接而保持稳定，还原条件下SDS-PAGE分析的目的是通过还原二硫键破坏该结构。通过用2-巯基乙醇（2-ME）或二硫苏糖醇（DTT）处理，蛋白质完全变性和解离，将导致多肽骨架的解折叠并随后与SDS络合。利用这些条件，根据适当的分子量标准，可以通过适宜的回归方程合理地计算蛋白质亚单位的分子量。

非还原条件：某些分析要求蛋白质不能解离成亚单位，需要进行非还原电泳。在不进行还原剂（如2-ME或DTT）处理的情况下，二硫键不破坏，保留了蛋白质的寡聚形式。寡聚SDS-蛋白质复合物比其SDS-多肽亚单位迁移得更慢。另外，非还原蛋白质可能不会被SDS完全饱和，因此可能不会以恒定的质量比结合SDS。同时，链内二硫键限制了分子形状，多数情况下会减少分子的Stokes半径，降低表观分子量。这些不确

公示稿

定因素使得标准蛋白和待测蛋白的泳动速率不成比例，因而非还原电泳通常不用于分子量的测定，而主要用于纯度和杂质的测定。

3．不连续缓冲系统凝胶电泳特性

不连续缓冲液系统凝胶电泳是鉴定蛋白质混合物的最常见电泳方法，本文中的示例方法也属于不连续缓冲液电泳系统。该系统包含2种不同的凝胶：即分离（下）胶和积层（上）胶。2种凝胶具有不同的孔隙、pH和离子强度。另外，在凝胶和电极缓冲液中使用不同的移动离子。

缓冲液不连续性将大体积样品浓缩在积层胶中，使分辨率提高。当接通电源时，样品溶液中产生电压降，驱动蛋白质进入积层胶中。来自电极缓冲液的甘氨酸离子跟随蛋白质进入积层胶，移动边界区域迅速形成，前面是高速移动的先导离子氯离子，后面是相对缓慢的尾随离子甘氨酸离子。在先导离子前沿和尾随离子前沿之间形成局部高压梯度，将SDS-蛋白质复合物挤压堆积，并在氯离子和甘氨酸离子之间迁移，使所有SDS-蛋白质均高度浓缩堆积在一个非常狭窄的区域进入分离胶。由于分离胶的孔径变小以及缓冲液不连续性，蛋白质聚集在积层胶和分离胶的界面处。进入分离胶后，在介质的筛分作用下，蛋白迁移速度进一步减慢，甘氨酸离子超过蛋白质，然后在由三羟甲基氨基甲烷和甘氨酸形成的均匀pH分布中移动。分子筛作用使SDS-多肽复合物根据其分子量进行分离。

4．SDS-PAGE-梯度浓度凝胶电泳

梯度凝胶（分离胶）采用从顶部到底部浓度逐渐增加的丙烯酰胺制备。部分在固定浓度凝胶上共迁移的蛋白质可使用梯度凝胶分离，电泳过程中，蛋白质迁移至高浓度梯度时产生堆积效应，出现较尖锐的谱带。与单一固定浓度凝胶相比，梯度凝胶还可以分离更宽分子量范围的蛋白

质。下表给出了建议的线性梯度组成，将丙烯酰胺浓度的范围与适当的蛋白质分子量范围联系起来。在进行充分验证的前提下，也可采用自制梯度凝胶或商品化预制梯度胶产品。

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	8 – 150

5. 凝胶电泳中蛋白质的检测

考马斯染色法和银染色法是最常见的蛋白质染色方法，除本通则所述方法外，各品种各论根据蛋白特性需求，在进行充分验证的前提下，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。采用考马斯染色法检测的蛋白质浓度通常约为1μg～10μg蛋白/谱带，银染色法通常可以检测到含10ng～100ng的谱带。考马氏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。

6. 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。

7. 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。

公示稿

起草单位：中国食品药品检定研究院　　电话：01053851638

复核单位：上海所、天津院、广东所

公示稿