

质量评价

琼脂糖凝胶电泳法测定人血白蛋白纯度

柯兵兵¹, 汪模正², 巫建翔², 郭江红¹

(1. 湖北省药品监督检验研究院, 湖北省药品质量检测与控制工程技术中心, 武汉 430073;

2. 同路生物制药有限公司, 合肥 230000)

摘要 目的: 建立琼脂糖凝胶电泳法测定白蛋白纯度。方法: 采用 Helana 公司 Epalyzer 2 型全自动电泳仪及其配套的试剂盒, 供试品溶液为 2%, 染色液浓度为 0.35%, 染色液体积为 800 μ L, 上样量为 50 μ L, 对 153 批白蛋白样品进行测定, 并与醋酸纤维素薄膜法测定结果进行比较。结果: 琼脂糖凝胶电泳法定量测定区间为 1%~5%, 最低检测浓度为 0.1%; 精密度考察 RSD 小于 0.5%; 本法(蛋白纯度均值 96.7%)与醋酸纤维素薄膜法(蛋白纯度均值 97.1%)测定结果相近, 统计学分析显示 2 种方法的测定结果无显著性差异($P>0.05$)。结论: 琼脂糖凝胶电泳法的精密度和耐用性良好, 可用于白蛋白纯度测定。

关键词: 琼脂糖凝胶电泳; 醋酸纤维素薄膜电泳; 人血白蛋白; 杂蛋白; 纯度

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)12-2279-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.12.23

Determination of human albumin purity by agarose gel electrophoresis

KE Bing-bing¹, WANG Mo-zheng², WU Jian-xiang², GUO Jiang-hong¹

(1. Hubei Institute for Drug Control & Hubei Engineering Research Center for Drug Quality Control, Wuhan 430073, China;

2. Tonglu Bio-Pharmaceutical Co., Ltd., Hefei 230000, China)

Abstract Objective: To establish the method of determination of albumin purity by agarose gel electrophoresis. **Methods:** Helana Epalyzer 2 automatic electrophoresis instrument and its supporting kit were used, concentration of test sample was 2%, concentration of staining solution was 0.35%, volume of staining solution was 800 μ L, and loading volume of the test sample was 50 μ L. 153 batches of albumin samples were measured by this method and compared with the results of the cellulose acetate film method. **Results:** The quantitative determination range of the agarose gel electrophoresis method was 1%~5%, and the lowest detection concentration was 0.1%. The RSD of precision examination was less than 0.5%. The results of this method (average protein purity was 96.7%) were similar to those of the cellulose acetate film method (average protein purity was 97.1%). Statistical analysis showed there was no significant difference between the two methods ($P>0.05$). **Conclusion:** Agarose gel electrophoresis has good precision and durability and can be used for albumin purity determination.

Keywords: agarose gel electrophoresis; cellulose acetate membrane electrophoresis; human albumin; impurity protein; purity

第一作者 Tel: (027) 87894193; E-mail: bknifdc@163.com

人血白蛋白(human albumin)系由健康人血浆分离纯化并经病毒灭活后制成的注射剂,临床应用广泛。白蛋白纯度是指制品中白蛋白主成分占有蛋白成分的比例。目前国内生产厂家均采用低温乙醇沉淀法纯化白蛋白,通过调节蛋白浓度、pH、离子强度、温度与乙醇浓度等参数,最终使白蛋白分离纯化^[1]。纯度是关键项目,然而,该工艺无法将理化性质与白蛋白相近的蛋白质完全去除,因此产品中不可避免存在一定量的杂蛋白^[2-3],影响产品纯度这一质量属性。

《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2015年版采用醋酸纤维素薄膜电泳法测定白蛋白纯度^[4],国内批签发机构及生产企业均采用意大利 Interlab 公司全自动醋酸纤维素薄膜电泳仪测定白蛋白纯度,然而该仪器目前已停产,试剂申购及仪器维修面临很大困难,给该产品及免疫球蛋白制品的检测带来诸多不便,因此急需建立其他纯度测定方法。欧洲药典同时收录了醋酸纤维素薄膜电泳法和琼脂糖凝胶电泳法^[5],但试验条件未详细说明,仅提及按照仪器生产商的指导说明进行试验。

《中国药典》2015年版附录收录琼脂糖凝胶电泳法,但规定本法适用于核酸、蛋白复合物的分离。载琼脂糖凝胶电泳法也见于临床血清蛋白的测定^[6-12]。本研究参考药典附录 0541 第三法建立人血白蛋白琼脂糖凝胶电泳法,对国内外 153 批白蛋白样品进行测定,并与醋酸纤维素薄膜法进行比较。

1 仪器与试剂

Epalyzer 2 型全自动电泳仪及其配套的电泳试剂盒(Helana 公司),包括琼脂糖预制凝胶(批号 0180),染色液(0.35% 酸性蓝,批号 11478052)和染色液(2% 醋酸溶液,批号 1711251,西陇科学股份有限公司)。

人血白蛋白质控品(纯度 97.2%,企业自制,按醋酸纤维素薄膜法——《中国药典》2015 年版四部通则第二法标定),国内外 33 家企业的人血白蛋白样品,共 153 批。按照企业顺序依次以 1~153 作为样品编号。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 取人血白蛋白样品 100 μL ,加纯化水 900 μL ,稀释成蛋白浓度为 2% 的溶液,即得。

2.2 电泳条件 电压:240 V,时间:8 min;染色:15

min,脱色:6 min;干燥时间:6 min。

2.3 操作 取供试品溶液 50 μL ,依次加入样品盘内,加样完成后将样品盘置于仪器相应的位置上。电泳结束后,对电泳谱图进行扫描,分析结果数据。

2.4 系统适用性考察

取正常人质控血浆 50 μL ,在染色液浓度 0.35%,体积 800 μL 的条件下考察琼脂糖凝胶电泳法分离测定血浆蛋白的性能。结果见图 1 所示,血浆中各蛋白能够很好地分离,其含量在规定的区间范围内,表明该仪器能够很好地分离血浆蛋白。

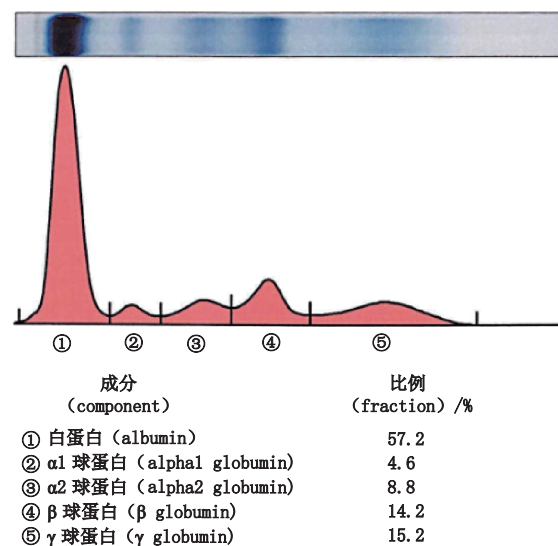


图 1 正常人质控血浆琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis map of normal human control plasma

2.5 定量测定区间

将白蛋白质控品用纯化水稀释成浓度为 10%、7.5%、5%、4%、3%、2.5%、2.0%、1.5%、1.0%、0.5%、0.1% 的溶液,取该溶液 50 μL ,在染色液浓度为 0.35%,体积为 800 μL 时照“2.2”项下条件检测。结果见表 1,蛋白浓度在 1%~5% 之间,纯度测定结果与质控品纯度接近。而当样品浓度为 0.1% 时,测定值与质控品的标示值相差较大,且 RSD 较大。故琼脂糖凝胶电泳法测定白蛋白纯度的定量区间为 0.5%~5%,检测下限为 0.1%。

2.6 精密度

取“2.5”项下溶液(蛋白浓度 2%)50 μL ,在染色液浓度为 0.35%,体积为 800 μL 时照“2.2”项下条件检测。由 2 位分析员分别对同一质控品平行测定 10 次,结果显示,2 位分析员测得的蛋白纯度均为

96.5%, RSD 分别为 0.35%、0.23%, 图谱见图 2。结果表明方法精密度良好。

表 1 不同供试品溶液浓度的纯度测定结果 ($n=4$)

Tab. 1 Purity results of different test samples by agarose gel electrophoresis		
蛋白浓度 (protein concentration) /%	纯度平均值 (average purity) /%	RSD/%
10.0	95.1	0.17
7.5	95.6	0.10
5.0	96.5	0.26
4.0	96.6	0.55
3.0	96.6	0.79
2.5	97.2	0.38
2.0	97.1	0.21
1.5	97.6	0.66
1.0	97.5	0.32
0.5	98.0	0.28
0.1	92.7	1.3

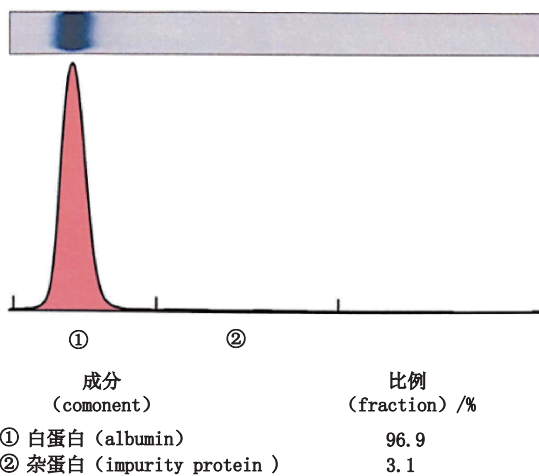


图 2 人血白蛋白琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis map of human albumin

2.7 耐用性

2.7.1 上样体积

点样梳通过表面吸附作用,将白蛋白样品点至琼脂糖凝胶中,比较不同加样量对纯度测定值的影响。在染色液浓度 0.35%,染色液体积 800 μL 条件下,通过加入不同体积“2.5”项下白蛋白质控品溶液(蛋白浓度 2%)进行试验,结果见表 2,上样体积对蛋白纯度测定值有显著影响,且体积为 50 μL 时, RSD 最小。

表 2 不同上样体积时蛋白纯度测定结果

Tab. 2 Purity results of protein at different volumes							
上样体积 (sampling volumn) / μL	测定值 (measured) /%					平均值 (average purity) /%	RSD/%
25	97.5	96.7	96.5	96.7	96.9	97.1	0.42
	96.9	97.0	97.2	97.4	97.8		
35	97.2	96.2	97.4	97.0	96.7	97.1	0.55
	97.5	97.9	97.0	97.8	96.7		
50	97.3	96.7	96.8	96.8	97.2	97.0	0.28
	96.9	97.1	97.1	96.7	97.5		
65	96.5	97.2	96.8	97.0	96.6	96.8	0.40
	96.5	97.1	97.3	97.1	96.1		

2.7.2 蛋白浓度微小变化对测定结果的影响

按照“2.5”项下方法分别配制蛋白浓度为 1.8%、2.0%、2.2% 的溶液,在染色液浓度 0.35%,染色液体积 800 μL 条件下,测定蛋白纯度。结果见表 3。

表 3 不同蛋白浓度的纯度结果

Tab. 3 Purity results at defferent protein concentrations							
蛋白浓度 (protein concentration) /%	测定值 (measured) /%					平均值 (average purity) /%	RSD/%
1.8	98.0	97.2	97.5	97.8	98.0	97.4	0.42
	96.8	96.9	97.0	97.5	97.6		
2.0	97.3	96.7	96.8	96.8	97.2	97.0	0.28
	96.9	97.1	97.1	96.7	97.5		
2.2	98.1	98.0	97.9	97.8	97.3	97.5	0.48
	97.0	97.6	97.4	97.5	96.6		

2.8 样品测定

按照“2.1”和“2.2”项下方法制备供试品溶液,并对白蛋白样品纯度进行测定,结果见表 4,蛋白纯度为 94.8%~98.8%,平均值为 96.7%。而采用《中国药典》2015 年版四部通则醋酸纤维素薄膜法进行测定(电泳条件:电压 140 V,时间 20 min;染色 5 min,脱色 8 min;透明 3 min,干燥 10 min;取供试品溶液 30 μL ,依次加入样品盘内,加样完成后将样品盘放于仪器相应的位置上检测),结果见表 4,蛋白纯度为 96.1%~99.0%,平均值为 97.1%。2 种方法的测定结果相近。经配对 t 检验统计分析,两者无统计学差异。

表 4 各企业白蛋白样品测定结果(%)

Tab. 4 Test results of albumin samples from different manufactures

序号 (number)	批号 (batch No.)	本法 (established method)	醋酸纤维素薄膜电泳法 (cellulose acetate membrane electrophoresis)	序号 (number)	批号 (batch No.)	本法 (established method)	醋酸纤维素薄膜电泳法 (cellulose acetate membrane electrophoresis)
1	201707A088	96.4	98.5	33	201709065	96.5	97.1
2	201709A112	96.5	97.5	34	201609082	96.6	96.3
3	201602A019	97.4	97.2	35	201707052	97.1	97.3
4	201706A066	96.2	97.6	36	201610072	96.4	97.3
5	201711A120	97.4	97.3	37	201708053	97.1	96.2
6	20170512	96.4	96.7	38	201703027	96.4	97.2
7	20170408	96.8	97.0	39	201704023	96.9	98.8
8	20160822	96.1	97.3	40	201709063	96.0	98.0
9	20171028	96.8	97.3	41	201607062	96.4	98.5
10	20171236	96.8	97.0	42	201712084	96.4	97.8
11	20171235	97.0	97.6	43	201801004	96.5	97.4
12	20171131	97.1	97.8	44	201802018	97.2	97.5
13	20170808	98.1	97.7	45	201711075	97.0	97.0
14	20171011	97.5	97.5	46	201801001	97.0	97.4
15	201705026	96.1	97.2	47	201711077	96.9	97.0
16	201703009	95.4	97.3	48	20171037	97.3	96.1
17	201704018	96.4	97.1	49	20171248	97.1	97.0
18	201710060	96.6	97.2	50	20171247	96.9	96.6
19	201710059	96.9	96.9	51	20171143	96.4	96.7
20	201606023	96.3	97.1	52	20171037	96.3	96.2
21	201706034	96.4	96.5	53	20171245	96.7	96.6
22	20180103	96.2	96.9	54	20170825	96.7	96.9
23	20180102	94.8	97.2	55	20170828	97.9	97.6
24	201707030	96.1	96.8	56	20171139	97.6	96.4
25	201707029	96.0	96.7	57	201801002	98.2	99.0
26	201706020	96.3	97.0	58	201801001	97.9	97.8
27	201712059	96.5	96.8	59	20170519	96.7	96.8
28	201712058	96.4	97.4	60	20170622	96.7	97.5
29	20180307	97.3	97.2	61	201708022	97.2	97.1
30	20180206	96.3	97.6	62	201710028	96.4	98.4
31	201703008	96.2	97.3	63	201708023	96.8	97.6

表 4(续)

序号 (number)	批号 (batch No.)	本法 (established method)	醋酸纤维素薄膜电泳法 (cellulose acetate membrane electrophoresis)	序号 (number)	批号 (batch No.)	本法 (established method)	醋酸纤维素薄膜电泳法 (cellulose acetate membrane electrophoresis)
32	201701004	96.3	96.9	64	201709026	97.0	97.2
65	201709026	96.5	97.2	98	20170735B	96.3	98.4
66	201709025	97.2	97.6	99	20170736B	97.0	96.6
67	201711098	96.3	96.9	100	20171041B	96.3	97.7
68	201712108	97.0	97.4	101	201708099A	96.7	97.0
69	201711100	96.4	97.2	102	201707093A	97.2	96.3
70	201712104	96.9	96.1	103	201709118A	97.9	96.5
71	201609095	95.8	97.9	104	201710131A	97.7	97.2
72	201708080	96.4	97.2	105	201709129A	97.6	97.1
73	201712114	96.8	97.3	106	201709120A	96.8	97.2
74	201712104	96.8	96.8	107	201609108A	96.2	97.6
75	20170943	96.4	96.8	108	201707085A	97.3	97.5
76	20170736	97.0	96.7	109	201709129A	97.7	97.1
77	20171053	97.4	96.8	110	201710131A	97.1	97.8
78	20170945	97.3	96.9	111	201707087A	97.0	97.2
79	20171052	97.1	96.3	112	201705059A	96.4	97.0
80	20170101	97.0	96.1	113	20170941	97.1	96.3
81	20170305	96.7	96.5	114	20170831	97.2	96.6
82	20170527	96.9	97.1	115	20170415	96.4	96.3
83	20170946	97.3	96.8	116	20170728	97.0	97.5
84	20170105	97.4	98.4	117	20171045	97.3	98.9
85	20170312	97.5	98.4	118	20180102	97.6	97.9
86	201710A038	96.1	96.1	119	20171042	96.6	97.0
87	201709A037	96.6	96.4	120	20170836	96.7	97.5
88	201710A039	96.2	96.9	121	20171248	96.5	98.5
89	201709A036	96.5	96.7	122	20171021	96.8	97.4
90	20170716A	96.1	96.7	123	20171019	96.5	96.8
91	20170718A	96.0	96.6	124	20170738	96.6	96.8
92	20170715A	95.3	96.4	125	20170511	96.9	97.3
93	20170207B	96.1	97.7	126	20170510	97.1	97.1
94	20170734B	96.5	97.7	127	VNA1S144	96.5	98.3
95	20170838B	96.5	96.8	128	VNA1S210	97.2	98.2
96	20171249B	96.9	97.0	129	VNA1S142 P AA	97.6	97.1
97	20171039B	96.0	96.5	130	VNA1S161	98.5	96.8

表 4(续)

序号 (number)	批号 (batch No.)	本法 (established method)	醋酸纤维素薄膜电泳法 (cellulose acetate membrane electrophoresis)	序号 (number)	批号 (batch No.)	本法 (established method)	醋酸纤维素薄膜电泳法 (cellulose acetate membrane electrophoresis)
131	VNA1S071	98.8	97.5	143	L0044411A	96.9	96.5
132	VNA1S159	98.4	96.5	144	W853506	96.3	96.1
133	A4AFB02322	96.8	97.7	145	W582905	96.1	96.6
134	A1AFB02152	96.4	97.1	146	4312101489	96.1	97.0
135	A4AFB04231	96.1	96.5	147	4312101431	96.0	96.9
136	A4AFB04681	96.1	96.7	148	4312101430	96.1	96.3
137	A4AFB03131	94.8	97.3	149	4312101414	96.8	97.3
138	116010LC	96.9	97.1	150	4312101453	96.2	97.1
139	M732A6661	96.8	97.5	151	4312101516	96.7	96.8
140	M732A6661	96.0	96.8	152	4312101413	96.5	96.6
141	L0144411A	96.2	97.2	153	4312101417	96.3	97.3
142	L1644411A	96.2	96.7	平均值 (mean)		96.7	97.1

3 讨论

3.1 蛋白浓度的选择

验证琼脂糖凝胶电泳法时,发现蛋白浓度和染色液的量影响琼脂糖凝胶电泳的测定结果。蛋白浓度越高,相应的纯度测定值越低,原因是浓度高时,制品中的杂蛋白逐渐显示出来,因此测定值逐渐降低。然而,浓度越高,主成分白蛋白过载的现象开始凸显,因此测定浓度适宜范围为小于 7.5%。《中国药典》2015 年版四部通则 0541 第三法“琼脂糖凝胶电泳法”规定:测定蛋白纯度时,应将蛋白浓度稀释至 1%~2% 的浓度。考虑到浓度越稀时,杂蛋白显示效率越低,因此本文采用 2% 的蛋白浓度测定样品。

3.2 染色液浓度及体积的选择

另一个影响因素是染色液的量。蛋白质染色深浅对于纯度扫描结果有较大影响,染色过度,脱色液洗脱时存在较大困难,导致背景不清晰,影响结果判定;而染色不足,白蛋白中的杂蛋白又无法正常显示,影响结果的准确度。本文考察不同染色液浓度和体积对质控品测定结果的影响^[13-14]。当染色液浓度为 0.35%、0.67% 时,染色液体积为 400、800 μL 时,测定结果无显著差异。然而当染色液体积为 400 μL 时,浓度为 0.35% 时,白蛋白染色不完全充分,存在空心

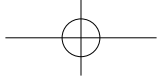
现象;而染色液浓度为 0.67% 时,琼脂糖凝胶电泳膜片偶见脱色不充分现象,基于仪器说明指导及试验结果,选择染色液浓度为 0.35%、染色液体积为 800 μL 的试验条件。

3.3 小结

本法具有操作简便,检测时间短,检测效率高,分辨率更高的特点;与醋酸纤维素薄膜法测定结果比较没有显著性差异 ($P>0.05$),测定结果可反映不同企业之间的产品杂蛋白数量和含量,反映各企业间产品的质量差异。

参考文献

- [1] 刘晓宇. 低温乙醇法工艺中影响蛋白收率的若干因素探讨[J]. 中国输血杂志, 2001, 14(6): 355
LIU XY. Discussion on several factors affecting protein yield in low temperature ethanol process[J]. Clin J Blood Transf, 2001, 14(6): 355
- [2] COLANTONIO DA, DUNKINSON C, BOVENKAMP DE, et al. Effective removal of albumin from serum[J]. Proteomics, 2005(5): 3831
- [3] 张丹, 陈蓓. 人血白蛋白工艺中多聚体的形成趋势及初步分析[J]. 中国输血杂志, 2005, 42(2): 909
ZHANG D, CHEN B. Polymer formation trend in human serum albumin process and preliminary analysis[J]. Clin J Blood Transf,



- 2005, 42(2): 909
- [4] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 附录通则 0541
ChP 2015. Vol IV[S]. 2015: Appendix General 0541
- [5] EP 9.0[S]. 2013: 2660
- [6] 汪小葛, 唐新, 徐友爱. Helena Epalyzer 二代全自动电泳仪在血清蛋白电泳中的应用评价[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(1): 88
WANG XG, TANG X, XU YA. Application evaluation of serum protein electrophoresis by the instrument of Helena epalyzer second-generation automatic electrophoresis[J]. Lab Med Clin, 2013, 10(1): 88
- [7] 郑铁生. 临床生物化学检验[M]. 第二版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 113
ZHENG TS. Clinical Biochemical Test[M]. 2nd Ed. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010: 113
- [8] 胡厚源, 杨振华, 张远慧. 琼脂糖凝胶电泳法测定血清肌酸激酶 MB 亚型[J]. 中华医学检验杂志, 1995, 18(6): 354
HU HY, YANG ZH, ZHANG YH. Determination of serum creatine kinase MB subtype by agarose gel electrophoresis[J]. Chin J Med Lab Sci, 1995, 18(6): 354
- [9] 李先平, 王敏, 杨江玲. 用 Helena SPIFE 琼脂糖凝胶电泳系统进行血清蛋白电泳[J]. 实用医学杂志, 2003, 19(12): 1371
LI XP, WANG M, YANG JL. Serum protein electrophoresis by the Helena SPIFE agarose gel electrophoresis system[J]. J Pract Med, 2003, 19(12): 1371
- [10] 陈扬. 十二烷基磺酸钠琼脂糖凝胶电泳尿蛋白电泳在海南地区老年肾脏疾病诊断中的应用[J]. 中国老年学杂志, 2013, 104(22): 5708
CHEN Y. Application of urine protein electrophoresis by sodium dodecyl sulfate agarose gel electrophoresis in the diagnosis of elderly kidney disease in Hainan[J]. Chin J Gerontol, 2013, 104(22): 5708
- [11] 陈鹏. SDS-AGE 尿蛋白电泳检测在糖尿病肾病中的临床价值[J]. 实验与检验医学, 2010, 28(3): 253
CHEN P. Clinical value of SDS-AGE urine protein electrophoresis in diabetic nephropathy[J]. Exp Lab Med, 2010, 28(3): 253
- [12] 陈星, 卢业成, 初德强, 等. 全自动毛细管电泳与琼脂糖电泳检测血红蛋白的比较[J]. 广东医学, 2009, 30(5): 778
CHEN X, LU YQ, CHU DQ, et al. Comparison of automatic capillary electrophoresis and agarose gel electrophoresis in detecting hemoglobin[J]. Guangdong Med, 2009, 30(5): 778
- [13] 陈芳, 陈久存. 蛋白质凝胶电泳及染色方法的几点改进[J]. 安康学院学报, 2007, 19(4): 78
CHEN F, CHEN JC. Improvements in protein gel electrophoresis and dyeing methods[J]. J Ankang Univ, 2007, 19(4): 78
- [14] 王时南. 氨基黑 10B 浓度和染色时间对人血清蛋白[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2000, 22(3): 340
WANG SN. Effect of amino black 10B concentration and staining time on the results of human serum albumin[J]. J Qiqihar Med Coll, 2000, 22(3): 340

(本文于 2019 年 10 月 21 日修改回)