一种用于人碱性成纤维细胞生长因子等电点测定的方法

石俊芳[1,2]，谭雅超[2]，冯笑[2]，薛巍[1*]（1.暨南大学生物医学工程系，广东 广州 510632；2.朗肽生物制药股份有限公司，广东 佛山 528000）

摘要：目的 建立一种用于检验人碱性成纤维细胞生长因子（hbFGF）理化检验的等电点聚焦电泳（IEF）分析方法。**方法** 通过对比不同IEF法试验条件筛选针对hbFGF蛋白的等电点测定的最优方法，并对该方法的专属性、精密度及耐用性进行方法验证。**结果** 两性电解质Bio-Lyte与Ampholyte（2∶1）体系为最优；PBS缓冲液不干扰该法；重复性的平均pI值为10.0，*RSD*为0.82（≤3.0%）；中间精密度的平均pI值为10.0，总*RSD*为0.98%（≤6.0%）；耐用性不同电压（460、480、500 V）的平均pI值为10.0，*RSD*为1.3%（≤3.0%）；耐用性不同电泳时长（70 min、90 min、110 min）的平均pI值为10.0，*RSD*为2.0%（≤3.0%）。**结论** 所建立的用于检测hbFGF蛋白等电点的IEF电泳法准确耐用，专属性强，稳定性高，可用于日常hbFGF蛋白的等电点检测。

关键词：人碱性成纤维细胞生长因子（hbFGF）；等电聚焦电泳法（IEF）；方法学验证

中图分类号：R927.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674-229X（2026）01-0012-04

Doi：10.12048/j.issn.1674-229X.2026.01.003

A Method for Determining the Isoelectric Point of Human Basic Fibroblast Growth Factor

SHI Junfang[1,2], TAN Yachao[2], FENG Xiao[2], XUE Wei[1*]（1.*Jinan University School of Biomedical Engineering, Guangzhou, Guangdong* 510632, *China*; 2.*Langtai Biopharmaceutical Co., Ltd., Foshan, Guangdong* 528000, *China*）

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an isoelectric focusing (IEF) analysis method for the physicochemical testing of human basic fibroblast growth factor (hbFGF). **METHODS** By comparing different IEF test conditions, the optimal method for determining the isoelectric point of hbFGF protein was screened, and the specificity, precision and durability of this method were methodologically verified. **RESULTS** The optimal system was the ampholyte system of Bio-Lyte and Ampholyte (2∶1). PBS buffer showed no interference with this method. The average pI value for repeatability was 10.0, with an *RSD* of 0.82% (≤3.0%). The average pI value for intermediate precision was 10.0, with a total *RSD* of 0.98% (≤6.0%). In terms of durability under different voltages (460, 480 and 500 V), the average pI value was 10.0, with an *RSD* of 1.3% (≤3.0%). In terms of durability under different electrophoresis times (70 min, 90 min, and 110 min), the average pI value was 10.0, with an *RSD* of 2.0% (≤3.0%). **CONCLUSION** The IEF method established for detecting the isoelectric point of hbFGF protein is accurate, durable and highly specific. It has high stability and can be used for the routine daily isoelectric point detection of hbFGF protein.

KEYWORDS: human basic fibroblast growth factor (hbFGF); isoelectric focusing electrophoresis (IEF); methodological validation

重组蛋白药物的质量控制是确保其安全性与有效性的核心环节，其中电荷异质性是反映产品翻译后修饰（如脱酰胺、糖基化）和降解情况的关键质量属性（CQA）之一，直接影响药物的生物学活性和批次间一致性[1,2]。人碱性成纤维细胞生长因子（human basic Fibroblast Growth Factor, hbFGF）作为一种重要的治疗性细胞因子，在创伤修复、血管生成等领域展现出巨大潜力[3]。由于其理论等电点（pI）较高（约9.6），且在生产和储存过程中易发生电荷变异，建立一种能够高效分离并精确表征其电荷特性的分析方法，对于hbFGF产品的理化检验至关重要。

等电点聚焦（isoelectric focusing electrophoresis, IEF）是一种基于蛋白质净电荷进行分离的电泳技术，因其对pI的具有卓越的分辨能力，已被广泛用于蛋白类药物电荷特性分析[4,5]。然而，将IEF成功应用于bFGF这类碱性蛋白的分析仍面临显著挑战。这些挑战主要集中在两性电解质体系的选择

基金项目：2022年佛山市南海区重点领域科技攻关专项（2230032004639）

作者简介：石俊芳，生物学博士，研究方向：生物制药　　***通信作者：**薛巍，教授，研究方向：医用高分子材料，E-mail：weixue_jnu@aliyun.com

和优化上[6]。稳定且线性的碱性pH梯度的构建是获得可靠结果的前提。载体两性电解质的化学性质，如其pH范围、组成和稳定性，直接决定了梯度的性能。研究表明，对于pI>9的蛋白质，常规的两性电解质体系可能因阴极漂移（cathodic drift）而导致梯度不稳定、分辨率下降和结果重现性差[7,8]。因此，筛选适用于碱性pH范围并能形成稳定梯度的两性电解质是本方法建立的首要任务，特别是对于像hbFGF这样易于聚集的蛋白，一个精心设计的电解质配方，通过电场中电荷均匀分布下的样品迁移和的稳定pH缓存体系下的样品聚焦，被证明是获得锐利、清晰条带并防止蛋白质变性的有效策略[9-11]。

针对上述挑战，本研究以hbFGF蛋白为分析对象，旨在开发并优化一种适用于其产品理化性质的IEF分析方法。重点研究不同两性电解质在碱性范围内的梯度性能，并对优化的方法进行系统性验证。通过对比优化前后电泳图谱的条带清晰度，以及评估优化后方法的精密度及耐用性，以建立了一套高效、稳定的分析方法，满足对于hbFGF产品电荷性质这一关键质量属性的监控要求，为产品的质量控制提供坚实、合规的分析手段。

1 材料与方法

1.1 材料

hbFGF蛋白来源于朗肽生物制药股份有限公司（批号：C202304009、SC202403001）；两性电解质Bio-Lyte（pH 3.0~10.0）购自美国Bio-rad公司；两性电解质Ampholyte（pH 3.0~10.0）购自上海麦克林生化科技股份有限公司；两性电解质Pharmalyte（8-10.5）购自美国Cytiva公司；两性电解质SERVALYT（3-10）购自德国SERVA公司；IEF Marker 3-10 Liquid Mix购自德国SERVA公司；丙烯酰胺、N，N'-亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵、磺基水杨酸、三氯乙酸、考马斯亮蓝G250、冰醋酸、磷酸购自上海麦克林生化科技股份有限公司；尿素购自湖南芙蓉制药有限公司；五水合硫酸铜购自国药集团；无水乙醇购自湘易康；氢氧化钠购自成都华邑药用辅料；甲醇购自Fisher Chemical；N，N，N′，N′-四甲基二乙胺（TEMED）购自MP Biomedicals。

1.2 仪器

水平电泳仪、电泳仪电源、恒温循环器均购自北京六一生物科技有限公司；凝胶成像仪购自上海勤翔科学仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 试剂配制

1.3.1.1 固定液 称取40 g磺基水杨酸、125 g三氯乙酸，加入适量纯化水溶解，加入300 mL甲醇，加水稀释至1 000 mL。

1.3.1.2 染色液 称取5 g五水合硫酸铜、0.4 g考马斯亮蓝G250，加入适量水溶解，加入100 mL冰醋酸、270 mL无水乙醇，加水稀释至1 000 mL。

1.3.1.3 脱色液A 称取5 g五水合硫酸铜，加入适量纯化水溶解，加入70 mL冰醋酸、120 mL无水乙醇，加水稀释至1 000 mL。

1.3.1.4 脱色液B 量取70 mL冰醋酸、250 mL无水乙醇，加入纯化水稀释至1 000 mL。

1.3.2 方法建立

1.3.2.1 等电聚焦电泳法 （1）电泳：取适量pH 3~10的两性电解质（不同厂家、不同比例）与适量的6 mol·L^{-1}尿素、15%丙烯酰胺、50%甘油，混匀，再加入10%过硫酸铵和TEMED，混匀，排气泡1 min，使胶在30~60 min内聚合，厚度为1.5 mm。等电聚焦电泳正极液为0.5 mol·L^{-1}磷酸，等电聚焦电泳负极液为1 mol·L^{-1}氢氧化钠。等电聚焦电泳预电泳参数为150 V预电泳30 min，4 ℃恒温。脱盐处理后的样品加入6 mol·L^{-1}尿素混合后上样，随后正式电泳按50 V 15 min→100 V 15 min→200 V 15 min→300 V 15 min→400 V 15 min→480 V 90 min的顺序进行。（2）固定：取下凝胶-玻璃板侵入含适量固定液的容器中，60 r·min^{-1}的速率摇床60 min。（3）染色：凝胶-玻璃板浸入含适量染色液的容器中，60 r·min^{-1}的速率摇床60 min。（4）脱色：凝胶-玻璃板浸入脱色液A的容器中，60 r·min^{-1}的速率摇床30 min，再将其浸入含脱色液B的容器中，60 r·min^{-1}的速率摇床60 min。

1.3.3 方法学验证

1.3.3.1 专属性 取PBS溶液（50 mmol·L^{-1}）作为样本基质按照已建立的方法进行电泳。

1.3.3.2 重复性 取6份hbFGF蛋白按照已建立的方法进行电泳，计算平均pI值和相对标准偏差（*RSD*）。

1.3.3.3 中间精密度 两名人员各取6份hbFGF蛋白按照已建立的方法进行电泳，计算平均pI值和*RSD*。

1.3.3.4 耐用性 各取3份hbFGF蛋白分别按下述条件进行电泳，①最终步骤电压分别为460、480、500 V；②最终步骤电泳时间为70、90和110 min；计算总*RSD*。

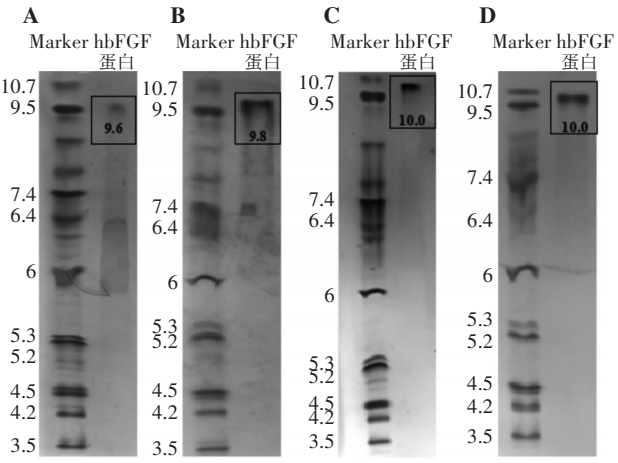
1.3.4 数据采集及分析

用CLiNX软件采集数据，Microsoft Excel软件处理数据。

2 结果

2.1 两性电解质的筛选与优化

对比4种两性电解质条件发现，当使用100% Ampholyte时（图1A），hbFGF蛋白的IEF图谱出现条带断裂、严重扩散的现象；当使用100% Bio-Lyte时（图1B），条带形状完整边缘锐利，但其下方出现明显的拖尾现象；当使用Bio-Lyte和Ampholyte比例为1∶2时（图1C），拖尾现象显著减轻，但条带半边仍有模糊断裂现象；当使用Bio-Lyte和Ampholyte比例为2∶1时（图1D），hbFGF蛋白聚焦为一条尖锐、对称、背景清晰的单一谱带，几乎无拖尾或扩散现象。综上，不同两性电解质对条带形态的影响显著，Bio-Lyte能有效改善条带模糊和断裂问题，而Ampholyte能缓解条带拖尾，将两者按照最优比例（2∶1）混合使用可使目的蛋白的条带的完整性和清晰度显著提升，最终确定两性电解质Bio-Lyte与Ampholyte（2∶1）体系为该法的最优条件。



注：A为100% Ampholyte；B为100% Bio-Lyte；C为Bio-Lyte和Ampholyte比例为1∶2；D为Bio-Lyte和Ampholyte比例为2∶1。

图1 两性电解质的筛选与优化

2.2 方法学验证

2.2.1 专属性 PBS溶液泳道未见可识别条带出现（图2），符合专属性验证要求，说明方法专属性良好。

2.2.2 重复性 人员A取6份hbFGF蛋白进行等点聚焦电泳，6份样品的平均pI值为10.0，*RSD*为0.82%（≤3.0%）（表1），说明该方法的重复性良好，方法稳定。

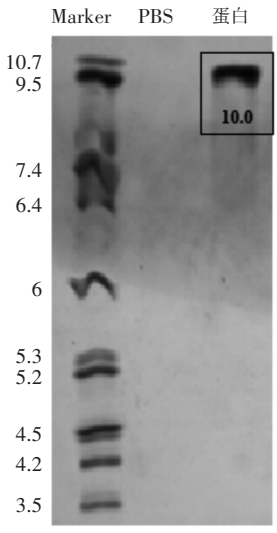


图2 IEF方法专属性验证结果

2.2.3 中间精密度 人员A和人员B各取6份hbFGF蛋白进行等点聚焦电泳，12份样品的平均pI值为10.0，总*RSD*为0.98%（≤6.0%），说明该方法用于检验hbFGF蛋白的精密度好，结果准确可信（表1）。

2.2.4 耐用性（不同电压和时长） 3份hbFGF蛋白分别以460 V、480 V和500 V进行电泳，9份样品的平均pI值为10.0，总*RSD*为1.3%（≤3.0%）；3份hbFGF蛋白分别以电泳时间为70 min、90 min和110 min进行电泳，9份样品的平均pI值为10.0，总*RSD*为2.0%（≤3.0%），见表2。

综上，该法的最终电压和最终电泳时长的改变不影响检测结果，说明该法用于检验hbFGF蛋白的适用性良好且性能稳定。

表1 IEF方法精密度验证结果

人员A				人员B			
pI值	标曲R^2	平均pI值	*RSD*/%	pI值	标曲R^2	平均pI值	*RSD*/%
10.1	0.96	10.0	0.82	10.2	0.97	10.0	1.19
10.1				10.1			
9.9				9.9			
9.9				9.9			
10.0				9.9			
10.0				10.1			
总*RSD*：0.98%							

表2　IEF方法耐用性验证结果

不同电泳聚焦电压耐用性					不同电泳聚焦时长耐用性				
电压/V	pI值	标曲R^2	平均pI值	*RSD*/%	时长/min	pI值	标曲R^2	平均pI值	*RSD*/%
	9.7					10.0			
460	9.8	0.97	9.9	1.53	70	9.9	0.97	10.0	0.87
	10.0					10.0			
	10.0					9.9			
480	9.9	0.96	10.0	0.55	90	9.9	0.95	10.0	2.03
	10.1					10.0			
	10.0					10.2			
500	10.0	0.96	10.0	0.36	110	9.9	0.97	10.0	1.19
	10.0					9.8			
总平均值：10.0			总*RSD*：1.3%		总平均值：10.0			总*RSD*：2.0%	

3　讨论

不同品牌的两性电解质因其合成工艺、分子量分布及缓冲组分的差异，会导致其在特定pH范围内的梯度稳定性、导电性及与蛋白质的相容性截然不同[7]。初始100% Ampholyte和100% Bio-Lyte两性电解质体系的失败印证了碱性蛋白IEF对试剂体系的高度敏感性：Ampholyte体系可能在电泳中的特定区域的电场或pH梯度易被干扰或破坏，导致蛋白在特定位置发生了局部的物理性的聚焦失败，条带表现为断裂或出现空洞；Bio-Lyte体系的部分有效使得蛋白在其pI点附近缓慢聚集，形成一个不尖锐的、被拉长的区域，即拖尾。而Bio-Lyte和Ampholyte不合适比例产生的拖尾，暗示其与Bio-Rad的混合物可能仍存在某种不利于hbFGF蛋白完全聚焦的化学性质。最终，Bio-Lyte和Ampholyte（2∶1）组合实现了最佳效果，表明该混合体系能够在hbFGF蛋白的pI附近（约9.6）提供一个极其稳定、线性且兼容性极佳的pH梯度场，最大限度地减少了蛋白质与凝胶介质的非特异性相互作用，从而获得了最优的聚焦效果。该IEF方法的建立，表明了混合配方能有效增强蛋白在聚焦过程中的抗干扰性，且混合带电粒子可在阴阳极之间能够形成一个更连续且更稳定的线性pH梯度，将两个两性电解质的优势最大化，凸显了通过系统性组合筛选以找到最佳两性电解质“配方”的必要性。

方法验证是确保分析程序适用于其预定用途的基石。本研究对优化后的IEF方法进行了专属性、精密度及耐用性验证。精密度关键指标的相对标准偏差（*RSD*）均符合预定的验收标准，这充分证明了该方法的可靠性与稳健性。耐用性验证表明该方法对微小参数变化不敏感，具备良好的稳定性，当关键参数（如聚焦时间、电压转换点）在预设范围内发生微小变动时，方法仍能保持稳定的性能（*RSD*符合标准）。

综上所述，本研究建立的IEF方法的专属性良好、精密度高、稳定性强，显著提升了hbFGF蛋白电荷性质分析的精确度与可靠性，为其质量控制提供了坚实的技术支持，同时也为其他高pI重组蛋白的IEF分析方法开发提供了有价值的参考。

参考文献

[1] Vlasak J, Ionescu R. Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2008, 9(6): 468-481.

[2] International Council for Harmonisation (ICH) Q6B. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products[S]. 1999.

[3] Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: Biology, pathophysiology and therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(3): 235-253.

[4] Righetti P G. Determination of the isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing[J]. J Chromatogr A, 2004, 1037(1-2): 491-499.

[5] Görg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics[J]. Proteomics, 2004, 4(12): 3665-3685.

[6] Righetti P G, Stoyanov A, Zhukov M Y. Immobilized pH gradients for isoelectric focusing of alkaline proteins: a mini-review and some experimental evidence[J]. J Chromatogr A, 846(1): 25-31.

[7] Bjellqvist B, Ek K, Righetti P G, *et al*. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications[J]. J Biochem Biophys Methods, 1982, 6(4): 317-339.

[8] Lin J, Tan Q Q, Wang S X. A high-resolution capillary isoelectric focusing method for the determination of therapeutic recombinant monoclonal antibody[J]. J Sep Sci, 2011, 34(14): 1696-1702.

[9] Manabe T. Isoelectric focusing[M]. Methods in Molecular Biology™, Vol.112, totowa N J: Humana Press, 1999: 1-10.

[10] Cifani P, Kentsis A. Towards comprehensive and quantitative proteomics for diagnosis and therapy of human disease[J]. Proteomics, 2017, 17(1-2): 1600079.

[11] Šlechtová T, Gilar M, Kalíková K, *et al*. Insight into the separation mechanism of capillary isoelectric focusing[J]. J Chromatogr A, 2015, 1409: 239-245.

（收稿日期：2025-10-29；在线出版日期：2025-12-18）