**《****基因表达的测定蛋白印迹法》国家标准**

**编制说明**

**（征求意见稿）**

**一、任务来源**

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会计划项目，项目编号为20180920-T-424。本项目由中国标准化研究院提出并归口，定于2019年完成。本标准起草工作由河北医科大学等单位共同完成。

**二、标准制定目的及意义**

蛋白印迹法（Western blot）是检测混合样品中单一特定蛋白的常用实验技术，蛋白质进行变性凝胶电泳后，将其直接转印到固相膜支持物进行免疫反应，是进行蛋白检测和鉴定的一种常规实验工具，采用免疫或生物化学方法对结合在膜上的蛋白进行分析、定量染色，同时可以准确阐述蛋白质-蛋白质之间的相互作用以及蛋白质与耦联体之间的相互作用。该技术集合凝胶上电泳分离的高分辨率和免疫检测特异性于一体，可以在复杂样品中鉴定和检测靶蛋白。蛋白印迹法在生命科学的各个领域有着广泛的使用，适用于各种各样的混合蛋白检测：天然样品中提取的蛋白混合物、动植物组织、微生物、血液、体液、培养的组织和细胞、基因工程下游产品。用于各种蛋白的检测有着特异灵敏、检测简单、结果可靠等等很多优势。

**三、标准制定原则和依据**

严格按照GB1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写规则》的要求，制定该项国家标准。

**四、主要工作过程**

主要起草单位河北医科大学开展的主要工作过程如下：

1、2017年1月，组成标准起草工作组，安排了工作进度。

2、2017年1月~2017年3月，起草工作组查阅了国内外有关标准中关于此方法的规定，调研了国内外有关基因表达的测定方法的情况，起草了标准讨论稿。

3、2017年4月，标准起草工作小组对标准讨论稿进行了讨论，形成第二轮标准讨论稿。

4、2017年5月，征求专家意见，形成第三轮标准讨论稿。

5、2017年3月~2017年11月，对目前多种基因表达的测定方法进行验证。

6、2017年12月，召开标准研制推进会，对标准研制过程中的问题进行讨论，商讨解决方案。

7、2018年1月，标准起草工作组邀请专家对标准讨论稿提出意见。

8、2018年2月~2018年5月，进一步对标准讨论稿进行修订，形成标准草案。

9、2018年7月，本标准经国家标准化管理委员会批准，获得立项。

10、2018年10月，完成标准征求意见稿和编制说明的初稿。

11、2018年11月，完成第三方论证，召开专家征求意见会，进行充分讨论，进一步根据专家意见修改和完善征求意见稿。

13、2018年12月~2019年2月，向全社会征求意见，并向中国科学院、中国农科院、清华大学、北京大学、复旦大学、中国医科大学、首都医科大学、河北省食品监督检验研究院、河北师范大学、河北医科大学第四医院、河北省人民医院、伯乐生物科学（中国）有限公司等高校、科研院所、企业、政府单位发函征求意见。截至到2019年3月1日，共收到7封意见书，提出征求意见46条。编写组对意见进行认真研究，采纳43条，未采纳3条，并对文中相应部分进行了修改与完善，形成了标准送审稿。

14、2019年5月，中国标准化研究院组织专家进行审查。

**五、主要技术内容**

在本标准制定过程中，随着研究的深入，先后完成标准讨论稿、草案和标准征求意见稿，标准内容不断完善，并趋于科学合理。根据需要，本标准的主要技术内容确定为：

（一）前言部分。给出了标准的起草原则、归口单位、起草单位及主要起草人。

（二）范围。给出了本标准的适用范围。

（三）缩略语。给出了本标准中用到的缩略语。

（四）术语和定义。给出了本标准中用到的相关术语及其定义。

（五）试剂和材料。给出了本标准中用到的化学试剂、缓冲液、试剂盒等。

（六）仪器设备。给出了本标准所需的仪器和设备。

（七）主要技术内容的说明

1、蛋白样品的选择与准备

阳性样品：真核细胞重组SM22蛋白

阴性样品：SM22基因敲除小鼠原代血管平滑肌细胞

测试样品：动物组织/细胞、植物组织/细胞

2、Western blot分析特异性的检测

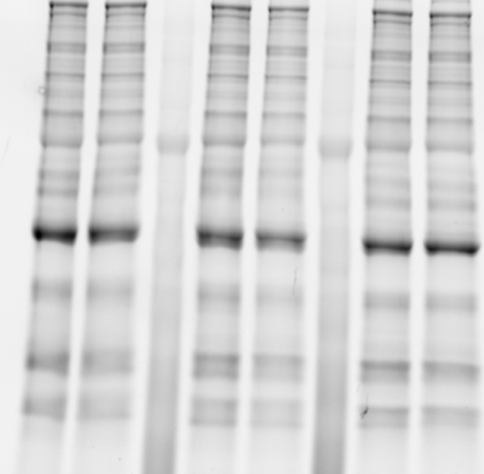
本实验选取真核细胞重组SM22蛋白作为阳性样品，SM22基因敲除小鼠原代血管平滑肌细胞作为阴性样品，进行Western blot分析，测定SM22的水平。如Fig.1所示，左侧阳性样品有特异性条带，而右侧阴性样品未见任何条带。提示，Western blot方法有着较强的特异性。



Fig.1 Western blot特异性分析

3、蛋白酶抑制剂对总蛋白提取的影响

本实验选取常见的蛋白酶抑制剂，按其说明书浓度使用，以不加蛋白酶抑制剂为对照，在相同条件下裂解小鼠胸腹主动脉血管组织，结果见Fig.1。加入适量的蛋白酶抑制剂，样品放置于室温1 d，蛋白电泳后条带依然比较完整（Fig.1A）；未加入蛋白酶抑制剂，样品放置于室温1 d，蛋白样品有较大程度的降解（Fig.1B）。表明，不同种类蛋白酶抑制剂均能保护蛋白不被降解。

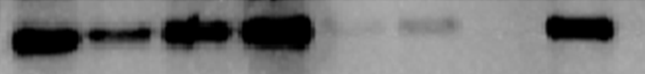
C:\Users\Zhouping\Desktop\2015-10-27 15hr 25min 14sec.tif

A B

Fig.1蛋白酶抑制剂对总蛋白提取的影响

4、蛋白定量过程对Western blot结果的影响

蛋白定量是对电泳前样品的大致情况有所了解，在样品的提取过程中，不同样品的蛋白量由于计算称重偏差、提取操作中的损失等等可能引起样品蛋白较大的差异，如果未经定量或定量不准确，可能会影响结果的判断。我们取等体积小鼠胸腹主动脉组织蛋白样品进行Western blot分析，测定内参GAPDH的水平。如Fig.2所示，未经定量的蛋白，因蛋白提取等操作中存在差异，导致上样蛋白量存在差异（Fig.2A）；通过定量结果调整上样体积后，不同蛋白浓度的样品，上样量可以保持一致（Fig.2B）。

A 

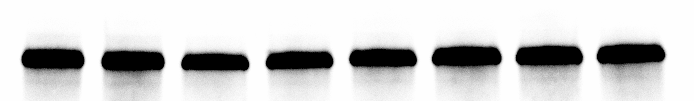
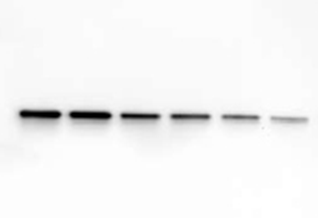
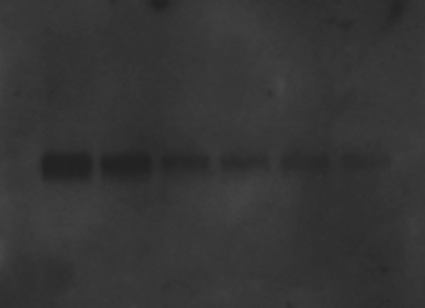
B

Fig.2 上样量对结果判断的影响

5、封闭液对条带特异性的影响

本实验选取5%的脱脂牛奶作为封闭液，以不加封闭液组为对照，在相同条件对小鼠胸腹主动脉血管组织进行Western blot分析，测定SM22蛋白的水平，结果见Fig.3。Fig.3A中未加封闭液，导致背景过高，严重影响结果判断；Fig.3B经5%的脱脂牛奶封闭1 h，背景干净、条带清晰。结果提示，转印结束后，需将对印迹膜上未被占据的蛋白结合位点封闭掉，以防止非特异性探针结合，如果没能将膜上位点全部封闭将会导致印迹膜出现较高的背景。



A B

Fig.3 封闭对Western blot结果的影响

**六、验证情况及结果分析**

为了进一步完善和确定检验方法，标准起草工作组分别委托中国科学院、中国农科院、河北师范大学、河北省人民医院和河北省食品质量监督检验研究院五家单位对标准进行验证，验证结果表明该方法可靠、重复性好、可操作性强，详细验证报告见附件。

**七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求。

**八、标准属性建议**

本标准为推荐性国家标准。

**九、贯彻国家标准的要求和措施建议**

标准发布实施后，建议由标准编制单位组织有关生产、检验、设计等单位进行宣传贯彻。

**十、其他应予说明的事项**

无其他事项说明。