**《动物源性I型胶原蛋白成分测定 聚丙烯酰胺凝胶电泳法》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《国标委综合[2018]41号》，项目编号“20180923-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2020年完成。本标准由中国科学院海岸带研究所等单位共同组成。

二、目的和意义

胶原蛋白（Collagen）是多细胞生物中含量最丰富、分布最广泛的蛋白质种类之一。在生物体内，胶原蛋白与聚多糖等成分一起形成精密有序的细胞间网络结构——细胞外基质（extracellular matrix，ECM），对机体细胞的发育、迁移以及机体组织的形成和功能发挥等均产生重要作用。有关胶原的研究与应用历史悠久。5000多年前，当如毛发之类的材料首次作为医用缝合线时，胶原“肠线”便得到了相应的发展，并用于伤口缝合。人们最初是通过鞣制胶原将皮革和皮毛进行防腐处理，以便得到易于保存、干燥后仍能机械助软的皮革。但是，由于胶原来源、结构与性能的复杂性，加上测试与研究设备的局限性，尽管人们已经广泛使用了胶原，但对其结构和性能的研究仍然不足。近年来，随着现代科学与技术的发展，相关领域的研究不断深入；同时分析与测试设备的日臻完善，也为胶原的深入研究创造了条件。另外，在资源、环境及可持续发展面临的问题日益严峻的今天，作为一种可再生资源的胶原，备受人们的关注，表现在人们对胶原所进行的应用研究开发工作逐渐增多，也许多方面均有不少突破。胶原已广泛应用于可食性包装材料、可降解日用品材料、胶原蛋白合成纤维等领域，由于胶原蛋白具有良好的生物相容性并能促进机体细胞的生长、迁移和增生，因此被广泛应用于生物医学材料、医学组织工程和医学美容等领域。如胶原海绵在创伤修复、快速止血中的应用 ；胶原胶在面部皮肤除皱、靶向药物制备及药物缓释中的应用；胶原复合材料在人造血管、人造皮肤和骨骼、人工眼角膜移植等医学组织工程中的应用。 2018年我国医疗器械市场5650亿元，其中生物植入材料约722亿，胶原基生物植入材料约377亿（止血材料约19亿），年复合增长率21.67 %。2018年我国化妆品市场规模1800亿元，含胶原化妆品125亿元(占7 %)，年增长率12 %；市场已有含胶原化妆品620种，国产产品仅32种，约占5 %。

胶原的种类很多，到目前为止，已经报道的基于化学结构上不同类型的胶原有27种，其中I型胶原占全部蛋白含量的90%以上，因此，在生物医学领域，研究最广泛的是I型胶原。I型胶原主要分布于骨、肌腱、韧带、皮肤等组织，目前I型胶原大多数是从哺乳动物的皮肤、肌腱与骨骼中提取，例如牛皮、牛肌腱、以及猪和牛骨。另外，还有部分学者从海洋和水产鱼类的皮肤中提取I型胶原。I型胶原来源广泛，价廉易得，且性能优良，是一种不可多得的天然生物高分子材料 。

I型胶原的结构由2条相同的α1链和1条不同的α2链组成，33% 的甘氨酸、10% 的脯氨酸和的10% 羟脯氨酸构成一条具有特征性的重复构型胶原肽链（α链），这种独特的氨基酸序列提供了一个II型聚脯氨酸的左手螺旋结构，在胶原形成的过程中，3条平行的II型聚脯氨酸的左手螺旋结构互相旋转缠绕形成一条右手三螺旋结构，被称为原胶原分子，一个胶原纤维片段或是原纤维包含5个平行的原胶原分子，氢键提供螺旋结构最初的结合，共价键提供附加的稳定。

I型胶原是一种最重要的细胞外基质蛋白，在支持与连接组织中起到重要的作用。由于其独特的纤维状结构及优良的生物学特性，使其得到广泛的关注。其优点可以集中体现为：良好的生物相容性、移除端肽后较低的抗原性、具有一定的粘附性和纤维不松脆性、吸水性、可缝合、较高的孔隙率可以为新生组织提供空间、其纤维可以整合进新生组织基质、可以与其他材料相结合、液压可以被转导等。胶原支架或凝胶如果应用于体内的话，会承受来自人体的生理或病理状态下的机械载荷，因此，保持它们结构和功能就显得尤为重要，另外，三螺旋结构完整性的I型胶原，具备较低的细胞毒性、更优良的生物相容性和生物可降解性，对于其在功能化妆品、功能食品和生物医用材料和组织工程如软骨组织工程、血管组织工程、人工皮肤肌腱等商业、生物领域的应用具有重要意义。目前，对于胶原三股螺旋完整性构象的检测方法众多，但或多或少都会有一定的局限性，急需建立统一有效的的标准化检测方法。

三、标准制定原则

**（一）标准编制原则**

本标准按照GB/T1.1-2009给出的规则起草。标准编制遵循“统一性、协调性、适用性、一致性、规范性”的原则。本标准是在广泛调查研究的基础上制定的。

**（二）标准制订主要依据**

1、标准编写遵循GB1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》的有关要求。

2、标准编写内容参考我国与农产品相关的法规、标准，包括GB/T 9695.23 肉与肉制品羟脯氨酸含量测定、GB/T 23527 蛋白酶制剂、GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法、GB 601—1988 标准滴定溶液的配制和标定、NYT 1663-2008 乳与乳制品中β-乳球蛋白的测定 聚丙烯酰胺凝胶电泳法、YY/T 1453-2016 组织工程医疗器械产品 Ⅰ型胶原蛋白表征方法等。

四、标准主要技术内容

**1 术语与定义**

I型胶原是指在广泛存在于动物体中的一种结构蛋白，起到支撑作用并能聚集成纤维，是胶原纤维组分中的一部分。它来源于表达在胶原α链上的 COLIA1 和 COLIA2 基因。所有的胶原均具有由三条聚肽链单元组成的三螺旋结构，其分子结构中具有典型的“Gly-X-Y”三肽重复序列（脯氨酸经常占据X位，羟脯氨酸占据Y位）。I型胶原富含甘氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸和 4-羟脯氨酸，含少量的硫且不含 L-色氨酸。羟脯氨酸是一种胶原蛋白特有的氨基酸，约占胶原蛋白的 9% - 13%，I 型胶原蛋白纤维能自然的溶解在稀酸和稀碱中。加热到 40℃以上后胶原蛋白可变性成单α-链（明胶）。

I型胶原的三螺旋结构是由三条α链组成的右手三螺旋结构，形成螺旋结构的三条α链可以是相同的，也可以由两种或三种不同的α链组成，三条链依次交错排列，以右手螺旋围绕中心轴线形成一种三螺旋结构。如果三螺旋结构在提取过程中没有因为酶、热等原因发生解螺旋情况，则称其具有三螺旋结构，相对应，部分解螺旋的胶原用百分含量表示。

**2 Ι型胶原的检测原理**

I型胶原最典型的结构特征是三螺旋结构，在α链围绕中心轴线形成的三螺旋结构中，所有的甘氨酸位于螺旋的中心，体积较大的侧链占据外围区域。这种氨基酸组成有利于三条单链围绕轴线紧密缠绕。自然的三螺旋具有抵抗如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶的能力，只能被特异的胶原酶水解。因此可以用酶法判断I型胶原三股螺旋结构。

**3 测定步骤**

**3.1 试样制备**

**3.1.1 胶原原样的试样前处理方法**

称取1g样品，精确到0.1mg，加适量0.5M乙酸溶解，定容至10mL。取10mL液体样品，磁力搅拌器搅拌4h，离心5min，取上清液分装，在4℃保存，备用。

**3.1.2胶原制品的试样前处理方法**

支架材料：将胶原支架裁剪成尺寸为10 mm×10 mm×24 mm 的试样，浸泡在 PBS溶液中，以备实验使用。按7.1.1操作。

补片：将胶原补片裁剪成尺寸为10 mm×10 mm×24 mm 的试样；再将裁剪后的试样清洗浸泡在0.1%~40% (W/V)的碱溶液中，浸泡0.5 ~ 24h。清洗至PH为5 ~ 8后生理盐水浸泡约0.5 - 48h，沥去多余水分，2 ~ 8℃组织捣碎后分散进酶解液中，2 ~ 40℃环境酶解1 ~ 72h；酶解完毕后调PH值至7 ~ 13，2 - 40℃静置2 ~ 24h；30~150目滤网过滤，去除未酶解物。20%-50%(W/V)盐溶液盐析，收集固形物，截留分子量为4000~8000的透析袋透析，去除多余离子和杂质，获得多型胶原，最后将多型胶原混合物分散至水中，调pH值至1~5，30~150目滤网过滤，去除析出物，将滤液盐析后透析，即可得到胶原。按7.1.1操作。

敷料：将胶原敷料裁剪成尺寸为10 mm×10 mm×24 mm 的试样，浸泡在 PBS溶液中，以备实验使用。按7.1.1操作。

**3.2 前处理**

将待测的7.1的样品平均分成两组，每组两只试管。一组于60℃水浴进行加热30min，称A管，另一组暂不做处理，称为B管。将两组样品中分别加入10 000 ~ 20 000 U/g胃蛋白酶溶液，在20℃（酶最适温度）反应5min后取出。取A、B反应液，加入样品制备液，100℃加热5min以使蛋白质变性，制备电泳样品。

**3.3 分离胶制备**

按表1配制12%分离胶20mL，混匀后加入到长短玻璃间的缝隙中，约60mm~70mm高。沿长玻璃板板壁缓慢注入约5mm高的水，进行水封。约30min后，凝胶与水封层间出现折射率不同的界线，则表示凝胶完全聚合，倾倒去水封层的水，再用滤纸条吸去多余水分。

**3.4 浓缩胶制备**

按表1配制3 % 浓缩胶10 mL，混匀后加入到已聚合的分离胶上方，直至距离短玻璃板上缘约5mm处。轻轻将样品槽模板插入浓缩胶内，约30min后凝胶聚合，再放置20min ~ 30min，使凝胶老化。

**表1 不连续凝胶的凝胶配方（垂直电泳）**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 贮液 | 3%浓缩胶 | 12%分离胶 |
| 丙烯酰胺单体贮备液 | 2.5 mL | 12 mL |
| 浓缩胶缓冲液贮备液 | 0.6 mL | / |
| 分离胶缓冲液贮备液 | / | 7.5 mL |
| 十二烷基磺酸钠溶液 | 50 μL | 300 μL |
| 水 | 1.82 mL | 10 μL |
| N, N, N’, N’-四甲基乙二胺溶液 | 5 μL | 20 μL |
| 过硫酸铵溶液 | 25 μL | 200 μL |

**五、主要工作过程**

1、组成标准起草小组

标准制定任务下达后，2014年6月，组成了标准起草工作组，明确了任务要求，安排了工作进度，成立了标准起草工作小组。会议研究讨论了当前I型胶原三股螺旋完整性构象的多种检测方法，但或多或少都会有一定的局限性，急需建立统一有效的的标准化检测方法，并提出了聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定动物源性I型胶原蛋白三股螺旋结构的可行性。

2、开展相关调研情况

为了更好的确定动物源性I型胶原蛋白三股螺旋结构测定的方法，判定聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定动物源性I型胶原蛋白三股螺旋结构的可行性，从 2014 年中旬开始，起草工作小组历时一年的时间，开展了国内外相关法律法规及标准情况调研工作。在调研中，主要查阅了国内外涉及胶原的相关标准。

国内相关产品标准有GB/T 22729-2008《海洋鱼低聚肽粉》、YY/T 1453-2016 《组织工程医疗器械产品 Ⅰ型胶原蛋白表征方法》。

国际上胶原的相关标准及检测方法如下所示：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 标准号 | 标准名称 | 备注 |
| ASTMF2212-2009 | 作为组织工程医疗产品用外科植入物和底层原材料的I型胶原特性的标准指南 | 美国材料实验协会 |
| ASTMF2212-2011 | 医用组织加固产品外科移植和培养基中作为开始材料的类型I胶原质的特性描述标准指南 | 美国材料实验协会 |
| DIN58924-2009 | 止血学VWF的胶原质粘合活性的测定用参考方法 | 德国的标准化主管机关（非政府） |
| NFV04-415-2002 | 肉,肉制品和水产品.L羟基脯氨酸含量的测定 | 法国标准（法国标准化协会） |
| NFV59-201-1988 | 骨胶原.羟基脯氨酸含量的测定 | 法国标准（法国标准化协会） |
| NFV59-202-1988 | 骨胶原.氮含量的测定 | 法国标准（法国标准化协会） |
| NFV59-203-1988 | 骨胶原.干物质的测定.脱水重量的损失 | 法国标准（法国标准化协会） |
| NFV59-204-1988 | 骨胶原.矿物质的测定.灰分 | 法国标准（法国标准化协会） |
| STAS9065/13-81 | 肉和肉品胶原蛋白含量检测 | 罗马尼亚标准 |
|  | 可食用明胶检测标准 | 美国明胶生产商院 |
| C.A.S.NO.9000-70-8 | 国际通用可食用明胶出口标准 | 国际食品添加剂出口委员会标准 JECFA |
| CAC/GL 21 - 1997 | 《建立及应用食品微生物标准的指南和准则》（《Principles and Guidelines for the Establishmentand Application of Microbiological Criteria Related to Foods》） | 国际法典标准 |
|  | 日本胶原蛋白肽品质规格 | 日本明胶·胶原蛋白肽工业协会 |

3、标准起草完善过程

依据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 1.2—2002《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》等标准编制要求，对《动物源性I型胶原三股螺旋结构测定》标准开展了研制工作，起草组分别于2014年9月、2015年4月、2016年5月、2017年8月召开五次工作组会议，并以电话、邮件形式多次与相关专家进行沟通，先后讨论了标准的地位、起草原则、框架、基本内容、核心条款等内容，并征求了企业、协会等相关单位意见，完成了《动物源性I型胶原三股螺旋结构测定—聚丙烯酰胺凝胶电泳法》国家标准（草案）。在此基础上，2018年11月征求了专家意见，起草组按照专家意见对标准内容进行了修改完善，形成了标准征求意见稿。

**六、方法验证及结果**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 验证单位 | 试样 | 方法 | 结果 |
| 山东省淡水渔业研究院 | 多种淡水鱼类提取的胶原试样 | 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 | 可行 |
| 淮海工学院 | 鱼皮、鱼鳞、鱼骨酸溶性胶原蛋白及酶促溶性胶原试样 | 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 | 可行 |

**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，本标准有助于《动物源性I型胶原三股螺旋结构测定—聚丙烯酰胺凝胶电泳法》等相关法律、法规、规章和强制性国家标准的实施。本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

**八、标准属性的建议**

本标准属于基础管理标准，建议作为推荐性标准批准发布。

**九、贯彻国家标准的要求和措施建议**

本标准可作为检测动物源性I型胶原蛋白三螺旋结构完整性的推荐标准。