ICS 07.080
CCS A 40

T/CS

团 体 标 准

T/CS 363—2026

细胞泛素化水平评估操作规程

Standard operating procedure for evaluation of cellular ubiquitination levels

2026 — 08 — 07 发布　　2026 — 08 — 07 实施

中国商品学会　　发 布

目　　次

前言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　基本要求 1
4.1　实验环境要求 1
4.2　人员要求 1
4.3　仪器设备要求 2
5　试剂与材料 2
5.1　试剂 2
5.2　材料 2
6　检测方法 2
6.1　样本制备 2
6.2　泛素化检测 3
7　结果分析与判定 3
7.1　结果分析 3
7.2　结果判定 3
8　质量控制 4
8.1　对照设置要求 4
8.2　重复性要求 4
8.3　实验过程控制要求 4
8.4　偏差控制要求 4
9　记录与报告 4
9.1　实验记录要求 5
9.2　结果报告要求 5
9.3　记录保存要求 5

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由天津和治友德制药有限公司提出。

本文件由中国商品学会归口。

本文件起草单位：天津和治友德制药有限公司、杭州研度技术服务有限公司、中国农业科学院原子能利用研究所。

本文件主要起草人：韩金明、刘新春、苏杰、张靖、李淑英。

细胞泛素化水平评估操作规程

1 范围

本文件规定了细胞泛素化水平评估操作的基本要求、试剂与材料、检测方法、结果分析与判定、质量控制、记录与报告。

本文件适用于以采用免疫学检测方法对培养细胞中蛋白泛素化水平进行检测、分析和评估的实验操作。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

泛素化 ubiquitination

泛素分子在泛素激活酶、泛素结合酶和泛素连接酶的作用下，以共价结合方式连接到底物蛋白上的翻译后修饰过程。

3.2

细胞泛素化水平 cellular ubiquitination level

细胞样本中目标蛋白或总蛋白发生泛素化修饰的相对程度，通常通过免疫学检测方法进行定量或半定量分析。

4 基本要求

4.1 实验环境要求

4.1.1 实验室应具备细胞培养、蛋白提取和免疫学检测所需的环境条件，并设置相对独立的样本处理区、试剂配制区、检测操作区和结果分析区，各区域应保持整洁、有序。

4.1.2 实验环境条件应符合下列要求：

a) 实验室环境温度应控制在 18 ℃～26 ℃，相对湿度应控制在 30%～70%；

b) 细胞培养环境应维持在 37 ℃，CO_2 浓度为 5%；

c) 蛋白提取及样本处理过程应在 2 ℃～8 ℃条件下进行；

d) 实验室供电系统应满足仪器设备运行要求，关键设备应配备备用电源。

4.1.3 实验过程中产生的废液、废弃耗材及生物废弃物应分类收集，并按实验室管理要求进行处置。

4.2 人员要求

4.2.1 操作人员应具备细胞培养、蛋白检测及结果分析相关知识，并能够按照规定完成细胞泛素化水平评估操作。

4.2.2 操作人员应经过岗位培训和技术考核，培训内容应包括：

a) 细胞培养和样本处理操作；

b) 蛋白提取和免疫检测操作；

c) 仪器设备使用方法；

d) 实验室安全防护要求。

4.2.3 经考核合格后，操作人员方可独立开展实验。涉及蛋白定量、免疫印迹及结果分析等关键操作的人员，应经过专项培训并具备相应操作能力。

4.2.4 实验记录应及时填写，记录内容应完整、真实，并由操作人员确认。

4.3 仪器设备要求

4.3.1 细胞泛素化水平评估所用仪器设备应满足实验要求，主要包括二氧化碳培养箱、低温离心机、电泳仪、转膜仪、成像系统及移液器等。

4.3.2 主要仪器设备应符合下列要求：

a) 二氧化碳培养箱温度控制偏差应不超过±0.5 ℃，CO_2 浓度控制偏差应不超过±0.5%；

b) 低温离心机温度控制范围应满足 2 ℃～8 ℃，转速误差应不超过设定值的±5%；

c) 电泳仪输出电压误差应不超过设定值的±10%；

d) 移液器应至少每 12 个月校准一次，并在校准有效期内使用。

4.3.3 仪器设备应按规定进行维护和校准，相关记录应完整保存。运行异常或超过校准有效期的设备不得用于实验检测。

5 试剂与材料

5.1 试剂

5.1.1 细胞泛素化水平评估所使用的试剂应满足蛋白提取、免疫检测和信号显色要求，并在有效期内使用。试剂的保存和使用条件应符合产品说明书要求。

5.1.2 细胞裂解液应选用适用于总蛋白提取的裂解液，使用前应充分混匀，并按规定比例加入蛋白酶抑制剂。蛋白酶抑制剂宜按每 1 mL 裂解液加入 10 μL 的比例配制，配制后的裂解液应在 2 ℃～8 ℃条件下保存，并于 4 h 内使用。

5.1.3 泛素抗体应根据检测目标选择适宜规格，工作浓度宜控制在 1:500～1:2000 范围内。二抗试剂应与一抗来源匹配，工作浓度宜控制在 1:2000～1:5000 范围内。抗体稀释液应现配现用，稀释后的抗体应按规定条件保存。

5.1.4 化学发光显色试剂应在使用前配制，配制后应在 30 min 内使用。出现沉淀、浑浊、变色或超过有效期的试剂不得用于实验。

5.2 材料

5.2.1 细胞泛素化水平评估所用材料应满足样本培养、样本处理和蛋白检测要求，并符合实验操作条件。

5.2.2 培养细胞样本应生长状态良好，无污染，检测时细胞汇合度宜控制在 70 %～90 %。每次检测所用细胞数量宜不少于 1×10^6个，并按实验要求进行收集和处理。

5.2.3 离心管应根据样本处理体积选择适宜规格，常用规格为 1.5 mL 或 15 mL，使用前应确认无污染、无破损。

5.2.4 电泳胶应根据目标蛋白分子量选择适宜浓度，分离胶浓度宜为 8 %～12 %。转膜材料宜采用 PVDF 膜或 NC 膜，使用 PVDF 膜时应先用甲醇浸润 10 s～15 s 后再进行转膜操作。

5.2.5 移液枪头、培养皿等一次性耗材应保持无菌状态，并在有效期内使用。受污染、破损或超过有效期的材料不得用于实验。

6 检测方法

6.1 样本制备

细胞样本应在规定培养条件下生长至适宜状态后进行收集，检测时细胞汇合度宜控制在70 %～90 %。样本制备应按以下步骤进行：

a) 弃去培养液后，使用预冷磷酸盐缓冲液清洗细胞 2 次；

b) 贴壁细胞采用细胞刮刀收集，悬浮细胞采用离心方式收集，离心条件宜为 1000 r/min～1500 r/min，离心 5 min；

c) 收集细胞沉淀后，按每 1×10^6个细胞加入 100 μL～200 μL 裂解液的比例加入预冷裂解液，并置于冰上裂解 30 min，期间每 10 min 混匀一次；

d) 裂解完成后，于 4 ℃条件下以 12000 r/min 离心 10 min～15 min，取上清液作为总蛋白样本；

e） 采用蛋白浓度测定方法测定总蛋白浓度，并根据检测要求调整蛋白浓度备用。

6.2 泛素化检测

6.2.1 蛋白质印迹法

采用蛋白质印迹法检测细胞泛素化水平时，应按以下步骤进行：

a） 将蛋白样本与上样缓冲液混匀后，于 95 ℃条件下加热变性 5 min，每孔蛋白上样量宜为 20 μg～40 μg；
b） 根据目标蛋白分子量选择适宜浓度的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离，浓缩胶电压宜为 80 V，分离胶电压宜为 100 V～120 V，电泳至目标条带充分分离；
c） 电泳结束后进行转膜，宜采用湿转法，在 100 V 条件下转膜 60 min～90 min；
d） 转膜完成后使用封闭液于室温封闭 1 h，随后加入泛素一抗，在 2 ℃～8 ℃条件下孵育 12 h～16 h；
e） 一抗孵育结束后，使用洗膜液清洗膜 3 次～5 次，每次 5 min，然后加入二抗于室温孵育 1 h；
f） 二抗孵育结束后再次洗膜 3 次～5 次，每次 5 min，加入化学发光显色试剂显影，并使用成像系统采集检测结果；
g） 采用图像分析软件分析目标蛋白泛素化条带灰度值，并与内参条带灰度值进行比值计算。

6.2.2 免疫沉淀法

采用免疫沉淀法检测细胞泛素化水平时，应按以下步骤进行：

a） 取总蛋白样本进行浓度测定，每次免疫沉淀所用总蛋白量宜为 500 μg～1000 μg；
b） 向蛋白样本中加入目标蛋白抗体，在 2 ℃～8 ℃ 条件下孵育 12 h～16 h，使抗体与目标蛋白结合；
c） 抗体孵育完成后加入蛋白 A 或蛋白 G 琼脂糖珠，继续孵育 2 h～4 h，孵育过程中缓慢混匀；
d） 孵育结束后，在 4 ℃条件下离心收集沉淀，并用预冷洗涤缓冲液洗涤 3 次～5 次，每次离心条件宜为 3000 r/min，离心 3 min；
e） 洗涤后的沉淀加入上样缓冲液，于 95 ℃条件下加热 5 min 后进行电泳分离；
f） 后续转膜、抗体孵育和显影步骤按 6.2.1c）～f）执行；
g） 根据目标蛋白泛素化条带强度进行结果分析，并与对照样本比较评估泛素化水平变化。

7 结果分析与判定

7.1 结果分析

7.1.1 检测结果应采用图像分析软件对目标蛋白泛素化条带灰度值进行分析，并以目标蛋白泛素化条带灰度值与内参条带灰度值的比值作为泛素化水平分析指标。

7.1.2 蛋白质印迹检测结果分析应按以下步骤进行：

a） 采集目标蛋白泛素化条带及内参蛋白条带图像，并确认条带清晰、无明显拖尾或背景异常；
b） 采用图像分析软件测定目标蛋白泛素化条带灰度值及内参蛋白条带灰度值；
c） 按公式（1）计算样本泛素化相对表达值：

$$R = \frac{A_t}{A_i} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

R——样本泛素化相对表达值；

A_t——目标蛋白泛素化条带灰度值；

A_i——内参蛋白条带灰度值。

7.1.3 当采用免疫沉淀法检测时，应采用目标蛋白泛素化条带灰度值进行分析，并与对照组灰度值进行比较，计算相对表达变化倍数。

7.1.4 同一样本应至少进行 3 次独立重复检测，并取平均值作为最终结果。

7.2 结果判定

7.2.1　结果判定应以试验组样本泛素化相对表达值与对照组样本泛素化相对表达值的比值作为判定依据。

7.2.2　试验组与对照组比较时，应按公式（2）计算泛素化变化倍数：

$$F = \frac{R_S}{R_C} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

F——泛素化变化倍数；

R_S——试验组泛素化相对表达值；

R_C——对照组泛素化相对表达值。

7.2.3　结果判定应符合下列要求：

a)　当 F＞1.2 时，判定为细胞泛素化水平升高；

b)　当 0.8≤F≤1.2 时，判定为细胞泛素化水平无明显变化；

c)　当 F＜0.8 时，判定为细胞泛素化水平降低。

7.2.4　检测结果存在明显异常值时，应重新进行检测并复核结果。

7.2.5　实验结果应结合重复检测结果进行综合判定，并形成检测记录。

8　质量控制

8.1　对照设置要求

8.1.1　细胞泛素化水平评估实验应设置阳性对照和阴性对照，并与待测样本在相同实验条件下同步进行检测。阳性对照应选用已知可诱导泛素化水平变化的样本或处理条件，阴性对照应选用未处理样本或不含目标检测成分的样本。

8.1.2　对照样本的制备、处理及检测步骤应与待测样本保持一致，包括样本收集、蛋白提取、电泳分离、抗体孵育及显影分析等过程。阳性对照和阴性对照检测结果应符合预期变化趋势，否则本次实验结果不应作为最终判定依据。

8.2　重复性要求

8.2.1　同一样本应至少进行 3 次独立重复检测，每次检测应独立完成样本制备、蛋白提取和泛素化检测过程。重复检测结果应进行统计分析，并取平均值作为最终检测结果。

8.2.2　重复检测结果之间的相对偏差应控制在合理范围内，同一样本重复检测结果的相对标准偏差（RSD）宜不大于 15%。当重复检测结果偏差超过规定范围时，应检查样本状态、试剂条件及检测过程，并重新进行检测。

8.3　实验过程控制要求

8.3.1　实验过程中所使用的试剂、材料和仪器设备应符合本文件第 4 章和第 5 章规定的要求。关键试剂应在有效期内使用，关键设备应在校准有效期内运行。

8.3.2　样本处理、蛋白提取、电泳分离、转膜、抗体孵育及显影分析等关键步骤应按照本文件第 6 章规定的方法进行，实验条件发生偏离时应记录具体情况，并对检测结果进行复核。

8.3.3　实验过程中出现条带异常、背景过高、对照结果异常或重复性不符合要求等情况时，应判定该次检测结果无效，并重新进行实验。

8.4　偏差控制要求

8.4.1　实验结果分析过程中，应对异常值进行识别和复核。当检测结果明显偏离重复检测平均值，且无合理解释时，该结果不得用于最终结果计算。

8.4.2　对实验过程中出现的样本异常、试剂异常、设备异常及操作异常等情况，应进行记录，并采取相应纠正措施后重新检测。

8.4.3　实验偏差处理过程应形成记录，并纳入实验结果审核内容。

9　记录与报告

9.1 实验记录要求

9.1.1 细胞泛素化水平评估全过程应形成完整实验记录，记录内容应真实、准确、完整，并具有可追溯性。

9.1.2 实验记录内容应至少包括样本信息、试剂信息、仪器设备信息、检测条件、检测结果及操作人员信息。样本信息应包括样本名称、样本编号和处理条件；试剂信息应包括试剂名称、批号和有效期；仪器设备信息应包括设备名称和编号；检测条件应包括样本处理条件、电泳条件、转膜条件和抗体孵育条件。

9.1.3 实验记录应在实验完成后及时填写，不得随意涂改。确需修改时，应保留原始记录并标注修改信息。

9.2 结果报告要求

9.2.1 检测完成后应形成结果报告，结果报告应包括样本信息、检测方法、检测结果、结果判定及检测日期等内容。

9.2.2 检测结果应包括目标蛋白泛素化相对表达值、重复检测平均值及结果判定结论。结果判定应依据本文件第 7 章规定执行，并明确标注样本泛素化水平为升高、降低或无明显变化。

9.2.3 结果报告应由检测人员填写，并经审核人员审核确认后方可出具。

9.3 记录保存要求

9.3.1 实验记录和结果报告应按实验室文件管理要求分类保存，保存内容应完整、清晰，并便于查阅。

9.3.2 原始实验记录、检测图像及结果报告的保存期限应不少于 3 年。电子记录应定期备份，纸质记录应妥善归档保存。