

国家标准《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》
(征求意见稿)

编制说明

《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》标准起草组
2025 年 06 月

目录

（一）工作简况	3
（二）国家标准编制原则、主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、 检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据），修订国家标准时，还包括修订前后 技术内容的对比	6
（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效 益	40
（四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关 数据对比情况	52
（五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明 未采用国际标准的原因	53
（六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系	53
（七）重大分歧意见的处理经过和依据	53
（八）涉及专利的有关说明	53
（九）实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议	53
（十）其他应予说明的事项	53

国家标准《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》编制说明

（一）工作简况，包括任务来源、协作单位、起草过程、国家标准主要起草人及其所做的工作等

1、任务来源

本标准根据国标委公布的2024年第二批国家标准计划项目（国标委综合发[2024]18号），本项目计划编号为20240919-T-469，名称为重组蛋白试剂 亲和力测定方法。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本标准由 联合起草。

2、目的和意义

重组蛋白试剂是指应用重组DNA或重组RNA技术，经宿主细胞表达和纯化得到的具有一定功能的蛋白质，主要用于生命科学基础研究，也是生物药、细胞免疫治疗及诊断试剂研发和生产过程不可或缺的关键生物试剂，由于其高度纯化和可控的生产过程，相比天然蛋白，其一致性高，稳定性好，在生化试剂市场中占有重要地位，已广泛应用于生物研究、生物制药、诊断和治疗等领域。在许多应用领域中，重组蛋白已经取代了传统的天然蛋白，因此，重组蛋白在生化试剂市场中的市场占比逐渐增加。根据Frost&Sullivan预计，全球重组蛋白市场从2015年的70亿美元增长到2020年的108亿美元，期间年复合增长率为9.0%，预计2025年市场规模将达到208亿美元，2020年至2025年间年复合增长率接近14.1%。国内重组蛋白市场规模从2015年的51亿人民币增长到2020年的145.4亿人民币，期间年复合增长率为23.3%，预计2025年市场规模将达到337.7 亿人民币，2020年至2025年间年复合增长率接近18.4%。

重组蛋白作为蛋白类试剂的核心产品，具有高技术壁垒、高附加值和高毛利的特性，且重组蛋白试剂品类繁多，客户需求多元化，因此长期以来我国重组蛋白类试剂的市场格局较为分散，海外品牌垄断头部市场。但是随着近年来国家对生物、医疗、卫生健康和药物开发等领域的支持力度不断加大，生命科学实验室的需求量明显增加带动了国内相关产业和企业的快速发展，国产生物科研试剂正在通过价格、供应链及服务优势提升市场竞争力，逐步打破了进口产品主导的行业局面，形成进口替代发展趋势。从数据上来看，2020年中国市场份额第一和第二名仍为R&D Systems和PeproTech，市占率分别为17.1%、15%。但是义翘科技、近岸蛋白、百普赛斯三家企业发展迅速，2020年3家主要国产厂商已经占据国内市场20.3%的份额，此外，国内生物制药、基因与细胞治疗、体外诊断、mRNA疫苗等下游应用领域快速发展，为重组蛋白国产替代创造良机。2021年百普赛斯重组蛋白业务

营收为3.26亿元，毛利率达95.96%。2021年义翘神州重组蛋白业务营收为3.1亿元，毛利率达94.31%。

与此同时，基础科研和药物研发对于试剂质量的要求显著提升。为得到稳定的实验结果，科研工作人员常常需要重复和再现实验操作。作为生物科研实验最常用的检测工具之一，重组蛋白科研试剂的质量稳定性对于减少数据的外源偏差以及产生可重复的科研结果十分重要。由于重组蛋白本身结构和生产流程的复杂性，生产商在工艺流程以及质量控制上稍有疏忽，试剂的质量就容易出现质量问题。对于重组蛋白产品的质量的控制，不仅需要进行结构及理化性质检测，同时也需要对蛋白的亲合活性、功能活性等生物活性进行检测。活性是蛋白类试剂的核心质量参数，其中蛋白亲合活性是用来评估可逆反应中产品蛋白与其作用分子（如抗体和抗原、受体和配体、酶和底物等）相互作用强弱的常数，通常用亲和力表示，是可以快速有效评价蛋白试剂质量稳定性的指标。同时，部分重组蛋白生产出来之后，必须对其进行亲和力测定以保证可以顺利的应用于下游应用。如在RIA、ELISA、免疫荧光检测（IFA）等免疫学实验中，抗体对特异性待测抗原的亲合活性必须高于一定的阈值，才能保证测定的灵敏度和可靠性。用重组蛋白偶联于固相进行亲和纯化靶标分子时，为避免强烈的洗脱条件造成靶标分子变性，需中等亲和力的蛋白，以便能用较温和的条件进行洗脱。但是目前，重组蛋白类科研试剂行业缺乏统一的生产标准、质量控制和质量保证体系，不同企业、单位和个人采用的亲和力测定方法不一，活性评价单位（效价、比活性、亲和力等）也各不相同，导致行业内产品质量良莠不齐，科研试验结果的可靠性难以保证。除此之外，进口抗体污染、物流周期长和储存问题以及任意更改产品编号等众多因素都可能导致重组蛋白科研试剂质量和稳定性下降。因此，研制重组蛋白亲和力测定标准，将是对重组蛋白类科研试剂行业质量保证体系的完善，也是开展基础科研和药物研发的基础保障；同时相比复杂的功能活性等试验，因污染、储运、分装等后续处理及批次生产对产品质量和稳定性的影响也可以通过亲和力的检测快速有效地反应出来，可以作为后续自身、第三方及采购者对相关产品质量检测的一个重要参考标准。因此，重组蛋白亲和力测定标准的研制和实施，将是企业、消费者和质检部门对相关产品的质量检测的重要参考，是进一步提升产品质量并提高产品稳定性，促进产业健康发展的重要环节。

据调查，现有重组蛋白试剂主要包括重组抗体（将特定抗体的基因导入表达系统，使其在大规模生产中得以表达和纯化的蛋白质）、重组酶（如重组DNA聚合酶等，可用于DNA扩增、蛋白质的修饰和合成）、重组细胞因子（通过基因工程技术获得的人工合成的细胞因子，可作为生化试剂广泛用于细胞培养、细胞信号传导和治疗等领域）、标记蛋白（包

括生物素标记蛋白、荧光标记蛋白等）、其它常规重组蛋白（包括靶点蛋白、抗原等）。为提升产品质量和服务，进口品牌供应商如PeproTech、赛默飞、罗氏等都已开展蛋白产品的全面验证工作，包括通过向科研用户收集检测报告以及搭建验证数据库等方法，也制定了一系列重组蛋白亲和力的测定方案或测定方法开发验证指南。国内生产企业如北京百普赛斯等，也使用ELISA、SPR、BLI等多种平台，根据蛋白的不同应用需求开展相应的亲和活性质量控制，保证产品的质量和稳定性。

通过文献、各个公司产品的验证报告及相关团体、行业标准中对重组蛋白亲和力测定/验证指南中相关方法的参考，我们发现，近年来，ELISA、SPR/BLI技术和ITC技术是各个单位个人进行蛋白亲和力测定选用最多的几个技术。其中，ELISA技术（酶联免疫吸附试验）是最经典的蛋白亲和力分析方法之一，具有成本低、操作简单等优势，在常规蛋白亲和力检测中广泛应用。但采用ELISA方法进行亲和力分析时也存在一些局限性：1）由于其依赖二抗及酶放大效应，检测相同标签蛋白或较弱活性蛋白时，不易获得准确结果；2）ELISA属于终点检测法，无法检测蛋白结合动力学情况。而SPR/BLI技术刚好可以弥补ELISA的不足，这两个技术极为类似，具有无需标记、灵敏度高，测量范围广，可显示结合动力学情况等优势。近些年，SPR技术趋近成熟，被2020版《中国药典》四部正式收录，美国国家标准与技术研究院（NIST）、中国计量科学研究院、北京化工大学等单位已经将SPR方法应用于蛋白活性浓度定量和标准物质互换性评价，国产SPR分子互作仪相继面世，新产品开始参与市场竞争，实现技术多元化。其中北京英柏Inter-Bio公司的SPR分子互作仪整体稳定性，亲和力测定数据结果重复可靠，在测定冠状病毒刺突蛋白（Spike Protein）受体结合结构域（RBD）与宿主细胞受体ACE2的结合亲和力， $KD \approx 0.2nM$ ，与文献中Biacore S200上获取的数据非常相近。2022年1月，英柏Inter-Bio独家首创推出了定制化的SPR技术产品——在线蛋白活性检测仪Lark-10，与液相色谱联用，同时实现复杂样本的色谱分离与亲和检测。而据研究报道，相比BLI技术，SPR技术偶联低，产生的数据要更为干净、准确，数据重复性及稳定性、准确度和可靠性上更好，因此我们标准中加入SPR技术作为ELISA的补充。而ITC测定的是分子间因为价键重组所造成吸热或者放热信息，可以给出结合与否，结合强弱，结合比例，和结合的真正热力学信息，对于比较弱的亲和力，其结果较SPR/BLI技术要更为标准，但是因为我们的检测对象是重组蛋白试剂，太低的亲和力一般无法成为市场认可的试剂产品，而且ITC技术其样品需求量较大，实验通量低，不适合大批量测定，所以对于重组蛋白试剂产品的亲和力检测来说不是必须的，我们暂时不考虑加入该方法。

因此，基于重组蛋白试剂的快速发展和应用场景的快速扩张的现状和重组蛋白试剂质量控制的要求，本项目基于科研、生产、监管等不同需求及产品质量提升和产业发展要求，研制国家标准《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》，用于在科学研究、生产和应用过程中测定重组蛋白的亲和力，对提升重组蛋白试剂的质量和稳定性，规范行业市场具有重要的现实意义。

3、协作单位

本标准由 等单位共同起草。

4、标准编制过程和主要工作过程

（1）2023 年 3 月至 2023 年 7 月，标准起草单位组织相关技术人员对《重组蛋白试剂亲和力测定方法》标准项目进行了预研，课题组成员广泛收集了国内外涉及重组蛋白 亲和力测定及评价相关的标准、文献，了解了国内外相关技术动态，并且明确了工作思路和进程安排，分析了通过前期的实验摸索、反复论证，确定了本标准方法设定的重要参数，开展了实际样品的检测。然后依据 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》等标准编制要求，对本标准开展了起草工作。

（2）2023 年 11 月，起草工作小组完成了《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》国家标准（草案）并于 2023 年 12 月经立项答辩后于 2024 年 5 月经国家标准化管理委员会批准，获得立项。

（3）2024 年 5 月收到全国生化检测标准化技术委员会转发的国标委综合[2024]18 号《国家标准委关于下达 2024 年第二批国家标准制修订计划的通知》立项文件，计划编号：20240919-T-469。

（4）2024 年 5 月至 2025 年 6 月，进行《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》标准的起草研制工作。完成了《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》标准的编制说明，并对全国生化检测标准化技术委员会汇报了《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》标准（草案）进一步完善和修改情况，向全国生化检测标准化技术委员会提交了《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》标准（征求意见稿）和编制说明。

5、国家标准主要起草人及其所做的工作

标准起草工作组主要成员有：

标准起草工作组成员及其所做的工作：

（二）国家标准编制原则、主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据），修订国家标准时，还包括修订前后技术内容的对比

1、标准编制原则

本文件依据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》和GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》，并参照GB/T 6379.1-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第1部分 总则与定义》和GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第2部分 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》的规定进行编写和表述。

项目来源于国家重点研发计划项目《蛋白类生物产制品质量检测 and 计量溯源技术》（2021YFF0600800）。

2、确定国家标准主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据）

2.1 酶联免疫吸附法（ELISA）

2.1.1 测定原理

将靶标包被于固相载体表面，加入系列梯度浓度的待测重组蛋白样品，在平衡条件下使其与靶标结合后，通过酶标抗体或其他显色系统进行定量检测。通过分析不同浓度样品对应的吸光值，绘制结合曲线，采用非线性回归法拟合计算得到平衡解离常数（ K_d ）来指示亲和力大小。

2.1.2 试验步骤

2.1.2.1 靶标包被

2.1.2.1.1 包被固定靶标

用适量包被液稀释靶标至合适浓度（过量），一般为 $1\ \mu\text{g/mL}$ ~ $10\ \mu\text{g/mL}$ ，以每孔 $100\ \mu\text{L}$ 的量将稀释好的靶标溶液加至酶标板中，然后将酶标板于 37°C 恒温器中孵育2~3小时或者 4°C 孵育12~16小时。

靶标根据待测样品的应用需求进行选择，靶标是待检样品对应的预期靶标分子，应尽量是标准物质或经过充分的理化分析（包括：HPLC、BCA、UV、SDS-PAGE等）和生物活性分析（包括但不限于：ELISA、SPR/BLI、FACS等），靶标分子一般用包被液稀释至 $1\text{--}10\ \mu\text{g/mL}$ 使用。如下图所举例。

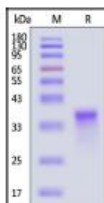
理化分析：

(a) Human / Cynomolgus Claudin-18.2, His, Twin-Strep Tag产品报告

Description	
Source	SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag(SPD-C52H3) is expressed from human 293 cells (HEK293). It contains AA Arg 319 - Lys 537 (Accession # QHD43416.1). Predicted N-terminus: Arg 319
Molecular Characterization	This protein carries a polyhistidine tag at the C-terminus. The protein has a calculated MW of 26.5 kDa. The protein migrates as 32-35 kDa when calibrated against Star Ribbon Pre-stained Protein Marker under reducing (R) condition (SDS-PAGE) due to glycosylation.
Specifications	
Physical Appearance	White powder
Protein Content	Verified by one or more methods from UV280/SDS-PAGE/BCA/Bradford/Lowry.
Endotoxin	Less than 1.0 EU per µg by the LAL method.
Purity	>95% as determined by SDS-PAGE. >90% as determined by SEC-HPLC, and 30-40 kDa verified by MALD.
Formulation	Lyophilized from 154 µL bulk protein in a 0.2 µm filtered solution of PBS, pH7.4 with 10% trehalose as protectant.
Bioactivity	Measured by its binding ability in a functional ELISA. Immobilized Human ACE2, Fc Tag (Cat. No. AC2-H5257) at 2 µg/mL (100 µL/well) can bind SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag (Cat. No. SPD-C52H3) (QC tested). The bioactivity was comparable to standard batch.



Reconstitution It is strongly recommended to reconstitute the lyophilized SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag with 167 µL sterile deionized water to a stock solution of 600 µg/mL. Solubilize for 30 to 60 minutes at room temperature with occasional gentle mixing. Avoid vigorous shaking or vortexing.	Minimal volume for aliquot To avoid surface adsorption loss and inactivation, the reconstituted protein MUST NOT be aliquoted to less than 10 µg per vial. Under the following conditions, Carrier protein (0.1% (W/V) BSA or HSA) MUST be included in reconstitution buffer. 1. Aliquots of less than 10 µg/vial; 2. Long term storage. 3. The concentration is less than the recommended reconstitution concentration published on the COA;
--	---

SDS-PAGE SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag on SDS-PAGE under reducing (R) condition. The gel was stained with Coomassie Blue. The purity of the protein is greater than 95% (With Star Ribbon Pre-stained Protein Marker).		Shipping and Storage The product is shipped at ambient temperature. Upon receipt, store it immediately at -20°C or lower for long term storage. This product is stable after storage at: 1. -20°C to -70°C for 12 months in lyophilized state from date of receipt; 2. -70°C for 3 months under sterile conditions after reconstitution. Once reconstitution, store the stock solution at -70°C immediately and avoid repeated freeze-thaw cycles!
--	--	---

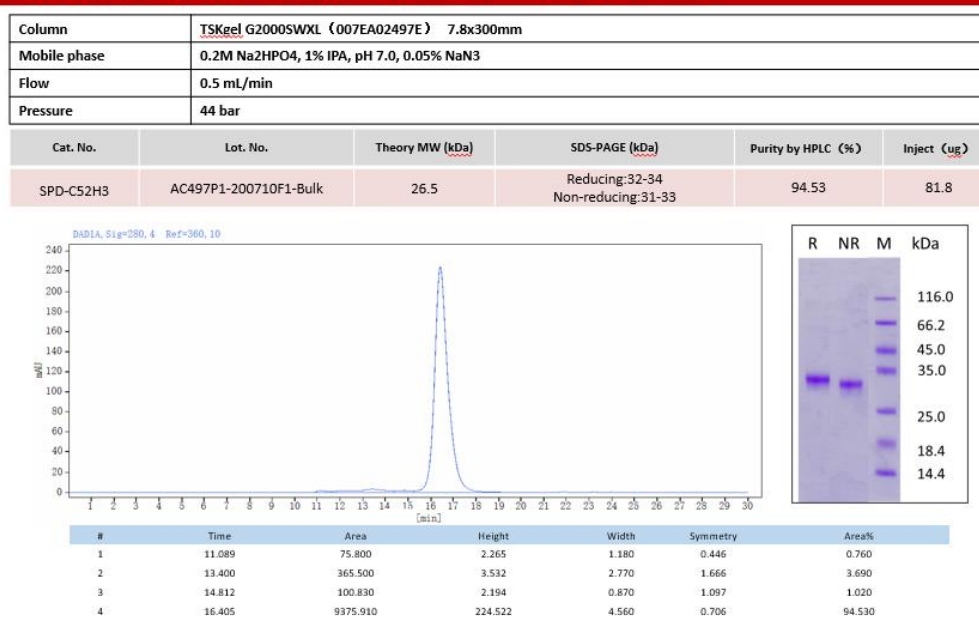
Contact Information:
+1 800-810-0816 (North America)
+86 400-682-2521 (Asia & Pacific)
+86 400-682-2521 (China)

Updated by Qian Liu
This document has been electronically produced and is valid without a signature
For further assistance, please contact our technical support team at: TechSupport@acrobiosystems.com
Please visit www.acrobiosystems.com/A655.html for e-copy of this certificate of analysis.

Aug.16,2024

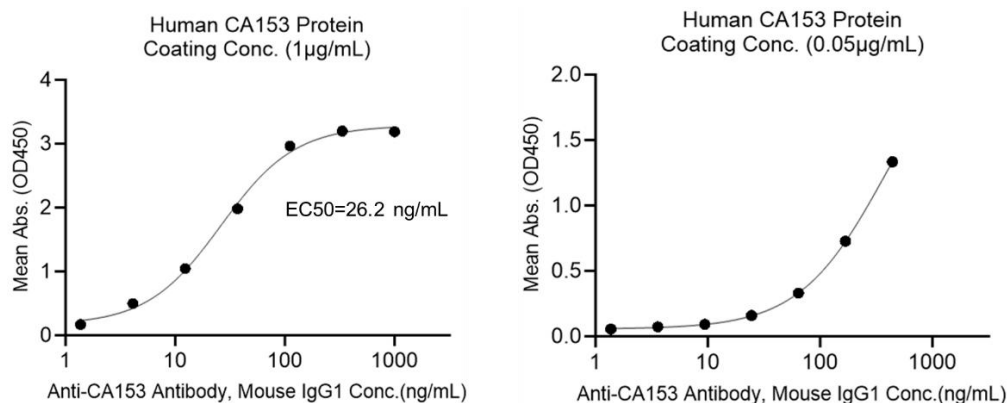
(b) SARS-CoV-2 (COVID-19) S protein RBD, His Tag产品报告

SARS-CoV-2 (COVID-19) S protein RBD, His Tag (MALD verified) HPLC Test Result

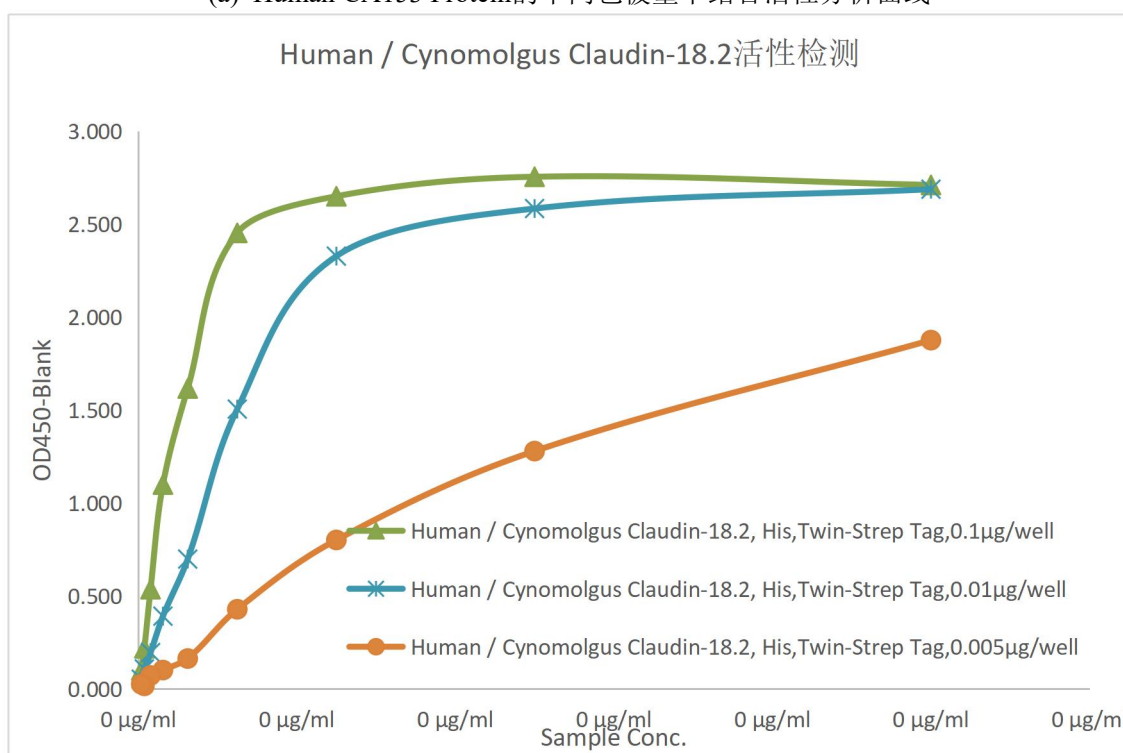


(c) SARS-CoV-2 (COVID-19) S protein RBD, His Tag的HPLC报告

生物活性分析:



(a) Human CA153 Protein的不同包被量下结合活性分析曲线



(b) Human / Cynomolgus Claudin-18.2的不同包被量下的结合活性分析曲线

包被液根据待包被靶标特性进行选择,一般采用pH 9.6的0.05 mol/L碳酸盐缓冲液。碳酸盐缓冲液因其良好的稳定性和广泛的适用性而被广泛使用,但如果所用的包被的靶标分子在碱性条件下不稳定,可选择pH值较低的缓冲液,如磷酸盐缓冲盐或Tris-Hcl缓冲液。目前常用的包被液的种类及选择如下:

- (1) 10mM磷酸盐缓冲液, pH 7.4 (1 \times PBS)
- (2) 50mM碳酸盐缓冲液, pH 9.6
- (3) Tris-Hcl缓冲液, pH7.0 - 8.0

2.1.2.1.2 清洗

弃去酶标板中的液体，在吸水纸上轻轻拍干。然后每孔加入200 μ L洗涤缓冲液，室温静置3 min后弃去酶标板中的液体并在吸水纸上轻轻拍干，重复3~5次。或使用微孔板自动洗板机等其它等效方式进行清洗。

洗涤缓冲液应选择含有适量表面活性剂（一般用0.05%~0.1%的吐温-20）的PBS或其它等效缓冲溶液，一般为含非离子型洗涤剂的中性缓冲液，如PBS或TBST（Tris缓冲盐水加0.05%吐温20），pH值通常为7.4。

目前常用的洗涤缓冲液的种类及选择如下表：

洗涤液类型	配制	使用场景或选择依据
PBS-T（磷酸盐缓冲液+吐温-20）	PBS（pH 7.2~7.4）+ 0.05% Tween-20	最常用的洗涤液，适用于大多数 ELISA 检测，能有效去除非特异结合，保持抗原/抗体活性。
TBS-T（三羟甲基氨基甲烷缓冲液+吐温-20）	TBS（pH 7.4~7.6）+ 0.05% Tween-20	在某些情况下对蛋白更稳定，适用于对磷酸盐敏感的检测系统或特定抗体体系。
去离子水+Tween-20	纯化水 + 0.05% Tween-20	临时替代方案，成本低，但缓冲能力差，主要用于条件受限下的快速检测。
含高盐缓冲液（如 PBS + 0.3M NaCl）	PBS + 高浓度 NaCl	用于减少背景或非特异性结合，尤其适用于背景高或结合不稳定的系统。
加蛋白封闭剂的洗涤液（如 PBS-T + 0.1% BSA）	PBS-T + 低浓度 BSA（或牛血清白蛋白）	适用于结合特异性较差或检测灵敏度较高的体系，可进一步降低非特异背景信号。

2.1.2.1.3 封闭

加入足量的封闭液至酶标板中，37℃恒温器孵育1.0~1.5 h。

封闭液应选择含有较高浓度蛋白（如2%~5% BSA）的PBS或其他等效缓冲溶液。

目前常用的封闭液的种类及选择如下表：

封闭液类型	主要成分	使用场景或选择依据
BSA 封闭液	1~5% 牛血清白蛋白(BSA) 于 PBS 或 TBS 中	使用最广泛，适用于大多数 ELISA 体系，蛋白纯度高，背景低，适合检测亲和力较强的抗体
脱脂奶粉封闭液	1~5% 脱脂奶粉于 PBS 或 TBS 中	成本低，封闭效果好，但易与某些抗体或抗原发生交叉反应，适合初筛实验或亲和力较强体系
鱼明胶封闭液	0.5~5% 鱼明胶于 PBS 或 TBS 中	适用于抗体或抗原易与乳制品蛋白发生非特异反应的体系（避免使用 BSA 或脱脂奶粉）
商业封闭液（如 SuperBlock 等）	多种蛋白与添加剂的复合配方	推荐用于对重复性、灵敏度要求较高的实验或商业化试剂盒，封闭更快速、效果稳定
非蛋白封闭液	聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮等成分	适用于对动物源蛋白过敏或干扰敏感的体系，或用于某些特殊标签抗体的检测
血清封闭液	5~10% 正常动物血清（如牛、羊）	可用于减少 Fc 介导的非特异结合，适合抗体识别 Fc 区域或使用细胞样本的检测体系

2.1.2.1.4 清洗

重复步骤2.1.2.1.2。

2.1.2.2 包被靶标浓度验证（可选）

将梯度稀释的待测样品溶液以每孔100 μ L的量加入第一块靶标包被板中，重复5个孔，孵育1个小时。将第一块板中三份相同浓度的稀释液放入一个管中，每个稀释液取100 μ L加入第二块靶标板中，重复两个孔，孵育1个小时。对两块板进行清洗，二抗孵育，显色，用酶标仪测OD值。

以得到的OD值为纵坐标，对应的抗体浓度为横坐标，对两块板的结果绘制结合曲线，如果两条曲线之间的差值小于10%，则说明该包被靶标的浓度符合要求，如果大于10%，则说明该包被靶标浓度过高，需对靶标进行稀释后重新制备靶标包被板。

2.1.2.3 待测样品准备

需明确待测样品中含有的重组蛋白的质量或浓度。

固体样品：取适量样品用稀释液溶解配置母液。

液体样品：取适量待测样品用稀释液稀释配置母液。

根据需要将母液用稀释液以2~5倍进行梯度稀释，获得系列梯度浓度待测样品溶液，记录其摩尔浓度，一般需要稀释8~10个浓度备用。

待测样品要求如下：

- （1） 使用有证的标准样品/物质，或经过充分验证的样品作为阳性对照用于方法学参数的确认；
- （2） 需已知待测样品的质量或者浓度；
- （3） 检测前确保待测样品的澄清度和纯度，纯度最好> 90%；明确样品的基质，如有杂质，需通过离心去除沉淀物或悬浮物质，并重新测定浓度；避免使用反复冻融循环的样本；
- （4） 检测时需要根据待测样本的浓度，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于最佳检测范围。根据待测样本含量高、中、低的不同，分别采取不同的稀释方案。

稀释液根据待测样品特性选择适宜pH的PBS或其它等效缓冲溶液，一般使用PBS或TBS系列缓冲液，并加入一定浓度的表面活性剂（如0.05% Tween-20），以减少非特异结合。此外，在稀释液中添加BSA，以降低背景信号，并增强抗体稳定性。

目前常用的稀释液的种类及选择如下表：

稀释液类型	配制	使用场景或选择依据
TBS-T+0.5% BSA(三羟甲基氨基甲烷缓冲液+吐温-20)	TBS (pH 7.4–7.6) + 0.05% Tween-20+0.5% BSA	最常用的稀释液，适用于大多数 ELISA 检测，能有效去除非特异结合，保持抗原/抗体活性。
PBS-T+0.5% BSA(磷酸盐缓冲液+吐温-20)	PBS (pH 7.2–7.4) + 0.05% Tween-20+0.5% BSA	常用的稀释液，适用于大多数 ELISA 检测，能有效去除非特异结合，保持抗原/抗体活性。

2.1.2.4 亲和力测定

2.1.2.4.1 加样

将梯度稀释的待测样本各取100 μL 加至2.1.2.1制备的靶标包被板中，每个稀释度的待测样品重复3个孔，以100 μL 的稀释液作为空白对照。37℃恒温器中孵育30~60 min。

2.1.2.4.2 清洗

重复步骤2.1.2.1.2。

2.1.2.4.3 酶标抗体孵育

根据待测样本的宿主来源选择酶标抗体，按说明书选择抗体稀释液稀释酶标抗体，每孔加入100 μL ，室温孵育30~60 min。

2.1.2.4.4 清洗

重复步骤2.1.2.1.2。

2.1.2.4.5 显色与终止

每孔加入100 μL 或说明书推荐量的显色工作液。避光孵育15~30 min后立即加入100 μL 终止液，结束显色反应。

根据不同的显色系统（一般用酶标抗体）以及不同指标（动态范围、动力学速率和检测时间等）选择适宜的显色底物，配置或购买相应的显色工作液。在酶联免疫吸附试验（ELISA）中最广泛使用的两种酶是辣根过氧化物酶（HRP）和碱性磷酸酶（AP），其对应的显色底物包括：TMB、OPD、PNPP和BCIP/NBT等。

目前常用的显色底物及工作液类型如下表：

显色底物类型	适用酶种类	主要特点
TMB 显色底物/工作液	HRP	灵敏度高、背景低、显色稳定，显蓝色产物（加酸变黄色，450 nm 检测）。
OPD 显色底物/工作液	HRP	应用广泛、灵敏度好、发色快速，405 nm 或 492 nm 检测。

PNPP 显色底物/工作液	AP	灵敏度高、发色快，显黄色，405 nm 检测。
BCIP/NBT 显色底物/工作液	AP	灵敏度高，显蓝紫色产物，多用于膜、酶联杂交等特殊体系。

根据测定范围的需求选择合适的终止液（一般为2 mol/L硫酸）。通常使用的终止液是酸性溶液，但不同的显色底物可能需要不同类型的终止液。常用的反应包括：TMB显色反应通常使用2mol/L H₂SO₄作为终止液，通过破坏HRP酶的活性来终止反应，并且使pH值降低，从而稳定显色底物的吸收波长；碱性磷酸酶（AP）作为酶偶联物时，一般采用碱性终止液（如3 M氢氧化钠溶液）来终止反应。使反应信号稳定在特定时间点，确保检测结果的准确性和重复性。

2.1.2.4.6 光密度值测定

反应终止30 min内，在酶标仪检测光密度值（OD值），建议使用双波长测量，根据反应产物的敏感吸收峰选择检测波长，根据其不敏感区域选择参比波长（一般选择450 nm为测定波长，630 nm为参比波长测定吸光度）。

2.1.2.5 分析结果表述

2.1.2.5.1 绘制结合曲线

以2.1.2.4.5测得的光密度值为纵坐标，待测样品的浓度为横坐标，通过数据处理软件使用式（1）的非线性回归模型拟合数据，绘制结合曲线。

$$Y = \frac{B_{max} \times X}{Kd + X} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

Y——光密度值；

B_{max}——最大结合响应的光密度值；

X——待测样品浓度（mol/L）；

Kd——亲和力（mol/L）。

注：空白对照的光密度值都不应超过0.1。

2.1.2.5.2 结果表达及要求

通过数据分析软件计算得到最优*Kd*值，即为待测样品的亲和力。计算结合曲线的*R*²值及置信区间，其中*R*²应不小于0.95。

下面以Anti-H7N9 N蛋白抗体为例，使用GraphPad Prism（v10.2）软件进行结合曲线的绘制操作演示：

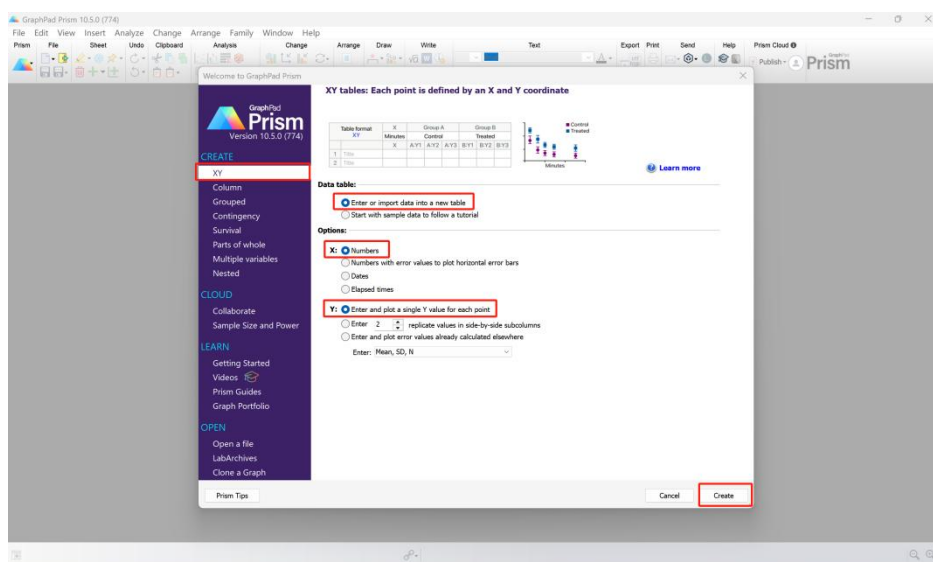
1) 统计梯度稀释的Anti-H7N9 N蛋白抗体的浓度及对应的光密度值(OD值)，该样品以450 nm为测定波长，620 nm为参比波长测定吸光度。具体测定数据如下表：

	OD450			OD620			OD450-OD620		
样品浓度 (nM)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	3.831	3.71	3.627	0.042	0.0412	0.0413	3.789	3.6688	3.5857
4	3.591	3.397	3.561	0.0411	0.0412	0.0422	3.5499	3.3558	3.5188
0.8	3.254	3.157	3.129	0.0415	0.04	0.0403	3.2125	3.117	3.0887
0.16	1.575	1.478	1.64	0.0418	0.0401	0.0405	1.5332	1.4379	1.5995
0.032	0.468	0.444	0.501	0.0414	0.0409	0.0402	0.4266	0.4031	0.4608
0.0064	0.144	0.152	0.16	0.0413	0.0404	0.0405	0.1027	0.1116	0.1195
0.00128	0.106	0.11	0.103	0.0438	0.0403	0.0408	0.0622	0.0697	0.0622
0.000256	0.071	0.069	0.066	0.0497	0.0405	0.0416	0.0213	0.0285	0.0244

使用GraphPad Prism软件绘制曲线结合仪需用到3次复孔的OD450-OD620的平均值，计算结果见下表（结果保留4位小数）：

样品浓度 (nM)	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128	0.000256
OD450-OD620	3.6812	3.4748	3.1394	1.5235	0.4302	0.1113	0.0647	0.0247

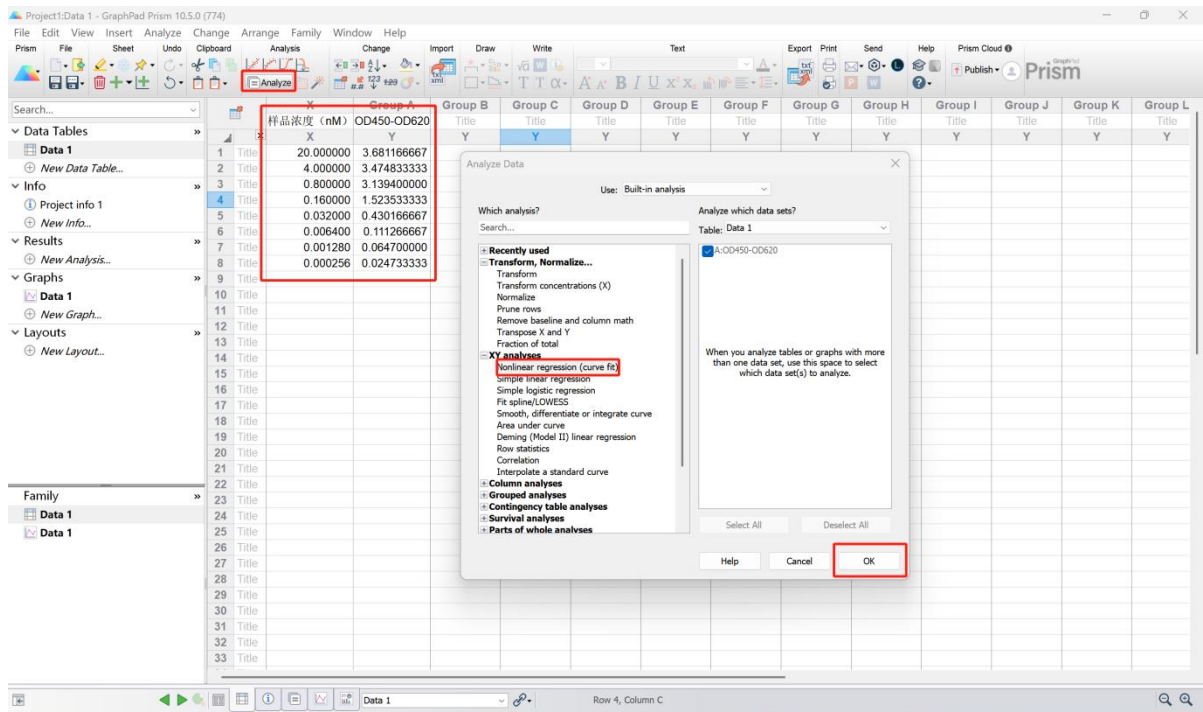
2) 双击屏幕上的GraphPad Prism图标启动软件，会出现参数选择页面（如下图所示），左边栏选择‘CREATE’下的‘XY’，右边栏‘Data table’下选择‘Enter or import data a new table’，‘Options’下‘X’选择‘Numbers’；‘Y’选择‘Enter and plot a single Yvalue for each point’，点击‘Create’创建表格。



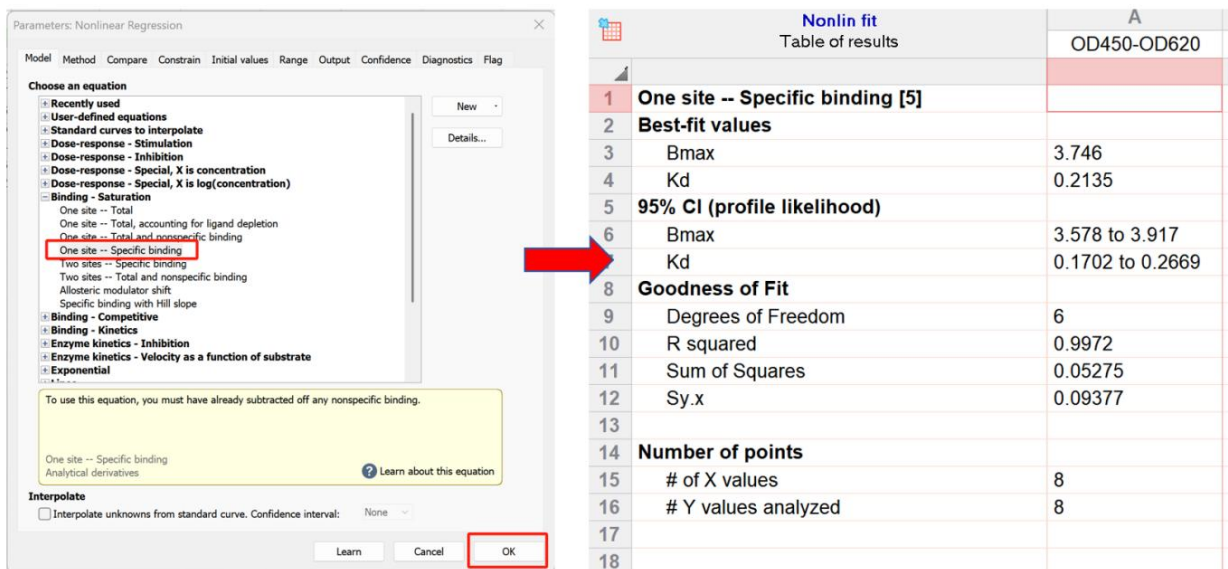
参数选择页面

3) 创建表格后，进行参数命名及数据填充，X轴为Anti-H7N9 N蛋白抗体梯度稀释浓度，Y轴为OD450-OD620的平均值，完成后点击上边栏中的‘Analyze’会出现参数选择框，

选择‘XY analyze’下面的‘Nonlinear redression(curve fit)’，点击‘OK’进入下一参数选择；选择‘Binding-Saturatong’下面的‘One site--Specific binding’，点击‘OK’即可获得Kd值、置信区间及R²等数据结果，具体操作步骤如下图所示：

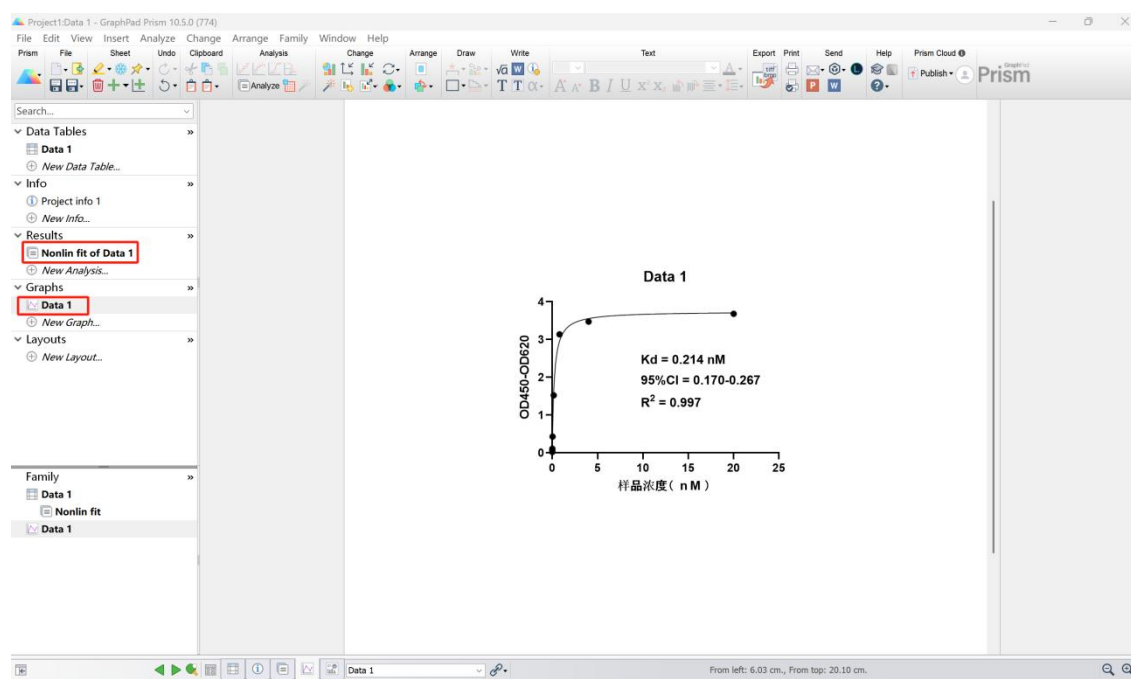


(a) 原始数据填充



4) 最后选择左边栏中‘Graphs’下面的‘Data 1’可看到GraphPad Prism软件自动绘制完成的结合曲线,将‘Results’中的结果数据粘贴到结合曲线图中,点击上边栏的‘Export’

导出图片。具体操作步骤如下图所示：



生成结合曲线

2.1.2.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的30%。

2.2 表面等离子共振法 (SPR)

2.2.1 测定原理

SPR表面等离子共振技术是一种基于实时、无标记检测分子间相互作用的生物物理分析方法。通过将靶标固定在传感芯片表面，加入待测样品并监测其与靶标结合和解离过程，记录响应单位随时间的变化曲线，并据此拟合动力学参数，得到平衡解离常数（ K_d ）来指示亲和力大小。

2.2.2 试验步骤

2.2.2.1 芯片制备

根据靶标特性和检测芯片选择合适的靶标偶联方式。根据检测系统将基线稳定、表面活化、靶标偶联、封闭反应等四个阶段设置连续运行的标准程序，并按系统设计的样品架或孔板位置表，分别放上运行缓冲液、活化试剂、靶标溶液和封闭试剂，运行程序，使芯片表面形成一层共价固定化的靶标分子层，得到稳定、可重复使用的检测芯片。

注：需设定空白对照通道作为对照。

靶标的选择及要求如下：

(1) 需要根据待测物选择合适的靶标，明确其种类、分子量、浓度并确保其高纯度，根据需求选择合适的偶联方法并优化实验条件保证其固化后的稳定性，并控制靶标用量。

(2) 使用偶联法的靶标溶液中不能含有 NaN_3 及含伯氨基的成分，如甘氨酸、Tris；使用捕获法的靶标不含游离标签和其它带相同标签的分子。

(3) 靶标是小分子需要知道有机溶剂信息，是蛋白需要知道标签信息；

(4) 靶标母液浓度一般建议 $\geq 1 \text{ mg/mL}$ ，纯度最好 $\geq 90\%$ （越高越好），用偶联稀释液稀释至 $2\text{-}50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 进行偶联，根据具体情况调整。

依据靶标性质特点（Lys、Cys、His标签、生物素等），选择适合的偶联方式及对应芯片。目前常用的偶联方式如下表：

偶联方式	偶联原理	适用类型
氨基偶联	EDC激活羧基，NHS形成活性酯，中间体与蛋白质Lys $\epsilon\text{-NH}_2$ 共价结合	含有游离Lys的蛋白、多肽
巯基偶联	巯基基团特异性与蛋白质Cys-SH反应，形成稳定的硫醚键	含有自由半胱氨酸残基或经工程化引入Cys的蛋白
His- Ni^{2+} 捕获	芯片表面预包覆 Ni^{2+} -NTA，利用His标签与 Ni^{2+} 配位结合	带His ₆ 标签的重组蛋白
抗体捕获	芯片预先包被捕获抗体，然后通过抗原-抗体特异性捕获靶标	Fc片段标记
生物素-链霉亲和素捕获	靶标先与生物素结合，再通过SA芯片捕获	需生物素标记的蛋白、寡核苷酸

目前常用的传感芯片的种类及选择如下表：

芯片类型	特征/方法
CM5 芯片	最通用的芯片，主要针对检测的靶标与分析物分子标签相同，或均无标签，或捕获法捕获量无法满足。适用于多种化学修饰固定样品，可以应用于核酸、多肽、抗体、蛋白、糖类或小分子化合物与蛋白结合检测场景
CM7 芯片	载量比 CM5 更高，适用于片段药物和低分子量样品检测，如小分子化合物研究
Human IgG (Fc) Capture chip	捕获 Fc 标签蛋白或人源抗体
Mouse antibody Capture chip	捕获 mFc 标签蛋白或鼠源抗体
His Capture chip	捕获 His 标签蛋白

NTA chip	螯合 Ni^{2+} 后可捕获 His 标签
Protein A/G chip	捕获不同种属及亚型抗体
Protein L chip	捕获抗体轻链
SA chip	捕获生物素标记的靶标，需摸索再生
Bioin CAP chip	捕获生物素标记的靶标，与含 DNA 和再生的试剂盒配套使用

目前常用的运行缓冲液的种类及选择如下表：

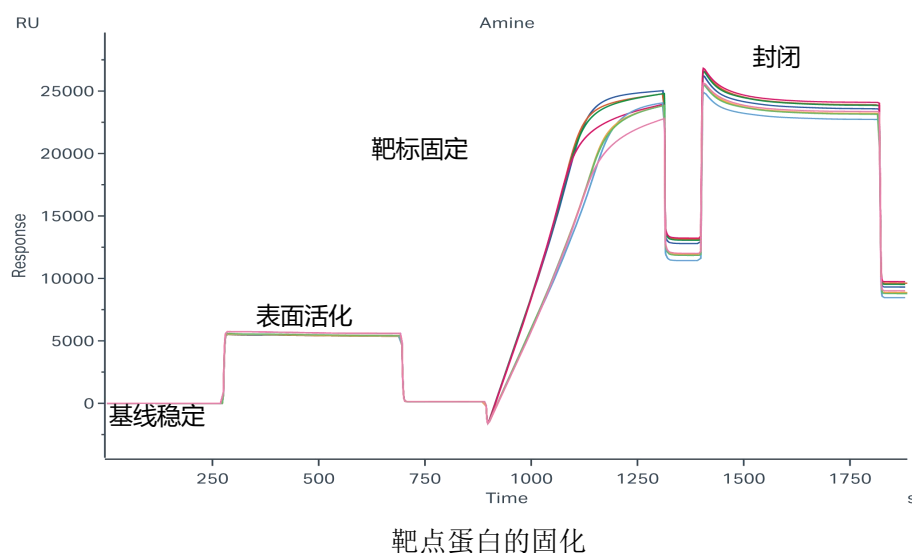
缓冲液类型	成分	适用类型
HBS-EP	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween-20, pH 7.4	最常用，适合大多数蛋白 - 蛋白相互作用
PBST	10 mM PBS, 150 mM NaCl, 0.005–0.05% Tween-20, pH 7.4	对抗体和细胞因子适用
TBST	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.005–0.05% Tween-20, pH 7.4	温和条件，对某些蛋白稳定性更好

目前常用的活化试剂的种类及选择如下表：

活化试剂类型	作用原理	选择依据
EDC/NHS	形成 NHS-酯，中间体可与蛋白 Lys-NH ₂ 共价结合	经典的胺偶联活化；效率高；对多种蛋白通用
NiCl ₂	在 NTA 官能团位点捕获 His 标签	His 标签捕获时无需化学交联，只需金属配位
Streptavidin	预包被生物素结合蛋白层，用于后续捕获生物素标记靶标	需要可逆、强亲和力捕获生物素化样品

封闭试剂根据芯片类型进行选择。CM 系列芯片在 COOH-EDC/NHS 偶联后，一般用乙醇胺与未反应的 NHS-酯基团反应，进行末端胺封闭最为常用。

针对基线稳定、表面活化、靶标偶联、封闭反应，举例说明如下：将靶点蛋白用固定试剂（10 mM 醋酸钠，pH 5.0）（根据蛋白特性选择合适的固定试剂）稀释到 30 $\mu\text{g/mL}$ 。首先，CM5 芯片的表面用 400 mM EDC 和 100 mM NHS 以 10 $\mu\text{L/min}$ 的流速进行 420 s 的活化。其次，将 30 $\mu\text{g/mL}$ 的靶点蛋白以 10 $\mu\text{L/min}$ 的流速注入到实验通道（Fc2）约 420 s，固定量约为 7000 至 14000 RU。最后，芯片用 1 M 乙醇胺以 10 $\mu\text{L/min}$ 进行 420 s 封闭。参比通道（Fc1）不注入靶点蛋白，其他与试验通道（Fc2）进行相同操作。



2.2.2.1.1 基线稳定

将传感芯片安装于SPR系统中，使用运行缓冲液以恒定进行系统预冲洗及芯片预润，监测芯片响应单位（RU）直至稳定。

注：一般波动小于±2 RU即视为稳定基线；

2.2.2.1.2 表面活化

向目标流动通道注入活化试剂，以适宜流速（一般为10 μL/min）持续注射一定时间，以活化表面官能团。

注：该步骤需连续完成，避免中间产物水解失活；活化时间与活化试剂浓度依据芯片类型和目标RU值调整，活化时间一般为180~420 s。

2.2.2.1.3 靶标偶联

将靶标用适宜的偶联缓冲液稀释成目标浓度，需优化获得最适的靶标偶联量和偶联pH。若靶标溶液含有叠氮化钠和伯氨基分子，如Tris、甘氨酸等，可能干扰偶联过程，需进行缓冲液置换后使用。

偶联是指将靶标固定到芯片上的过程，针对不同的芯片和靶标，偶联方法各不相同。

目前常用的偶联缓冲液的选择及要求如下表：

偶联缓冲液类型	主要成分及名称	适用场景及原理
氨基偶联试剂	EDC（1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐） NHS（N-羟基琥珀酰亚胺）	适用于偶联含氨基（—NH ₂ ）基团的靶标，与羧基（—COOH）基团反应，形成稳定的酰胺键，是 SPR 最常用的偶联体系
巯基偶联试剂	SPDP（N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯）等	适用于偶联含巯基（—SH）或胺基的分子，通过形成可断裂的二硫键，实现共价或可逆的偶联
生物素-亲和素偶联	生物素（Biotin）、亲和素或链霉亲和素（Avidin 或 Streptavidin）	通过高亲和力的生物素-亲和素相互作用实现分子间高效偶联，常用于可拆卸偶联、灵活捕获和再生芯片表面

2.2.2.1.3.1 靶标偶联量确定

根据式（2）计算靶标偶联水平 R_L 。实验时靶标偶联量选择1.5倍的 R_L 。

$$R_L = (M_2/M_1) * R_{max} / S_m \dots\dots\dots (2)$$

式中：

R_L ——靶标偶联水平；

R_{max} ——芯片表面最大结合容量，通常代入100 RU；

M_1 ——待测蛋白的分子量；

M_2 ——待测蛋白靶标分子的分子量；

S_m ——化学计量比，未知时选择1。

注：该公式用于未知亲和力检测的参考偶联量，实际检测时可根据实验情况调整偶联量，最终使分析物结合信号介于25-100 RU。

靶标最适偶联量试验步骤如下：

（1）确定芯片表面的最大结合容量（ R_{max} ）：这通常在实验前通过预实验确定，或者根据芯片类型和实验条件设定一个合理的值；在亲和动力学分析中，通常 R_{max} 设置 100 RU。

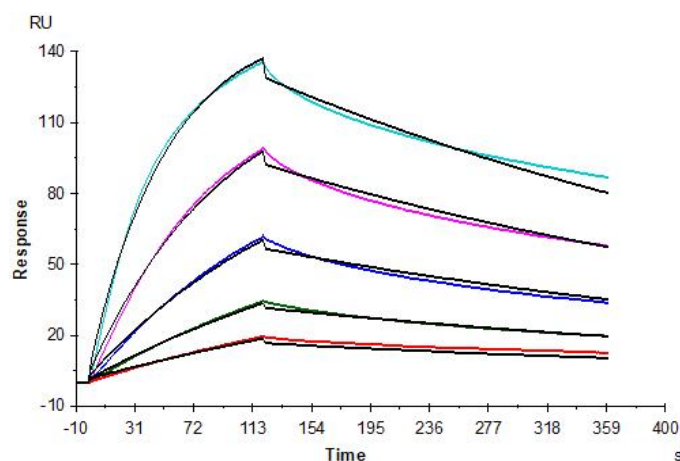
（2）根据式（2）计算靶标偶联水平（ R_L ）：

（3）计算参考偶联量：参考偶联量为 1.5 倍 R_L 。

注：可根据实验情况调整偶联量，最终使分析物结合信号在25~100 RU左右。

举例说明：

（1）固定CXCR5（分子量44 kDa），分析物是anti-CXCR5抗体（180 kDa）。根据文献是稳态拟合， R_{max} 设定为100 RU， $S_m=1$ ，则 $R_L \approx 35$ RU；考虑偶联损失，实际偶联量应为1.5 R_L ，也即约40 RU。



anti-CXCR5抗体与CXCR5的结合动力学分析

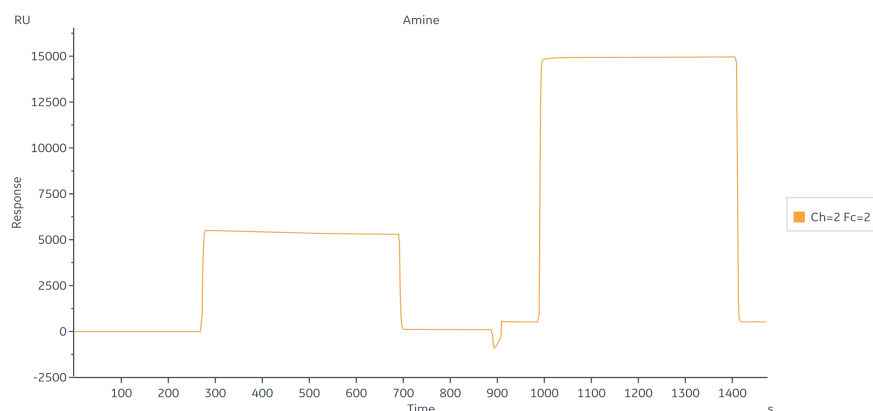
(2) 固定Transferrin R (分子量78.7 kDa)，分析物是Transferrin(77.1 kDa)。根据文献是动力学拟合， R_{\max} 设定为100 RU， $S_m=1$ ，则 $R_L \approx 102$ RU；考虑偶联损失，实际偶联量应为 $1.5 R_L$ ，也即约160 RU。如下案例，固定Transferrin R 521.8 RU，分析物结合信号介于25-100 RU，结合线性较优。

Immobilization result

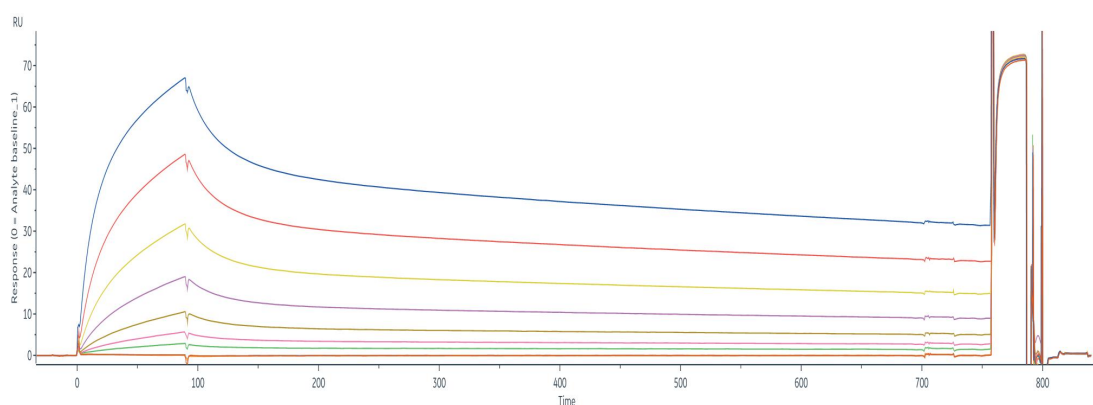
Chip CM5

Date	Channel	Flow cell	Chemistry	Method	Ligand	Response bound (RU)	Response final (RU)
6/7/2024 4:55:10 PM	2	1	Amine	Immobilization	Activation/Deactivation		
6/7/2024 4:55:10 PM	2	2	Amine	Immobilization	BV3953-20C1F1-1KH	422.6	521.8

(a) 偶联量



(b) 偶联图谱



(c) 结合图谱

2.2.2.1.3.2 最适偶联 pH

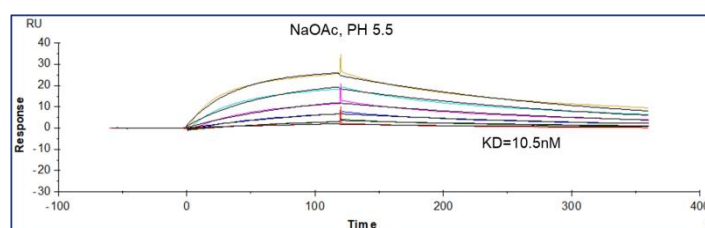
根据靶标特性选用不同pH的偶联缓冲液稀释靶标到目标浓度，进行预结合试验，根据相同时间内结合的数量和峰型判断最适pH，如果相邻pH的结合结果差不多，选用靠近中性的偶联pH。

最常用的偶联方法是氨基偶联法，一般选择pH比蛋白等电点（PI）低0.5-1的缓冲液，

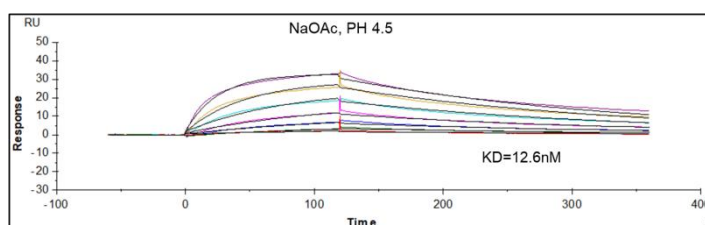
作为蛋白偶联时的缓冲液。在CM5芯片偶联靶标之前，需要通过预富集实验筛选合适的偶联缓冲液，通常会使用pH 5.5，5.0，4.5，4的10 mM醋酸钠中筛选，将靶标稀释至浓度为10-100 $\mu\text{g/mL}$ ，初次实验可尝试20 $\mu\text{g/mL}$ ，运行预结合试验，根据预富集结果：（1）预判以现有的样品条件能否达到设定的偶联量；（2）通过五个预测点的斜率推算脉冲式进样中第一针所需要的进样体积。系统如果预测当前的样品条件无法达成预设的偶联目标（过低或过高），需改变偶联靶标的条件（浓度和pH）后重新尝试。最适pH值应该能够使靶标与芯片表面的结合达到最佳状态，同时避免过度的电荷效应，最后用50 mM NaOH把吸附在芯片表面的靶标清洗掉，选择最适pH值进行正式的偶联操作。

举例说明：

（1）目标蛋白为CD21采用氨基偶联法固定于CM5芯片表面，为寻找最适偶联pH，分别测试了10mM NaOAc缓冲液pH 5.5与pH 4.5的预富集效果，结合响应值、曲线形态以及亲和力等多因素综合判断，pH 5.5的NaOAc缓冲液更适合作为CD21蛋白偶联条件。



（a）pH为5.5时NaOAc缓冲液的偶联效率与结合动力学分析



（b）pH为4.5时NaOAc缓冲液的偶联效率与结合动力学分析

通过图（a）和图（b）能明显看出不同pH的偶联缓冲液，结合响应(RU)、解离曲线表现等是有差异的，具体比对结果见下表：

偶联缓冲液 pH	结合响应(RU)	解离曲线表现	KD (nM)
5.5	中等 (~35)	稳定，重复性好	10.5
4.5	偏高 (~45)	略慢，有拖尾	12.6

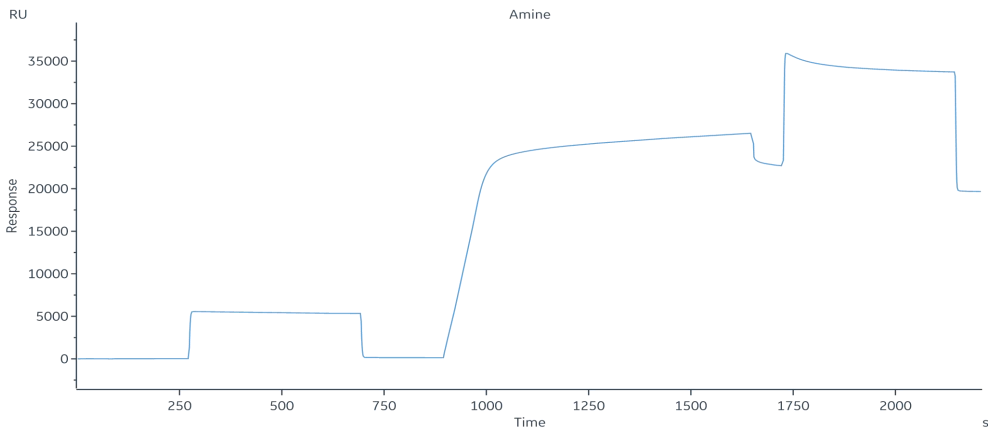
（2）固定Transferrin R，使用10 mM Acetate, pH 4.5，靶标固定量极高（19676.5 RU），但分析物单浓度测试无结合信号。靶标理论上存在活性的，所以靶标可能在偶联过程中失活。失活原因可能是Acetate的pH过低，导致靶标失活。

Immobilization result

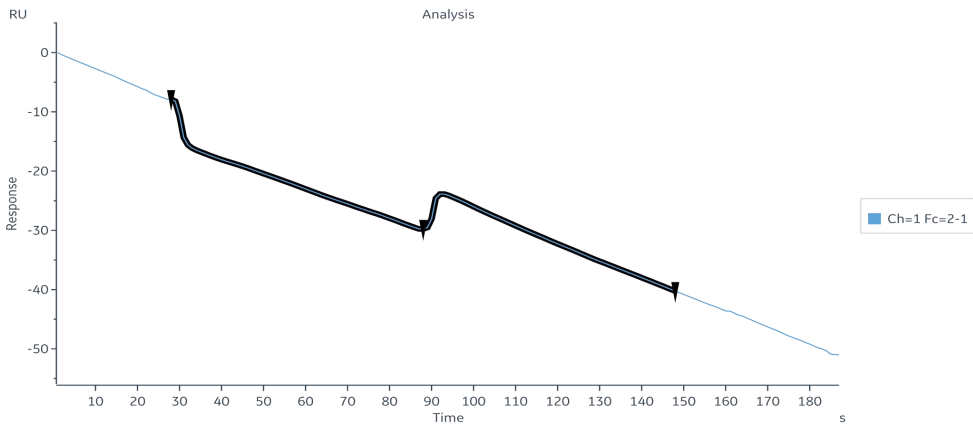
Chip CM5

Date	Channel	Flow cell	Chemistry	Method	Ligand	Response bound (RU)	Response final (RU)
5/22/2024 12:50:34 PM	1	1	Amine	Immobilization	Activation/Deactivation		
5/22/2024 12:50:34 PM	1	2	Amine	Immobilization	BV3953-20C1F1-1KH	22600.4	19676.5
5/22/2024 12:50:34 PM	2	1	Amine	Immobilization	Activation/Deactivation		

(a) 偶联量



(b) 偶联图谱



(c) 单浓度结合图谱

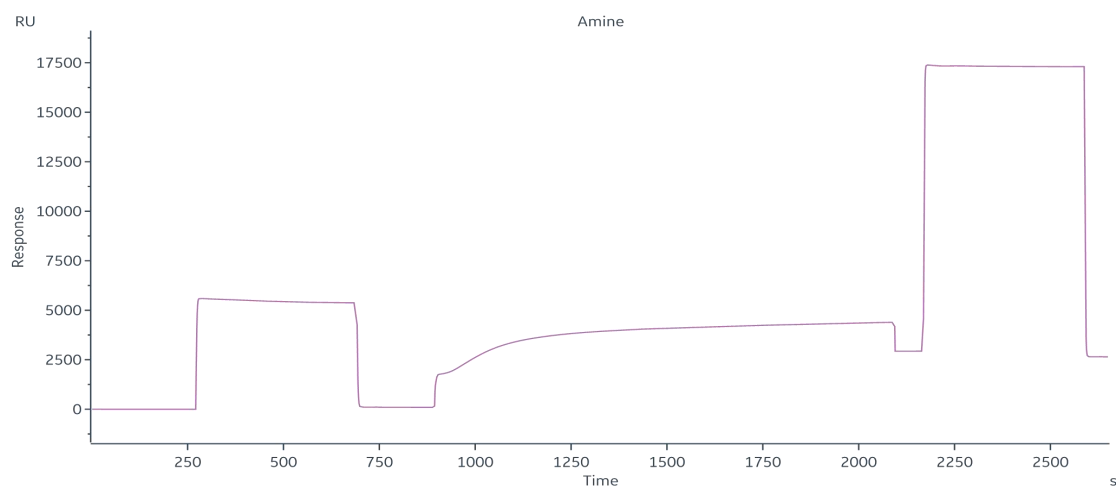
靶标的PI为6.39，尝试选用10 mM Acetate, pH 6.0进行偶联。偶联量为2646.1 RU，单循环测试，检测有结合，可以看出10 mM Acetate, pH 6.0更适合其偶联。但结合信号过高，后续需要降低靶标偶联量，使结合信号在25-100 RU之间。

Immobilization result

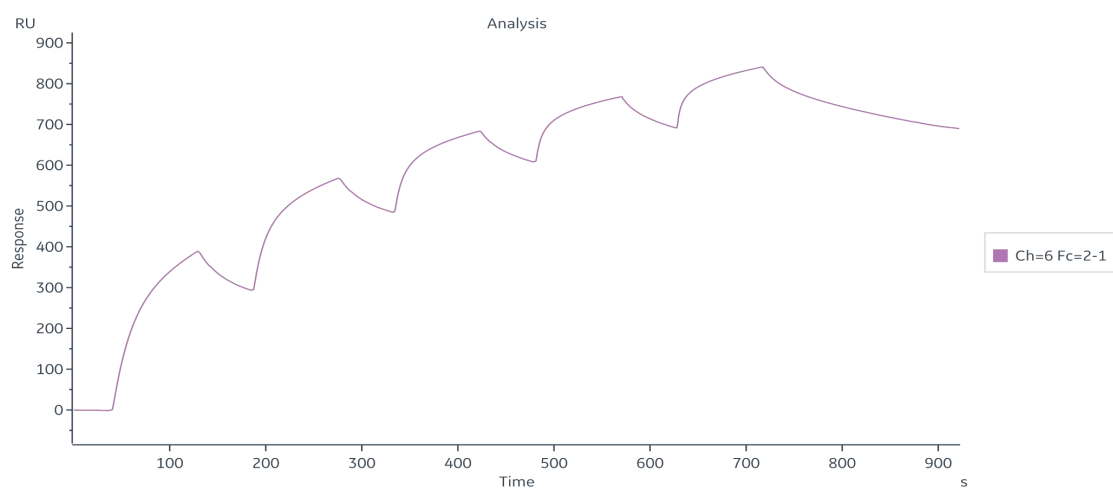
Chip CM5

Date	Channel	Flow cell	Chemistry	Method	Ligand	Response bound (RU)	Response final (RU)
6/7/2024 10:17:53 AM	6	1	Amine	Immobilization	Activation/Deactivation		
6/7/2024 10:17:53 AM	6	2	Amine	Immobilization	BV3953-20C1F1-1KH	2841.1	2646.1

(a) 偶联量



(b) 偶联图谱

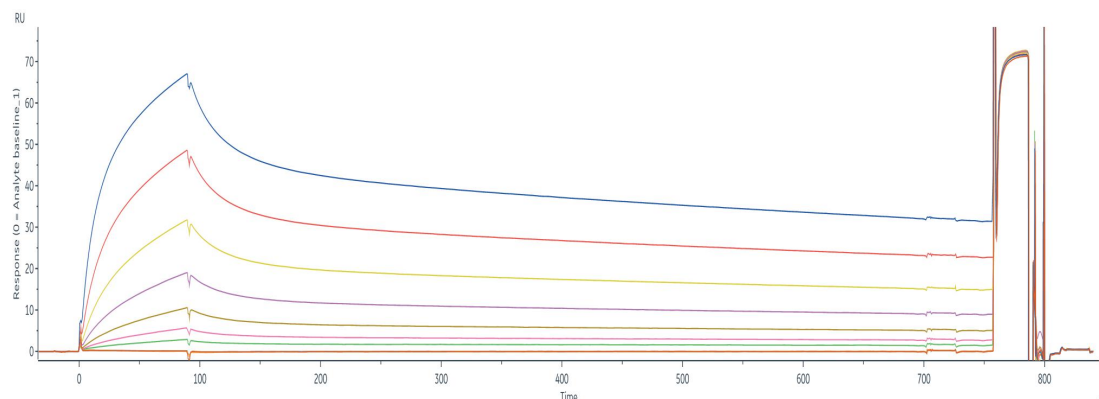


(c) 结合图谱

最终降低靶标的稀释浓度，缩短偶联时间，使得固定Transferrin R的量降低至521.8 RU。得到2.2.2.1.3.1靶标最适偶联量试验的结果。从而得到结合线性较优，且分析物结合信号介于25-100 RU的结果。

Immobilization result							
Chip CM5							
Date	Channel	Flow cell	Chemistry	Method	Ligand	Response bound (RU)	Response final (RU)
6/7/2024 4:55:10 PM	2	1	Amine	Immobilization	Activation/Deactivation		
6/7/2024 4:55:10 PM	2	2	Amine	Immobilization	BV3953-20C1F1-1KH	422.6	521.8

(a) 偶联量



(b) 结合图谱

2.2.2.1.4 封闭反应

注入封闭试剂封闭未反应的活性基团，防止非特异性结合；封闭完成后，应重新用缓冲液冲洗表面至基线恢复稳定。

2.2.2.2 待测样品准备

需明确待测样品中重组蛋白的质量或浓度、等电点、分子量、标签类型等信息，且样品纯度>90%。

固体样品：取适量样品用运行缓冲液溶解配置母液。

液体样品：取适量待测样品用运行缓冲液稀释配置母液。

根据需要将母液用运行缓冲液进行梯度稀释，获得系列梯度浓度待测样品溶液，记录其摩尔浓度。须经0.22 μm滤膜过滤并脱气。

若待检样品作为分析物，制剂中含有影响折光率的物质，如海藻糖、咪唑、甘油等，需要进行脱盐处理。

待测样品要求如下：

- (1) 确保样品充分水溶，样品中没有任何沉淀、颗粒，保持样品处于均一的、不聚集的状态，有明确等电点/分子量信息，分子量一般在 0.01-100 KDa；
- (2) 待测样本纯度(>90%)，蛋白浓度> 0.2 mg/mL，浓度越高越好；
- (3) 分析物样品中不能含有高折光率物质，如甘油、蔗糖、咪唑、海藻糖等高折光的成分；
- (4) 小分子需要知道有机溶剂信息，蛋白类型需明确标签类型；
- (5) 分析物需要溶解在运行缓冲液中，保持整个系统运行一致。

2.2.2.3 检测条件确认

2.2.2.3.1 最适检测条件

通过标准品测试或实际样品预测试得到结合信号、结合和解离趋势，根据预实验所选浓度的结合曲线，观察其结合信号以及是否呈明显抛物线，来确定多循环的进样浓度，一般在此基础上升高 1-2 个浓度，降低 5-7 个浓度，得到一系列 7-10 个浓度的分析物；可肉眼观察到的明显抛物线时所达到的时间，来确定多循环的结合、解离时间；一般流速与预实验保持一致确定进样浓度、时间、流速、结合、解离时间等检测条件。

在靶标通道上游需设置参比通道，以扣除容积效应（Bulk effect），容积效应是由于样品溶液与运行缓冲液折射率的差异。一般以经活化-封闭处理，但不偶联靶标的通道作为参比通道。

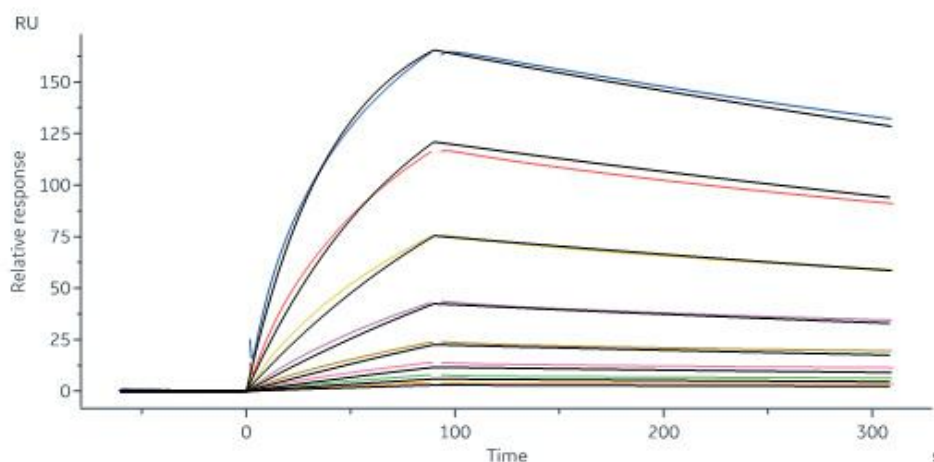
检测运行条件需要根据实验的具体需求和分析物的特性进行选择，通常检测温度采用 25℃，运行缓冲液为 PH 7.0 的 HBS-EP 缓冲盐，为了避免非特异性结合，可添加 0.05% Tween 20 或其它种类的表面活性剂如 0.05% 的 P20（聚山梨醇），再生液为 Glycine-HCl pH 2.5；运行条件为：进样时间 180 秒，等待 60 秒，再生 30 秒；流速为 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

最适检测条件需参考的参数及质量判断标准见下表：

参数	质量判定
曲线质量	结合或解离阶段均呈典型双指数型曲线，无明显拖尾等异常现象。
拟合与实际检测曲线	拟合紧密度良好，结合曲线成抛物线状，解离持平或者有下降趋势，多浓度呈浓度依赖性
动力学	动力学拟合参数优良，（ $R^2 \geq 0.98$ ， $\chi^2/\text{RU}_{\text{max}} \leq 10\%$ ）。
浓度依赖性	不同浓度的响应值（RU）按比例增长，KD 值在不同浓度拟合结果中基本一致。
重复性	同一浓度多次进样，响应值 $\text{CV} \leq 10\%$
非特异性结合	参比通道的响应值较低，结合曲线与背景明显区分。非特异 $\leq 20\%$ 结合信号或者与参比通道结合信号 $< 30\text{RU}$
$\chi^2 (\text{RU}^2)$	$< 1/10 \text{ R}_{\text{max}}$

检测运行条件需要根据实验的具体需求和分析物的特性进行选择，下面以 Human / Cynomolgus Claudin-18.2 与其靶标抗体检测亲和力为例。Monoclonal Anti-Chimeric Claudin-18.2 Antibody, Human IgG1 为人抗，选择 Protein A 芯片。Human / Cynomolgus Claudin-18.2 蛋白的原始溶剂（20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5, 11% trehalose）含有海藻糖，需将其用运行缓冲液脱盐留至备用。运行缓冲液选择常规 HBS-EP 溶液（含 10 mM N-（2-羟乙基）哌嗪-N'-2-乙磺酸（HEPES），150 mM 氯化钠（NaCl），3 mM 乙二胺四乙酸（EDTA），0.005% 吐温-20（Tween-20），pH 调节至 7.4）。采用 Protein A 芯片时，通常动力学检测温度采用 25℃，运行缓冲液为 pH 7.4 的 HBS-EP 缓冲盐，为了避免非特异性结合，可添加 0.05% Tween 20 或其它种类的表面活性剂如 0.05% 的 P20（聚山梨醇），

再生试剂为 Glycine-HCl pH 1.5；运行条件为：进样时间 90 秒，解离 210 秒，再生 30 秒；流速为 30 μ L/min，如下图所示：



结合图谱

2.2.2.3.2 再生条件选择

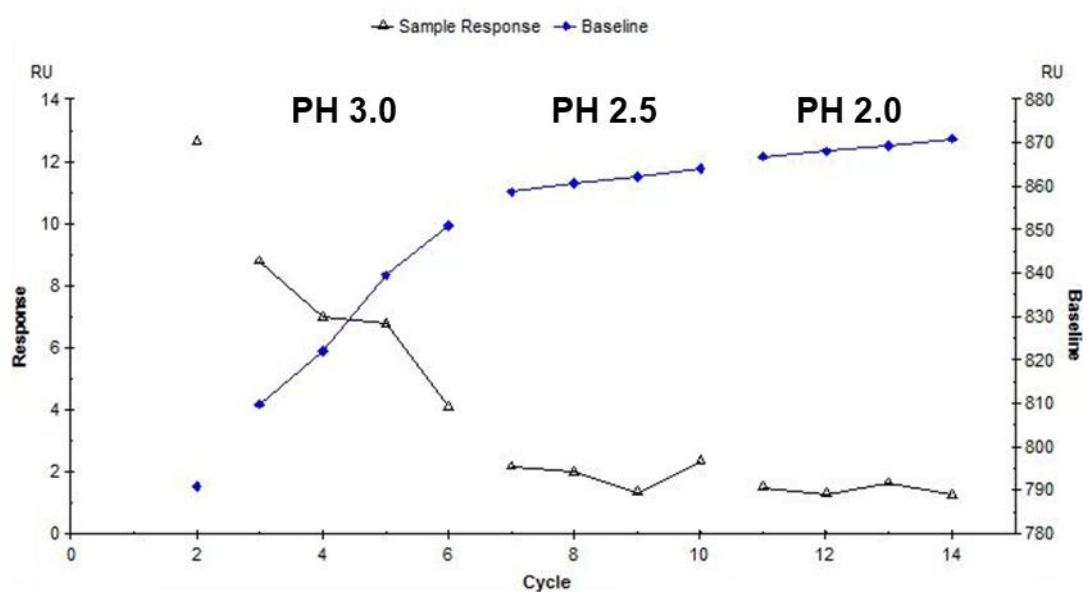
用手动模式或向导程序，根据说明分别采用不同类型的再生液，如酸、碱、盐、去垢剂等对芯片进行再生，根据检测曲线分析再生前后结合曲线的信号恢复率（ $\geq 90\%$ ）、基线稳定性（无漂移）和非特异性吸附水平来确定需要使用的再生液、进样时间、流速等条件。当使用商品化间接捕获法试剂盒或芯片，应根据厂家操作手册选择再生条件。

再生条件的选择是整个实验中非常关键的步骤，直接关系到实验结果的重复性，有效的再生条件能够去除所有剩余的分析物分子，确保每次实验的初始状态一致。再生条件的选择宗旨是在不损害靶标表面活性的前提下，选择更温和的再生条件再生溶液。一般可用高盐、低pH或高pH的缓冲液作为再生溶剂，通过手动或向导程序测试一系列溶液，从温和到剧烈，以找到最佳的再生条件。经典的再生试剂为Glycine-HCl 3.0、2.5和2.0，每种条件一般都会测试3-5次；如果分析物解离比较快，可以不用再生，小分子化合物可能难以再生，需要尝试更广泛的再生条件；理想的洗脱条件为能够彻底洗脱，保持活性。通过多次的进样，结合水平维持稳定，和第一次进样相比，结合水平的变化在10%之内。

举例说明：

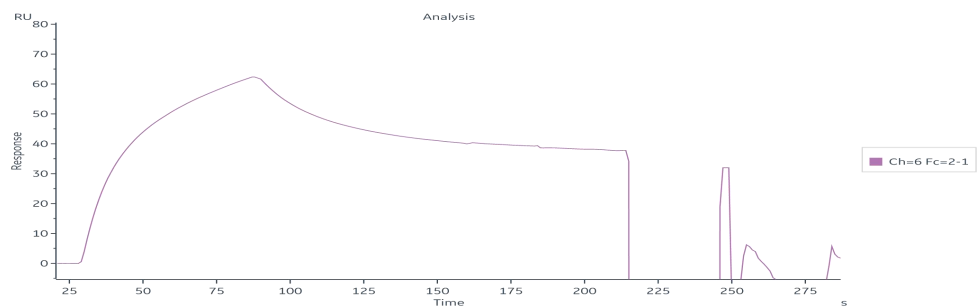
（1）目标蛋白为CD21的再生条件探索结果显示（如下图）：Glycine-HCl, PH 3.0再生缓冲液去除效果不佳，Sample Response逐次下降，且Baseline持续升高，提示纳米抗体未完全解离。相比之下，Glycine-HCl, PH 2.5以及2.0条件均能有效清除残留结合物，Sample Response重复性良好，Baseline稳定。为防止PH过低影响CD21抗原结构，因此推荐使用

Glycine-HCl, PH 2.5作为再生条件。

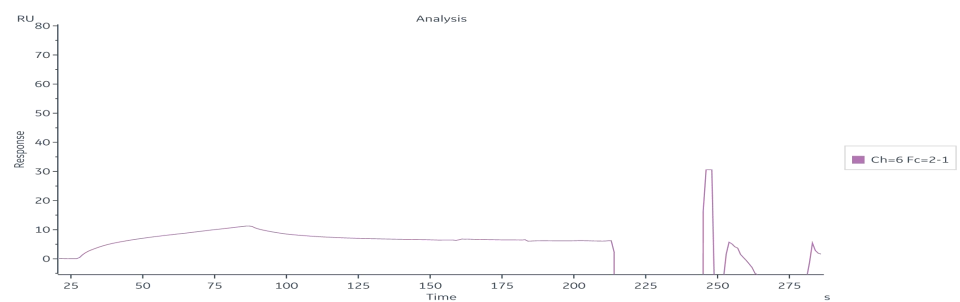


CD21蛋白的再生条件探索

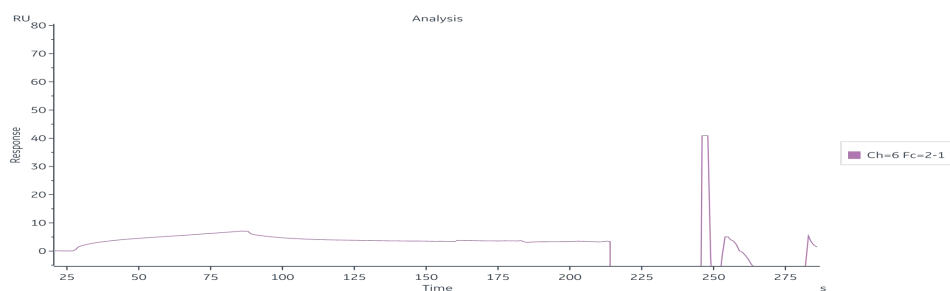
(2) 在2.2.2最适偶联pH试验中最终Transferrin R选用10 mM Acetate, pH 6.0进行偶联。偶联量为2646.1 RU, 单循环测试, 检测有结合时, 先使用3 M magnesium chloride再生, 可见分析物被完全洗脱下来, 但再次进样的结合信号明显降低, 说明3 M magnesium chloride可能使靶标逐步失活, 该再生条件不合适。



(a) 固定后第一次检测结合与再生一次图谱

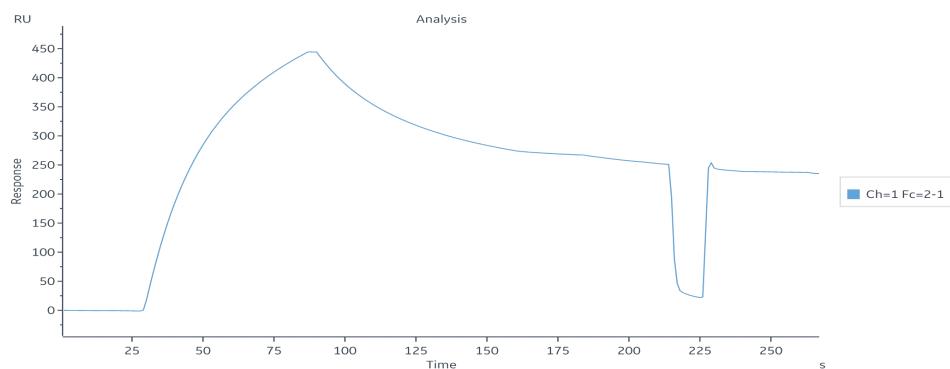


(b) 第二次检测结合与再生两次图谱

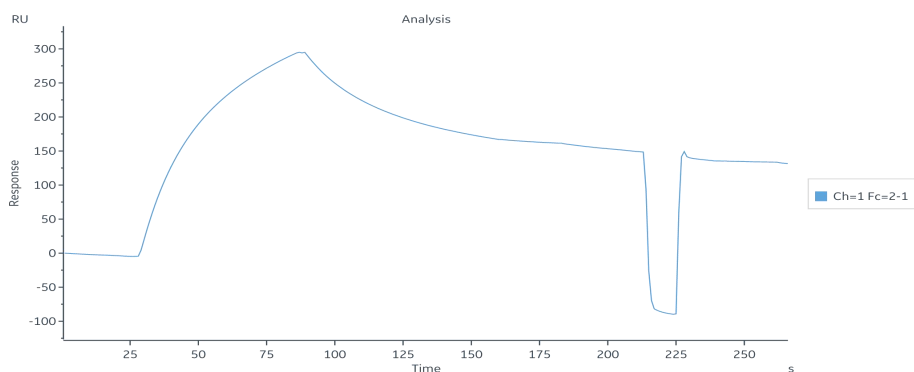


(c) 第三次检测结合与再生三次图谱图谱

后续使用10 mM Acetate, pH 6.0重新进行偶联, 用来测试再生条件。单浓度测试, 采用0.5 M magnesium chloride再生。无法洗脱分析物, 再生不完全, 重复结果一致。该再生试剂较弱。

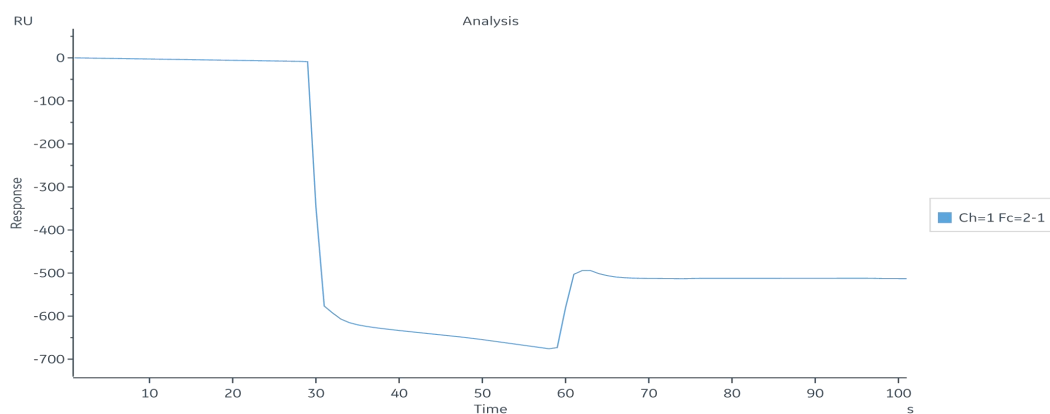


(a) 首次结合检测图谱

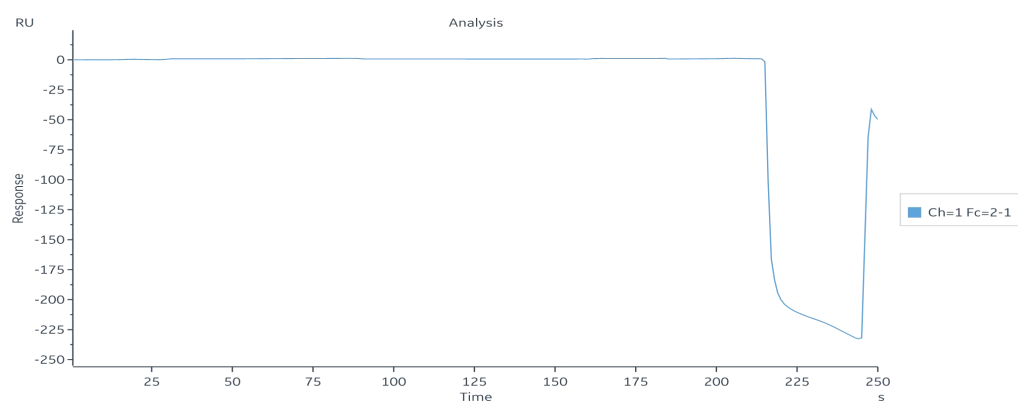


(b) 再生后结合测试图谱

然后采用50 mM NaOH再生, 分析物被完全洗脱。分析物再次进样, 无结合信号, 靶标已完全失活。该再生不合适。

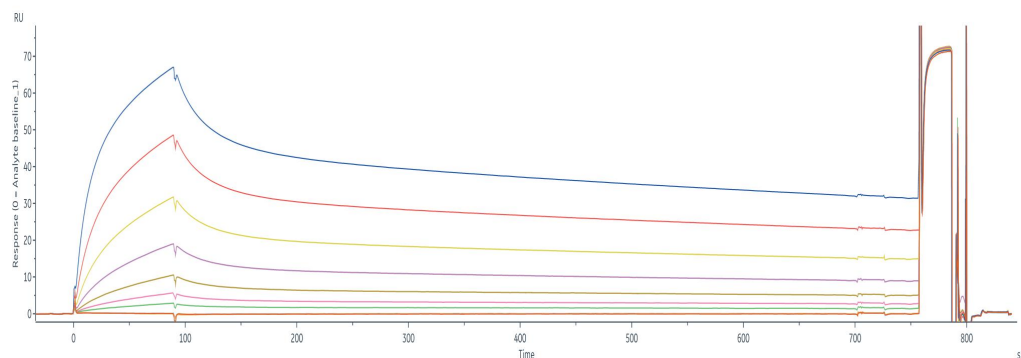


(a) 50 mM NaOH再生效果检测



(b) 再生后结合检测图谱

最后再生条件测试，尝试采用1 M magnesium chloride进行再生。分析物结合信号介于25-100 RU，结合线性较优。

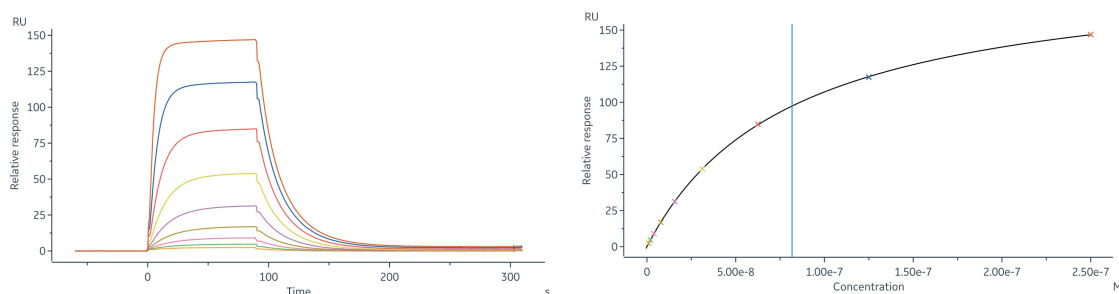


结合图谱

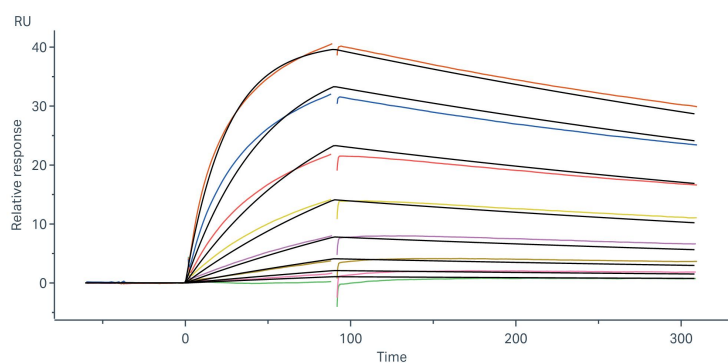
2.2.2.4 亲和力测定

按最适条件设置待测样本浓度、进样时间、液体流速、解离时间、再生液、再生液进样时间、流速及稳定时间。输入样品的名称和靶标分子梯度浓度信息。运行SPR自动进样和自动检测程序，自动获取数据。注：每次实验应包含1个标准品对照，用于评估系统适用性。设置流动相空白通道用于背景扣除。

结合解离曲线为快结合快解离模式时，选用稳态拟合方式进行拟合。结合解离曲线为慢结合慢解离模式时，选用1:1 binding拟合方式进行拟合。如下图所示（典型的动力学和稳态）：



(a) 稳态拟合

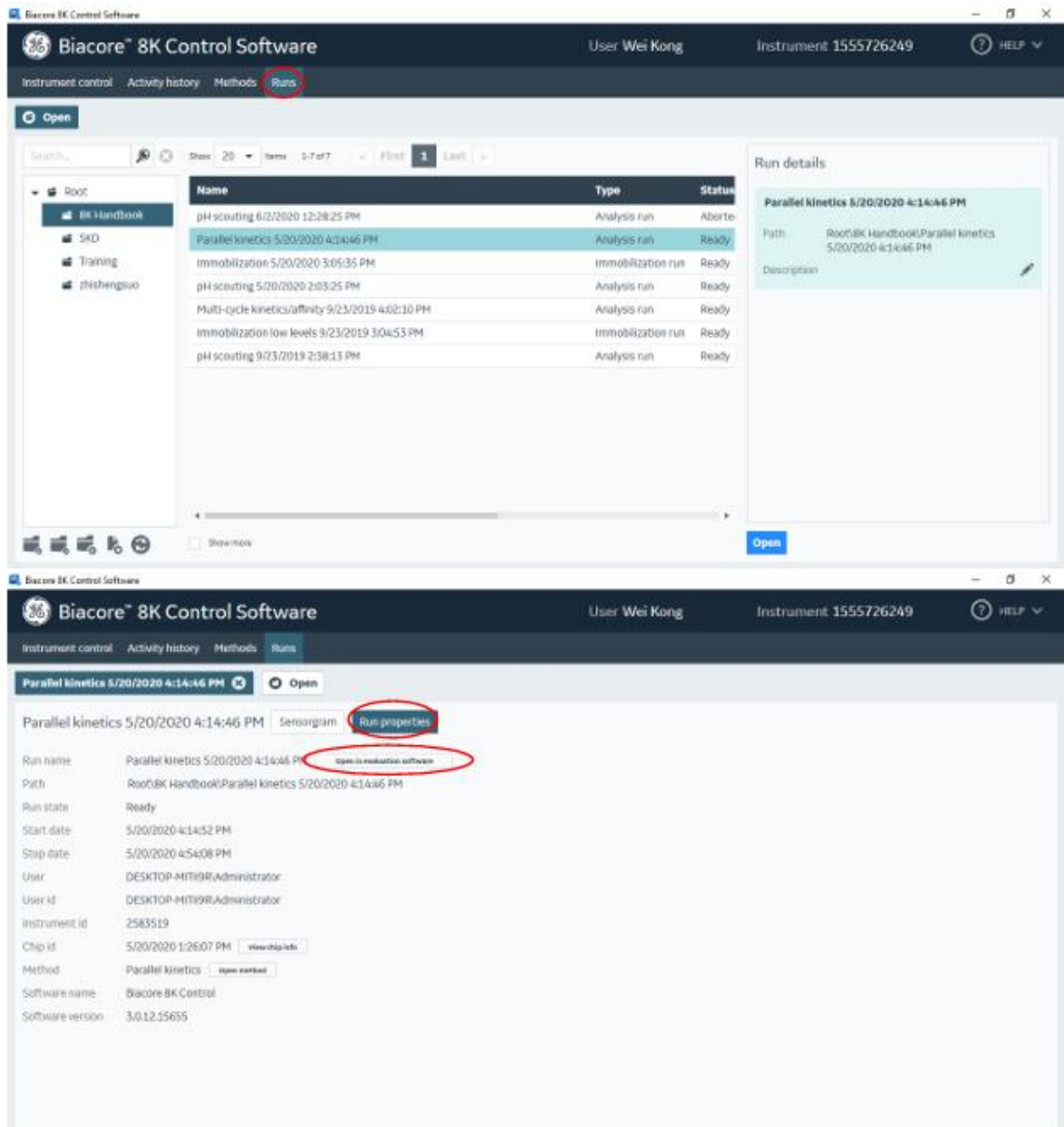


(b) 动力学拟合

Biacore 8K Control Software软件操作及分析具体流程如下：

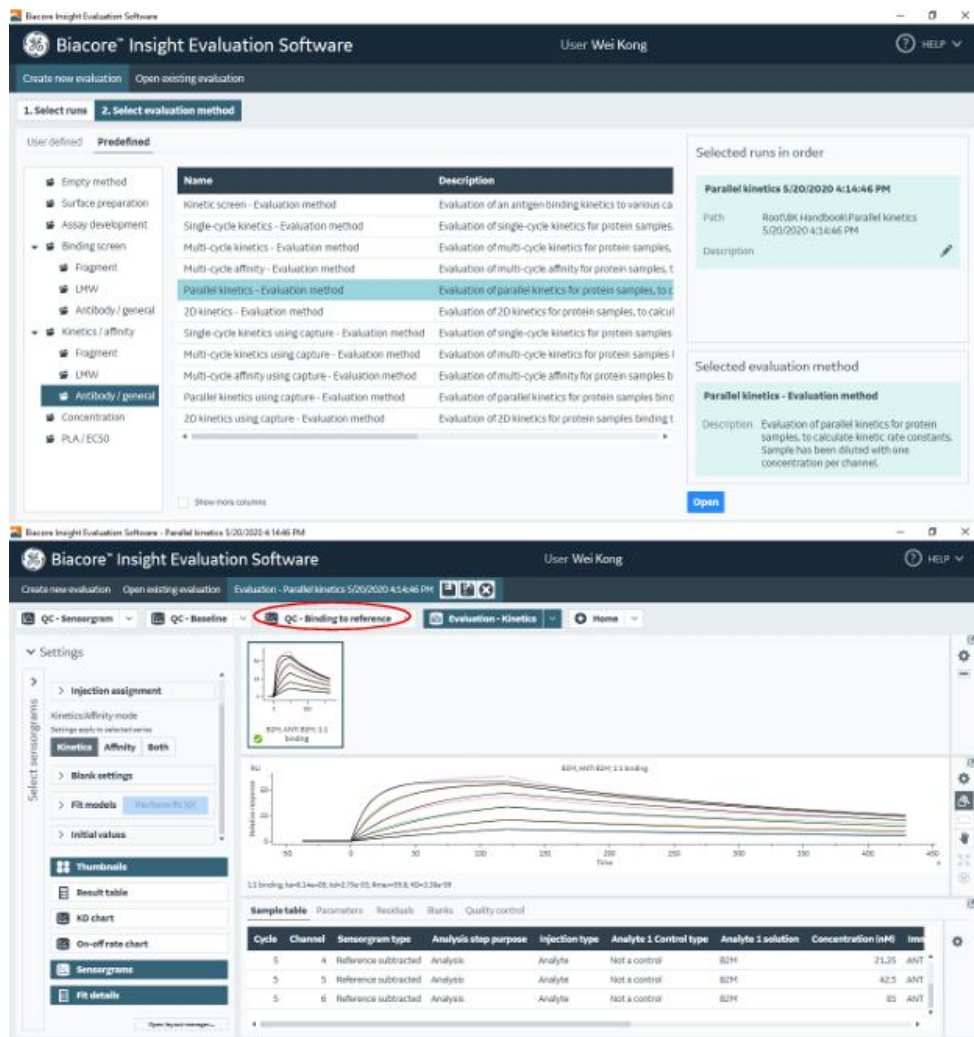
(1) 数据的导入和检查

1) 点击Biacore 8K Control Software主界面上方的Runs，找到结果文件，双击或点击右下角Open按钮打开。然后，选择Run properties，点击Open in evaluation software，界面跳转到Biacore Insight Evaluation Software。也可直接打开Biacore Insight Evaluation Software，打开方式如Biacore Control Software进行登录。



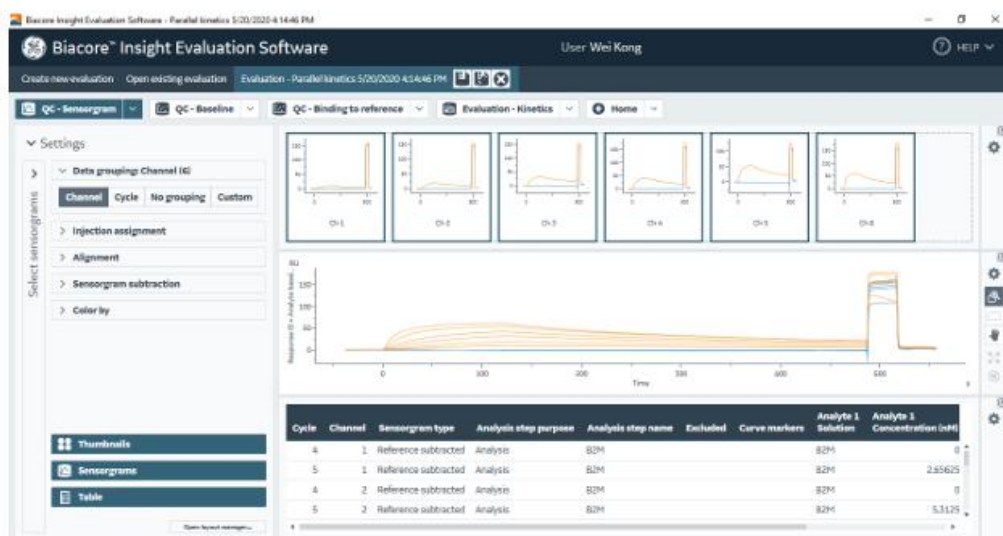
数据导入流程

2) 在Biacore Insight Evaluation Software中，点击Predefined找到对应分析方法（Kinetics/affinity - Antibody/general - Parallel kinetics）（同实验方法对应），双击或点击右下角Open按钮进行分析。分析软件自动进行拟合，输出结果。



结果输出流程

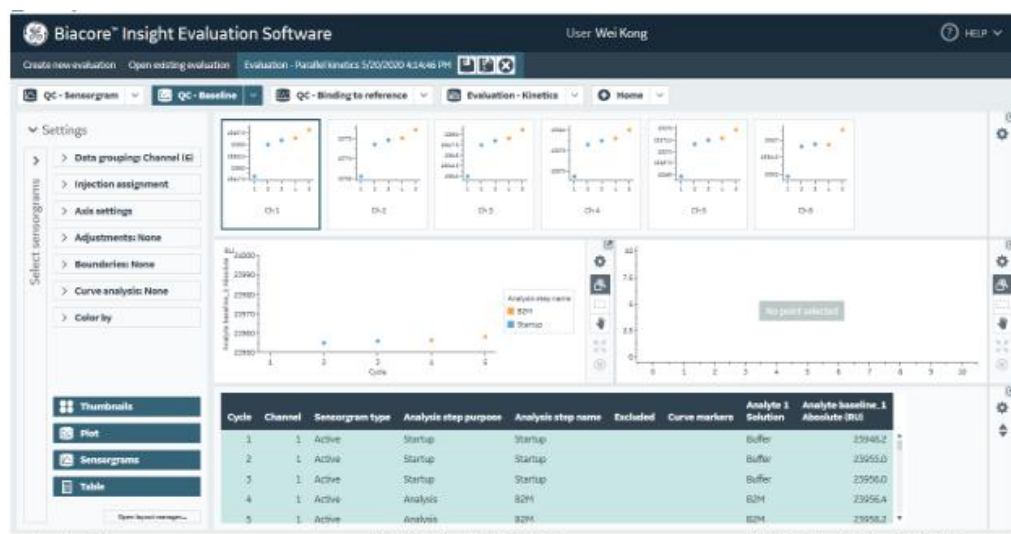
3) 点击上方QC-Sensorgram，鼠标左键+Shift选中所有channel，观察传感图，检查数据是否存在异常，主要包括进样、解离和再生部分。



数据检查

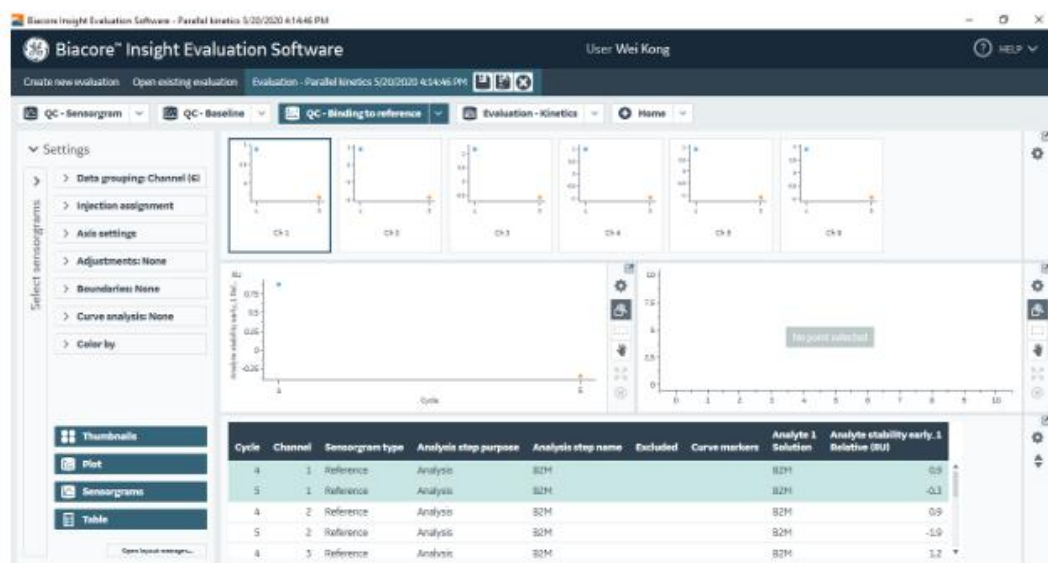
4) 点击上方QC-Baseline，可以检查各流路上的基线是否存在波动或漂移；若baseline

中各个点的响应值上飘，可延长再生时间或优化再生条件。



基线稳定性检查

5) 点击上方QC-Binding to reference, 检查各个点是否小于Evaluation-kinetics传感图中对应响应值的20%。如是，直接跳到下一步。注：若Binding to reference各个点的响应值大于Evaluation-kinetics传感图中对应响应值的 20%，即存在非特异性结合。



非特异性结合检查

(2) 亲和力和动力学数据分析

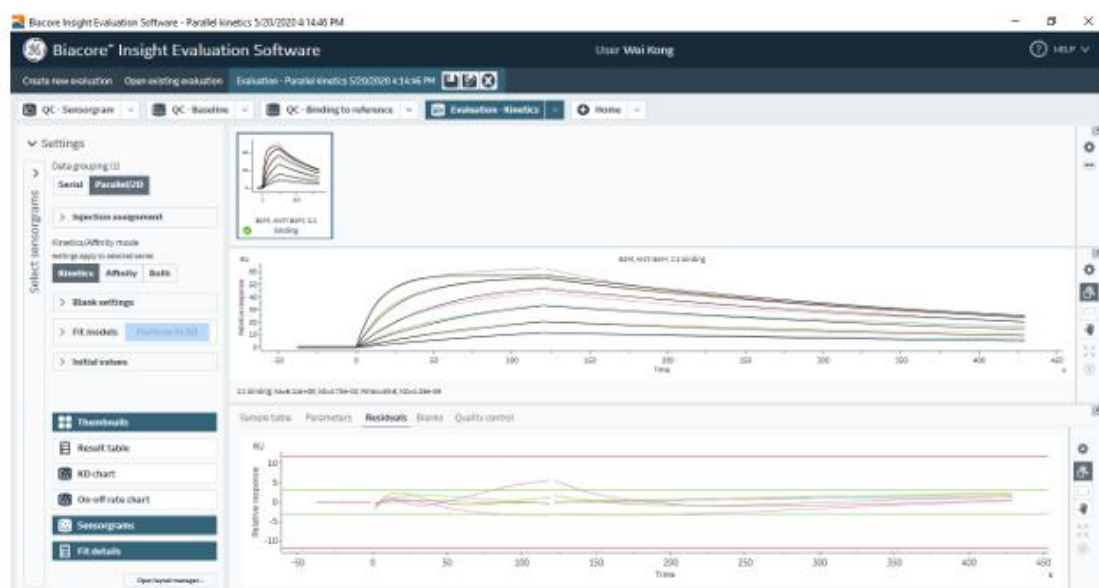
1) 点击上方Evaluation-kinetics, 传感图下方显示, 拟合模型 (1:1 binding)、结合速率常数, 解离速率常数、Rmax、亲和力。

2) 点击传感图下方的Quality Control, 即可呈现系统对数据拟合结果进行智能化评估的结果。绿色打勾图标表明结果符合模型要求, 是高质量的数据结果。本实验的Quality Control结果为绿色, 表明本实验的结果为高质量的数据结果。



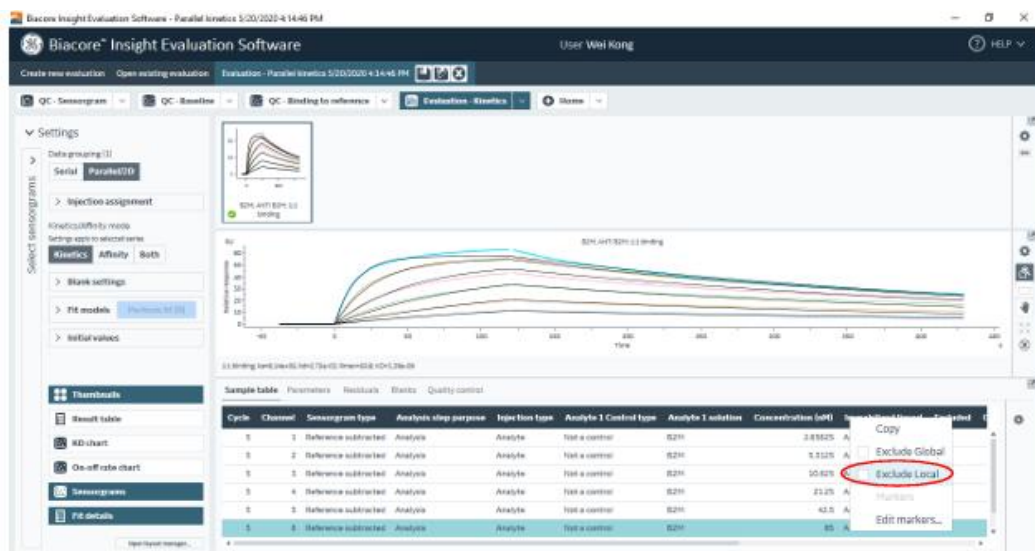
拟合结果评估

3) Residuals是Biacore Insight Evaluation Software的另一特色，点击传感图下方的Residuals，即可直观表现传感图中实际曲线和拟合曲线之间的离散情况。如果大部分的点都位于绿色直线范围之内，表明拟合曲线非常符合实际的数据曲线。如果超出红色直线范围，表明拟合结果的偏差较大，需要具体分析原因。



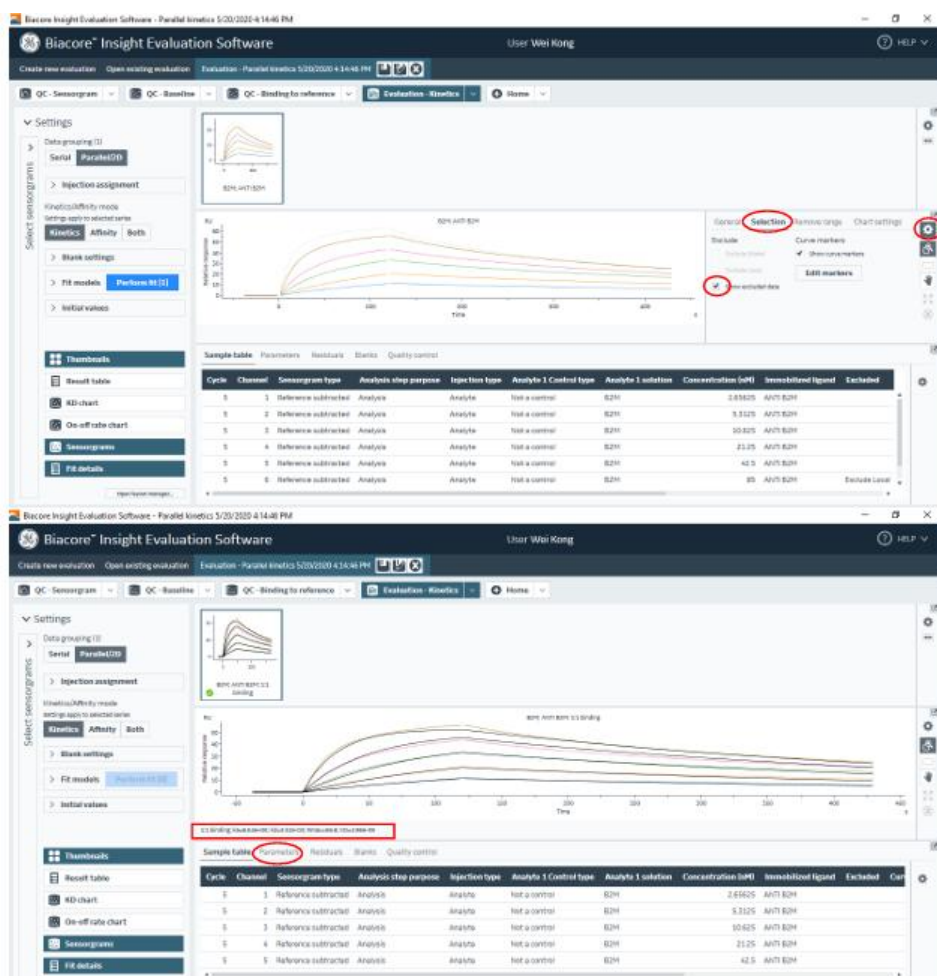
实际曲线和拟合曲线之间的离散情况分析

4) 由Residuals可知，紫色（最高浓度）的离散程度较高，可删除此浓度，重新进行拟合。点击Sample table，鼠标左键选择需要删除的浓度，再点击鼠标右键，左键选择Exclude Local，即可删除此浓度。



离散程度较高的浓度样本删除操作

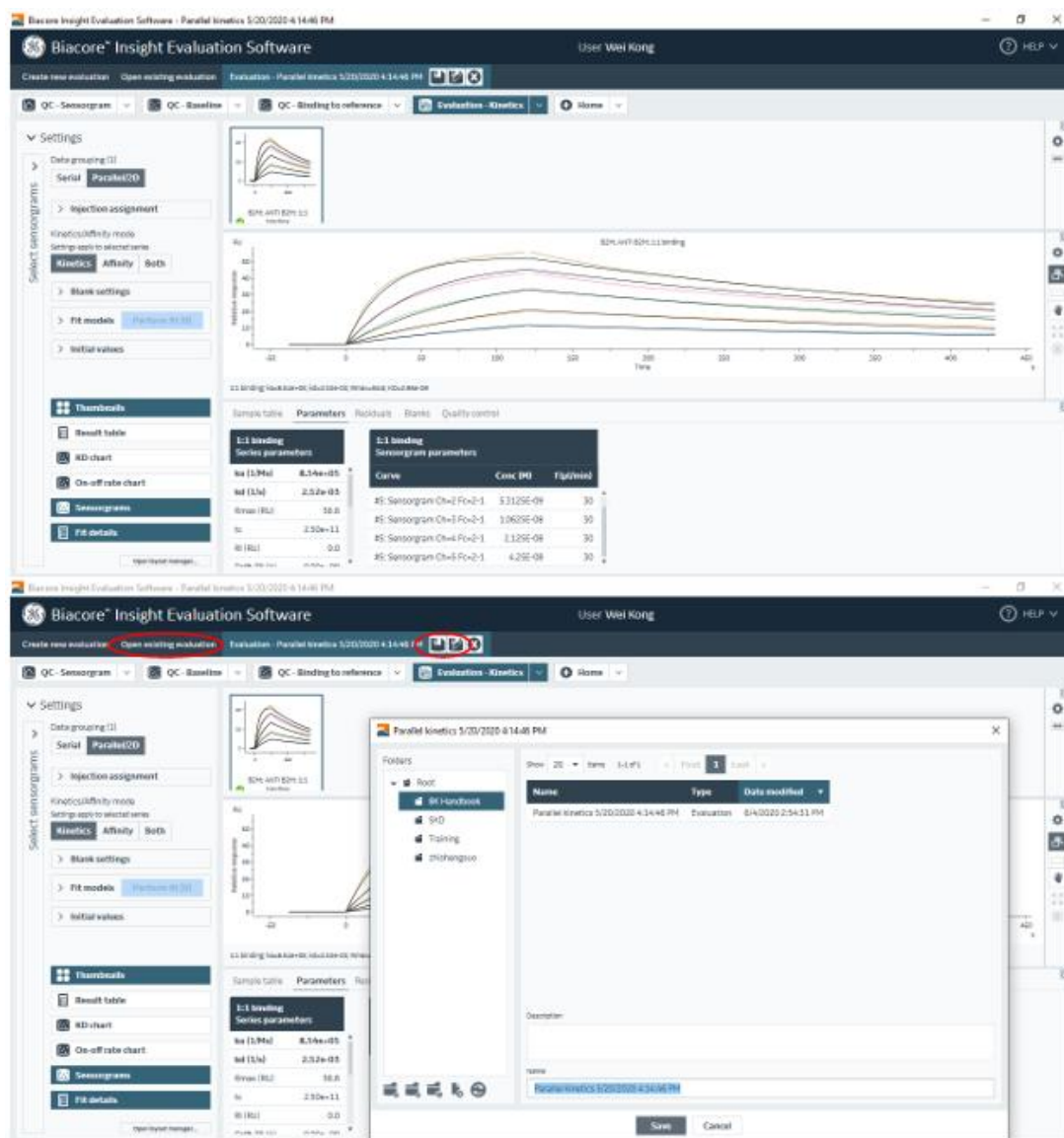
5) 已删除次浓度线会以灰色虚线形式出现在传感图上(此浓度不会被用于拟合)。如需彻底删除, 点击传感图右侧按钮, 选择Selection栏目, 去掉Show excluded data方框前的√。重新点击传感图左侧的Perform fit重新拟合。



重新拟合操作流程

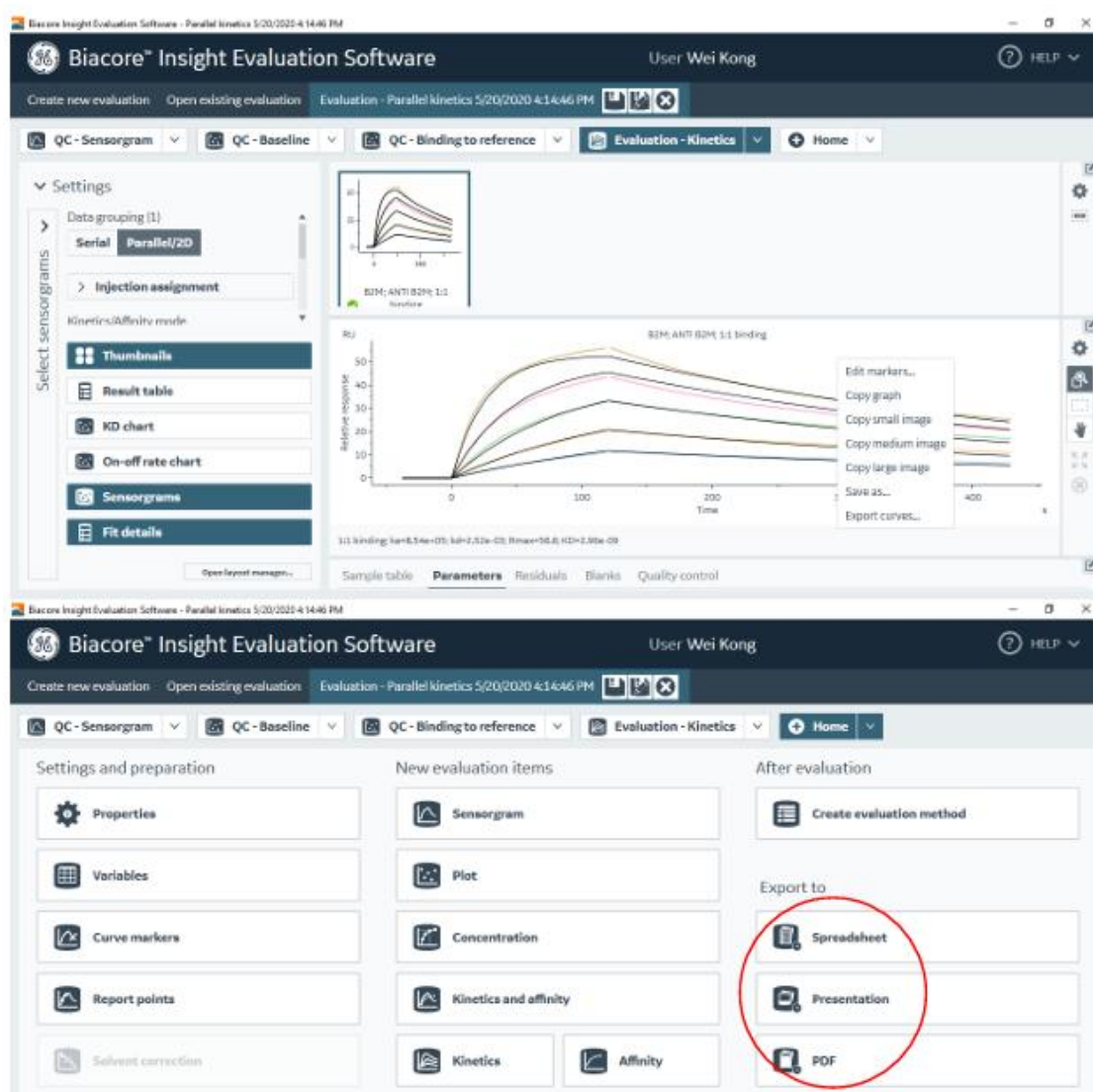
6) 点击传感图下方的Parameters, 该栏中列出了所有的分析数据结果, 包括结合、解离速率常数 (k_a & k_d), R_{max} , χ^2 等重要数据。

7) 点击右上方的文件保存图标, 将分析结果保存在自定义文件夹中, 点击Save。



分析结果保存的操作流程

8) 结果导出。将鼠标放在图上, 点击右键可以直接copy graph或者copy small/ medium/ large image) 用于文章发表, 也可以右键点击export curve, 导出txt文本后自行用第三方软件作图。或者, 点击右上方Home按钮, 根据实际需要, 选择主界面右侧结果输出模式 (包括Excel, PPT, PDF格式)。



数据结果导出及图片输出

2.2.2.5 分析结果表述

打开数据分析软件，载入检测数据文件，运行亲和力分析。由于每个循环基线不同，需先对所有曲线进行基线归零，使所有的传感图的基线对齐且归零。进入分析界面后，选取要分析的数据，选择正确的拟合模型，拟合结束后可以在结果报告中直接读取Kd，表示待测样品和靶标分子的亲和力（mol/L）。

注：空白对照应无明显非特异性结合；拟合曲线应符合典型的1:1结合模型特征；不同浓度之间应呈剂量依赖性；Rmax（理论最大结合值）与实际应接近；拟合曲线卡方值应小，符合软件建议值范围；亲和力拟合Kd值需落在样品浓度范围内，如拟合值超出样品浓度范围，需对待测样本调整浓度梯度，重新检测。若待测样本亲和力极低，待检样本浓度无法达到，可酌情判定是否重新检测。

2.2.2.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的20%。

（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

1、本方法的验证

本标准对酶联免疫吸附法（ELISA）和表面等离子共振法（SPR）测定重组蛋白亲和力进行了验证，为验证2种方法可应用于多个类型的重组蛋白，本标准选择抗体类Anti-H7N9 N蛋白抗体、重组蛋白类Human CD19 (20-291) Protein, His Tag和SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag在内的2种重组蛋白。实验验证样品由本标准起草单位提供，将验证样品送至重庆新一产生命科技有限公司、上海微谱化工技术服务有限公司和百斯医学诊断科技（北京）有限公司，使用本文件规定的方法进行检测，结果均满足该标准要求，验证结果见下表。

重庆新一产生命科技有限公司、上海微谱化工技术服务有限公司和百斯医学诊断科技（北京）有限公司采用酶联免疫吸附法（ELISA）测定样品Anti-H7N9 N蛋白抗体和SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag的Kd值的精密度分别为：8.27%和2.60%、15.67%和2.58%、4.16%和8.36%；采用表面等离子共振法（SPR）测定样品Human CD19 (20-291) Protein, His Tag和SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag的Kd值的精密度分别为：7.14%和15.94%、19.64%和0.83%、14.06%和1.79%。

3家验证单位在重复性条件下每个样品共获得的6次独立测定结果，其中采用酶联免疫吸附法（ELISA）测定的样品Anti-H7N9 N蛋白抗体和SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag的RSD值分别为：5.85%和2.67%；采用表面等离子共振法（SPR）测定的样品Human CD19 (20-291) Protein, His Tag和SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag的RSD值分别为：13.21%和15.94%。

验证单位测定结果1：重庆新一产生命科技有限公司

方法	样品	Kd (mol/L)	算术平均值	差值的绝对值	精密度 (%)
酶联免疫吸附法 (ELISA)	Anti-H7N9 N蛋白抗体	2.14×10^{-10}	2.06×10^{-10}	1.70×10^{-11}	8.27%
		1.97×10^{-10}			
	SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag	1.56×10^{-8}	1.54×10^{-8}	4.00×10^{-10}	2.60%
		1.52×10^{-8}			
表面等离子共振法 (SPR)	Human CD19 (20-291) Protein, His Tag	2.90×10^{-9}	2.80×10^{-9}	2.00×10^{-10}	7.14%
		2.70×10^{-9}			

	SARS-CoV-2 S protein	2.10×10^{-8}	1.95×10^{-8}	3.10×10^{-9}	15.94%
	RBD, His Tag	1.79×10^{-8}			

验证单位测定结果2：上海微谱化工技术服务有限公司

方法	样品	Kd (mol/L)	算术平均值	差值的绝对值	精密度 (%)
酶联免疫吸附法 (ELISA)	Anti-H7N9 N蛋白抗体	2.34×10^{-10}	2.17×10^{-10}	3.40×10^{-11}	15.67%
		2.00×10^{-10}			
	SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag	1.53×10^{-8}	1.55×10^{-8}	4.00×10^{-10}	2.58%
		1.57×10^{-8}			
表面等离子共振法 (SPR)	Human CD19 (20-291) Protein, His Tag	2.46×10^{-9}	2.24×10^{-9}	4.40×10^{-10}	19.64%
		2.02×10^{-9}			
	SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag	2.41×10^{-8}	2.42×10^{-8}	2.00×10^{-10}	0.83%
		2.43×10^{-8}			

验证单位测定结果3：百斯医学诊断科技（北京）有限公司

方法	样品	Kd (mol/L)	算术平均值	差值的绝对值	精密度 (%)
酶联免疫吸附法 (ELISA)	Anti-H7N9 N蛋白抗体	2.21×10^{-10}	2.17×10^{-10}	9.00×10^{-12}	4.16%
		2.12×10^{-10}			
	SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag	1.49×10^{-8}	1.56×10^{-8}	1.30×10^{-9}	8.36%
		1.62×10^{-8}			
表面等离子共振法 (SPR)	Human CD19 (20-291) Protein, His Tag	2.36×10^{-9}	2.21×10^{-9}	3.10×10^{-10}	14.06%
		2.05×10^{-9}			
	SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag	1.66×10^{-8}	1.68×10^{-8}	3.00×10^{-10}	1.79%
		1.69×10^{-8}			

3家验证单位测定结果汇总：

方法	样品	Kd (mol/L)	标准偏差	RSD (%)
酶联免疫吸附法 (ELISA)	Anti-H7N9 N蛋白抗体	2.13×10^{-10}	1.25×10^{-11}	5.85%

	SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag	1.55×10^{-8}	4.14×10^{-10}	2.67%
表面等离子共振法 (SPR)	Human CD19 (20-291) Protein, His Tag	2.42×10^{-9}	3.19×10^{-10}	13.21%
	SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag	2.01×10^{-8}	3.21×10^{-9}	15.94%

3家验证单位出具的验证报告扫描件如下：

1）重庆新一产生命科技有限公司

验证报告

项目名称：《重组蛋白试剂 亲和力和测定方法》

验证单位：重庆新一产生命科技有限公司

验证方法：酶联免疫吸附法（ELISA）

检测样品：Anti-H7N9 N 蛋白抗体

1、实验材料及仪器

主要试剂名称和配制方法或货号如下表：

用途	名称	配制方法或货号
靶标	H7N9 N蛋白	义翘神州40110-V08B
包被液	0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液	50mM CARBONATE, PH 9.5
稀释液和洗液	0.05%吐温-20的磷酸盐缓冲液	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , PH7.4
封闭液	3% BSA 的磷酸盐缓冲液	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , PH7.4
显色工作液	TMB显色工作液	碧云天, P0209
终止液	2 mol/L硫酸	2M sulfuric acid
酶标抗体	兔抗鼠IgG二抗, HRP标记	赛默飞, 61-6520
检测样品	Anti-H7N9 N 蛋白抗体	将待测样品用稀释液稀释配置100 nM的母液, 用稀释液以5倍进行梯度稀释, 获得系列梯度样品溶液, 记录其摩尔浓度。

主要仪器设备及耗材：天平（Sartorius, Cubi® II）、pH计（Sartorius, PB-10）、恒温孵育器（佳温, ET-60）、多功能酶标仪（BMG CLARIOSTAR）、GraphPad Prism (v10.2) 数据处理软件、96孔 ELISA 板（赛默飞, 41121800）。

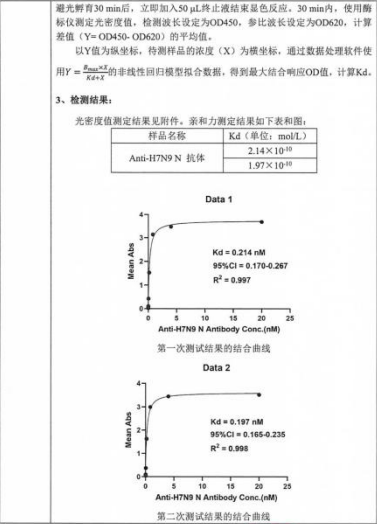
2、试验步骤

取浓度为100 μg/ml的H7N9 N蛋白, 用0.05 mol/L碳酸盐缓冲液（pH 9.6）稀释靶标至1 μg/mL, 以每孔100 μL的量加至酶标板中, 然后将酶标板置于4℃孵育16小时。

清洗：弃去酶标板中的液体, 在吸水纸上轻轻拍干, 然后每孔加入200 μL PBST（0.05%的吐温-20）洗涤缓冲液, 室温静置3 min后弃去酶标板中的液体并在吸水纸上轻轻拍干, 重复5次。

以每孔200 μL的量将3% BSA的PBS封闭液加至酶标板中, 37℃恒温孵育1 h, 清洗后, 将梯度稀释的待测样品各取100 μL加至ELISA包被板中, 每个稀释度的待测样品重复3个孔, 以100 μL的稀释液作为空白对照, 37℃恒温孵育60 min。

再次清洗后, 选择HRP酶标的兔抗鼠IgG二抗, 用稀释液1:5000稀释二抗, 每孔加入100 μL, 避光反应30 min, 再次清洗后, 每孔加入50 μL显色工作液。



验证人（签字）：[Signature]

2025年03月18日

验证单位（盖章）：[Stamp]

2025年03月18日

附件

表1 第一次测试结果数据

样品浓度 (nmol/L)	OD450			OD620			OD450-OD620		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	3.831	3.71	3.627	0.042	0.0412	0.0413	3.789	3.6688	3.5857
4	3.591	3.397	3.561	0.0411	0.0412	0.0422	3.5499	3.3558	3.5188
0.8	3.254	3.157	3.129	0.0415	0.04	0.0403	3.2125	3.117	3.0887
0.16	1.575	1.478	1.64	0.0418	0.0401	0.0405	1.5332	1.4379	1.5995
0.032	0.468	0.444	0.501	0.0414	0.0409	0.0402	0.4266	0.4031	0.4608
0.0064	0.144	0.152	0.16	0.0413	0.0404	0.0405	0.1027	0.1116	0.1195
0.00128	0.106	0.11	0.103	0.0438	0.0403	0.0408	0.0622	0.0697	0.0622
0.000256	0.071	0.069	0.066	0.0497	0.0405	0.0416	0.0213	0.0285	0.0244

表2 第二次测试结果数据

样品浓度 [nM]	OD450			OD620			OD450-OD620		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	3.614	3.512	3.549	0.0414	0.0401	0.0415	3.5726	3.4719	3.5075
4	3.483	3.483	3.494	0.0418	0.0436	0.0418	3.4412	3.4394	3.4522
0.8	3.058	3.026	3.025	0.0404	0.0421	0.0409	3.0176	2.9839	2.9841
0.16	1.716	1.666	1.616	0.0416	0.042	0.041	1.6744	1.624	1.575
0.032	0.443	0.417	0.395	0.0436	0.0411	0.0411	0.3994	0.3759	0.3539
0.0064	0.155	0.143	0.132	0.0417	0.0412	0.0444	0.1133	0.1018	0.0876
0.00128	0.084	0.077	0.073	0.0402	0.0402	0.042	0.0438	0.0368	0.031
0.000256	0.085	0.066	0.067	0.0412	0.0416	0.0408	0.0438	0.0244	0.0262

（a）酶联免疫吸附法（ELISA）-Anti-H7N9 N 蛋白抗体

验证报告

项目名称:《重组蛋白试剂 亲和力和测定方法》

验证单位:重庆新一生命科技有限公司

验证方法:酶联免疫吸附法(ELISA)

检测样品:SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag (Gen No: 2019-02-05-CS2H3)

1. 实验材料及仪器

主要试剂名称和配制方法

用途	名称	配制方法或货号
靶标	Human ACE2, Fe Tag	Acro Biosystems, AC2-H5257
包被液	ELISA包被液 (10x)	使用去离子水稀释10倍
洗涤液	20 x TBST缓冲液	使用去离子水稀释20倍
封闭液	2% BSA的TBST缓冲液	称取2.0 g BSA, 加入100 mL的TBST(1x)
稀释液	0.5% TBST缓冲液	每100 mL的TBST(1x)洗液中加入0.5 g BSA
显色工作液	TMB显色工作液	称取20 mg TMB, 加入到1 mL DMSO中; 然后取250 μL, 与30 μL 3% H ₂ O ₂ 一起加入到50 mL底物缓冲液中
终止液	2 N盐酸	将27.2 mL 98% H ₂ SO ₄ 加入到472.8 mL超纯水中
酶标抗体	HRP Anti-His tag Antibody (AY63), mAb	Acro Biosystems, HIS-PLM535
检测样品	SARS-CoV-2 S protein RBD	用稀释液稀释至所需浓度 (0.0195-20 μg/mL), 并将母液用稀释液以2倍进行梯度稀释, 获得系列梯度样品溶液, 记录其摩尔浓度。

主要仪器设备及耗材: 天平 (Sartorius, Cubis® II), pH 计 (Sartorius, PB-10), 恒温孵育器 (德祥, ET-60), 多功能酶标仪 (BMG CLARISTAR), GraphPad Prism (v10.2) 数据处理软件, 96 孔 ELISA 板 (赛默飞, 41121800)。

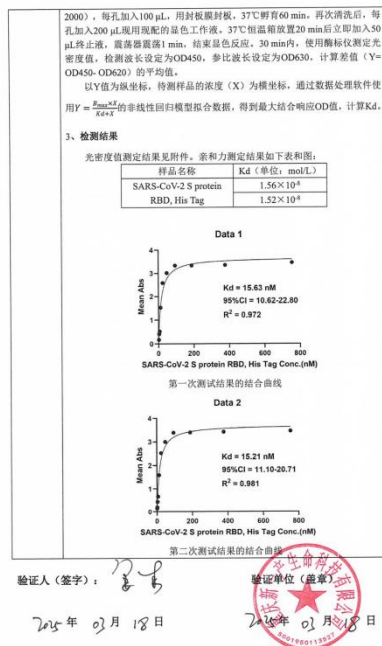
2. 试验步骤

取浓度为100 μg/mL的H7N9 N蛋白, 用0.05 mol/L碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释靶标至1 μg/mL, 以每孔100 μL的量加至酶标板中, 然后将酶标板置于4℃孵育16小时。

清洗: 弃去酶标板中的液体, 在吸水纸上轻轻拍干, 然后每孔加入200 μL PBST (0.05%的吐温-20) 洗涤缓冲液, 室温静置3 min后弃去酶标板中的液体并在吸水纸上轻轻拍干, 重复5次。

以每孔200 μL的量将3% BSA的PBS封闭液加至酶标板中, 37℃恒温孵育1 h, 清洗后, 将得到的待测样品系列溶液各取100 μL加至Elisa包被板中, 每个稀释度的待测样品重复3孔, 以100 μL的稀释液作为空白对照, 37℃恒温器中孵育60 min。

再次清洗后, 按说明书选择抗体稀释液按指定比例稀释酶标抗体 (1:



附件

表 1 第一次测试结果数据

样品浓度 [nM]	OD450			OD630			OD450-OD630		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
754.72	3.500	3.529	3.471	0.038	0.039	0.038	3.462	3.490	3.433
377.36	3.393	3.420	3.367	0.037	0.038	0.036	3.356	3.382	3.331
188.68	3.383	3.405	3.361	0.045	0.046	0.044	3.338	3.359	3.317
94.34	3.372	3.398	3.347	0.037	0.038	0.037	3.335	3.360	3.310
47.17	2.977	3.063	2.896	0.037	0.038	0.037	3.014	3.101	2.933
23.58	2.619	2.642	2.598	0.037	0.037	0.036	2.582	2.605	2.562
11.79	1.567	1.590	1.544	0.038	0.039	0.038	1.529	1.551	1.506
5.90	0.562	0.585	0.547	0.038	0.039	0.038	0.524	0.546	0.509
2.95	0.449	0.466	0.433	0.037	0.038	0.037	0.412	0.429	0.397
1.47	0.218	0.233	0.206	0.045	0.046	0.044	0.173	0.187	0.162
0.74	0.210	0.226	0.194	0.037	0.038	0.036	0.173	0.188	0.158

表 2 第二次测试结果数据

样品浓度 [nM]	OD450			OD630			OD450-OD630		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
754.72	3.500	3.518	3.480	0.038	0.037	0.039	3.462	3.481	3.441
377.36	3.394	3.385	3.376	0.038	0.037	0.039	3.432	3.422	3.415
188.68	3.439	3.455	3.412	0.037	0.036	0.038	3.402	3.419	3.374
94.34	3.423	3.438	3.409	0.037	0.036	0.038	3.386	3.402	3.371
47.17	3.036	3.052	3.021	0.038	0.036	0.039	2.998	3.016	2.982
23.58	2.496	2.507	2.465	0.037	0.038	0.036	2.533	2.545	2.501
11.79	1.625	1.636	1.612	0.037	0.036	0.038	1.588	1.600	1.574
5.90	0.705	0.716	0.694	0.037	0.036	0.038	0.668	0.680	0.656
2.95	0.475	0.485	0.469	0.038	0.037	0.039	0.437	0.448	0.430
1.47	0.244	0.251	0.239	0.037	0.036	0.038	0.207	0.215	0.201
0.74	0.190	0.198	0.184	0.038	0.037	0.039	0.152	0.161	0.145

(b) 酶联免疫吸附法 (ELISA) -SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag

验证报告

项目名称:《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》

验证单位: 重庆新一产生命科技有限公司

验证方法: 表面等离子共振法 (SPR)

检测样品: Human CD19 (20-291) Protein, His Tag (Cytiva, CD9-H52H2)

1、实验材料及仪器

主要试剂:

靶标: FMC63 MAbs (Mouse IgG2a) (Acro Biosystems, 751 µg/mL)。

运行缓冲液: 含10 mM N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES), 150 mM氯化钠 (NaCl), 3 mM乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.005%吐温-20 (Tween-20), pH调节至7.4。

活化试剂: 400 mM EDC和100 mM NHS。

再生试剂: 10 mM甘氨酸盐酸, pH1.7。

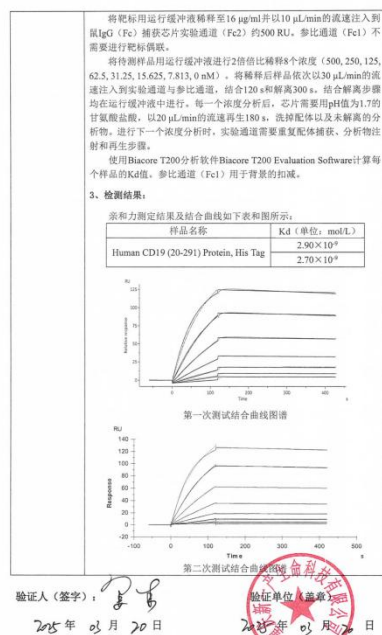
主要仪器及耗材: SPR生物分子互作分析仪 (Biacore T200)、CM5芯片 (BR100530)、Zeba 离心式脱盐柱 (Thermo Fisher, Pierce-89890)、微量分光光度计 (SPECTROstar^{plus}, BMG LABTECH)。

2、试验步骤

将兔抗鼠IgG抗体用固定试剂 (10 mM醋酸钠, pH5.0) 稀释到30 µg/mL, 20 µL兔抗鼠IgG抗体加入到648 µL固定试剂中用于构建靶标捕获表面。然后用400 mM EDC和100 mM NHS以10 µL/min的流速对CM5芯片表面进行420 s的活化, 将30 µg/mL的兔抗鼠IgG抗体以10 µL/min的流速注入到实验通道 (Fc2) 约420 s, 固定量为9000至1400 RU。最后, 芯片用1 M 乙醇胺以10 µL/min进行420 s封闭。参比通道 (Fc1) 与试验通道 (Fc2) 进行相同的操作。

使用脱盐柱及运行试剂将待测重组蛋白试剂进行脱盐处理, 处理后的样品用SPECTROstar^{plus}进行浓度测定。

蛋白名称	样品原液浓度 (mg/mL)	样品原始溶剂	样品脱盐后浓度 (mg/mL)
Human CD19 (20-291) Protein, His Tag	0.629	1 st PBS, pH7.3 with 0.01% Tween80, 11% Thiosulphate	0.6124



(c) 表面等离子共振法 (SPR) -Human CD19 (20-291) Protein, His Tag

验证报告

项目名称:《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》

验证单位: 重庆新一产生命科技有限公司

验证方法: 表面等离子共振法 (SPR)

检测样品: SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag (Cytiva, SPD-C52H3)

1、实验材料及仪器

主要试剂:

靶标: Human ACE2, Fe Tag (Acro Biosystems, AC2-H5257)。

运行缓冲液: 含10 mM N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES), 150 mM氯化钠 (NaCl), 3 mM乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.005%吐温-20 (Tween-20), pH调节至7.4。

活化试剂: 400 mM EDC和100 mM NHS。

再生试剂: 10 mM甘氨酸盐酸, pH1.5。

主要仪器及耗材: SPR生物分子互作分析仪 (Biacore 8K)、Protein A捕获芯片 (Cytiva, 29127556)、Zeba 离心式脱盐柱 (Thermo Fisher, Pierce-89890)、微量分光光度计 (Thermo Fisher, Nanodrop)。

2、试验步骤

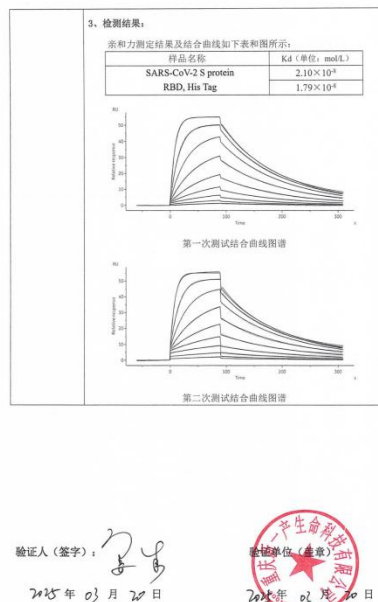
使用运行缓冲液以恒定速率进行系统预冲洗至基线稳定后, 用活化试剂活化芯片表面, 将靶标用运行缓冲液或稀释至5 µg/ml并以10 µL/min的流速注入到Protein A捕获芯片实验通道 (Fc2) 约200 RU。参比通道 (Fc1) 不需要进行靶标的偶联。

使用脱盐柱及运行试剂将待测重组蛋白试剂进行脱盐处理, 处理后的样品用SPECTROstar^{plus}进行浓度测定。

蛋白名称	样品原液浓度 (mg/mL)	样品原始溶剂	样品脱盐后浓度 (mg/mL)
SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag	0.6	1 st HEPES with 0.005% Tween-20, pH7.4	0.52

将待测样品用运行缓冲液进行2倍倍比稀释10个浓度 (250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953, 0.977, 0 nM)。将稀释后的待测样品依次以30 µL/min的流速注入到实验通道与参比通道, 结合90 s和解离210 s。结合解离步骤均在运行缓冲液中进行。每一个浓度分析后, 芯片需用pH值为1.5的甘氨酸盐酸, 以20 µL/min的流速再生30 s。洗脱配体以及未解离的分析物, 进行下一个浓度分析时, 实验通道需要重复配体捕获、分析物注射和再生步骤。

使用Biacore 8K分析软件Biacore Insight Evaluation Software计算每个样品的Kd值。参比通道 (Fc1) 用于背景的扣减。



(d) 表面等离子共振法 (SPR) -SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag

2) 上海微谱化工技术服务有限公司

验证报告

项目名称:《重组蛋白亲和力和测定方法》

验证单位:上海微谱化工技术服务有限公司

验证方法:酶联免疫吸附法(ELISA)

检测样品:Anti-H7N9 N 蛋白抗体 (1 mg/mL)

1、实验材料及仪器

主要试剂名称和配制方法或货号如下表:

用途	名称	配制方法或货号					
靶标	H7N9 N蛋白	艾碧神州40110-V08B					
包被液	0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液	50mM CARBONATE, PH 9.5					
稀释液和洗涤缓冲液	0.05%吐温-20的磷酸盐缓冲液	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , PH7.4					
封闭液	3% BSA 的磷酸盐缓冲液	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , PH7.4					
显色工作液	TMB显色工作液	碧云天, P0209					
终止液	2 mol/L硫酸	2M sulfuric acid					
酶标抗体	兔抗鼠IgG二抗, HRP标记	赛默飞, 61-6520					
检测原理、试剂、检测过程及结果	检测样品: Anti-H7N9 N 蛋白抗体 检测原理: 将待测样品用稀释液稀释至100 nM的母液, 用稀释液以5倍进行梯度稀释, 获得系列梯度样品溶液, 记录其摩尔浓度。						
主要仪器设备	天平、pH 计、恒温孵育器、Gen5 酶标仪 (BioTek)、GraphPad Prism (v10.2) 数据处理软件、96 孔 ELISA 板。						
2、试验步骤	取浓度为100 μg/mL的H7N9 N蛋白, 用0.05 mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释至1 μg/mL, 以每孔100 μL的量加至酶标板中, 然后将酶标板置于4℃孵育16小时。 清洗: 弃去酶标板中的液体, 在吸水纸上轻轻拍干, 然后每孔加入200 μL PBST (0.05%的吐温-20) 洗涤缓冲液, 室温静置3 min后弃去酶标板中的液体并在吸水纸上轻轻拍干, 重复5次。 以每孔200 μL的量将3% BSA的PBS封闭液加至酶标板中, 37℃恒温孵育1 h。清洗后, 将梯度稀释的待测样品各取100 μL加至Elsaa包被板中, 每个稀释度的待测样品重复3个孔, 以100 μL的稀释液作为空白对照, 37℃恒温孵育60 min。 再次清洗后, 选择HRP酶标的兔抗鼠IgG二抗, 用稀释液1:5000稀释二抗, 每孔加入100 μL, 避免反应30 min。再次清洗后, 每孔加入50 μL显色工作液, 避光孵育30 min后, 立即加入50 μL终止液结束显色反应。30 min内, 使用酶标仪测定光密度值, 检测波长设定为OD450, 参比波长设定为OD620, 计算差值 (Y=OD450-OD620) 的平均值。 以Y值为纵坐标, 待测样品的浓度 (X) 为横坐标, 通过数据处理软件使用 $Y = \frac{b_0 + b_1 X}{K_d + X}$ 的非线性回归模型拟合数据, 得到最大结合响应OD值, 计算K _d 。 3、检测结果: 光密度测定结果见附件。亲和力和测定结果如下表: <table><thead><tr><th>样品名称</th><th>K_d (单位: nM)</th></tr></thead><tbody><tr><td>Anti-H7N9 N 抗体</td><td>2.34×10⁻¹⁰</td></tr><tr><td></td><td>2.00×10⁻¹⁰</td></tr></tbody></table> <div><div>Data 1</div><div>第一次测试结果的结合曲线</div><div>Data 2</div><div>第二次测试结果的结合曲线</div></div>	样品名称	K _d (单位: nM)	Anti-H7N9 N 抗体	2.34×10 ⁻¹⁰		2.00×10 ⁻¹⁰
样品名称	K _d (单位: nM)						
Anti-H7N9 N 抗体	2.34×10 ⁻¹⁰						
	2.00×10 ⁻¹⁰						

验证人(签字): 1212121212

验证日期(盖章): 2025年06月18日

2025年06月18日

检测专用章

附件

表 1 第一次测试结果数据

样品浓度 (nM)	OD450			OD620			OD450-OD620		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	3.674	3.614	3.587	0.0417	0.0447	0.0417	3.6326	3.5723	3.7023
4	3.686	3.543	3.559	0.0415	0.0412	0.0416	3.6445	3.5018	3.5174
0.8	3.087	2.864	2.927	0.0421	0.0407	0.0417	3.0449	2.8233	
0.16	1.808	1.397	1.457	0.043	0.0405	0.0412	1.765	1.3565	1.4158
0.032	0.523	0.388	0.385	0.0407	0.0405	0.0413	0.4823	0.3475	0.3437
0.0064	0.136	0.115	0.116	0.0411	0.0406	0.0404	0.0949	0.0744	0.0756
0.00128	0.071	0.064	0.06	0.0431	0.0412	0.0409	0.0279	0.0228	0.0191
0.000256	0.064	0.056	0.059	0.0402	0.0418	0.0407	0.0238	0.0142	0.0183

表 2 第二次测试结果数据

样品浓度 (nM)	OD450			OD620			OD450-OD620		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	3.475	3.502	3.519	0.0414	0.0413	0.0452	3.4336	3.4607	3.4738
4	3.247	3.418	3.367	0.0422	0.0503	0.0445	3.2048	3.3677	3.3225
0.8	2.92	3.003	3.012	0.0409	0.0414	0.0407	2.8791	2.9616	2.9713
0.16	1.42	1.547	1.706	0.0411	0.0453	0.0413	1.3789	1.5017	1.6647
0.032	0.441	0.486	0.492	0.0405	0.0403	0.0404	0.4005	0.4457	0.4516
0.0064	0.131	0.152	0.157	0.042	0.0419	0.0407	0.089	0.1101	0.1163
0.00128	0.077	0.083	0.09	0.041	0.0413	0.0406	0.036	0.0417	0.0494
0.000256	0.075	0.069	0.181	0.0402	0.0402	0.0416	0.0348	0.0288	0.1394

(a) 酶联免疫吸附法 (ELISA) -Anti-H7N9 N 蛋白抗体

验证报告

项目名称:《重组蛋白的酶联免疫吸附测定方法》

验证单位:上海微谱生化技术有限公司

验证方法:酶联免疫吸附法 (ELISA)

检测样品:SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag (Cat. No. SPD-C52H3)

检测原理、试剂、检测过程及结果

1、实验材料及仪器

主要试剂名称和配制方法或货号如下表:

用途	名称	配制方法或货号
靶标	Human ACE2, Fe Tag	Acro Biosystems, AC2-H5257
包被液	ELISA包被液 (10x)	使用去离子水稀释10倍
洗涤液	20 xTBS缓冲液	使用去离子水稀释20倍
封闭液	2% BSA的TBS缓冲液	称取2.0 g BSA, 加入100 mL的TBS(1x)
稀释液	0.5%TBS缓冲液	称100 mL的TBS(1x)溶液中加入0.5 g BSA
显色工作液	TMB显色工作液	称取20 mg TMB, 加入1 mL DMSO(1x), 然后取250 μL, 与30 μL 3% H ₂ O ₂ 一起加入到50 mL底物缓冲液中。
终止液	2 N硫酸	将27.2 mL 98% H ₂ SO ₄ 加入到472.8 mL超纯水中
酶标抗体	HRP conjugated Anti-His tag Antibody (AY63), mAb	Acro Biosystems, HIS-PLM535
检测样品	SARS-CoV-2 S protein RBD	用稀释液稀释至所需浓度 (0.0195-20 μg/mL), 并将母液用稀释液以2倍进行梯度稀释, 获得系列梯度样品溶液, 记录其摩尔浓度。

主要仪器设备及耗材:天平、pH计、恒温孵育器、多功能酶标仪 (BMG CLARIOSTAR)、GraphPad Prism (v10.2) 数据处理软件、96 ELISA 板。

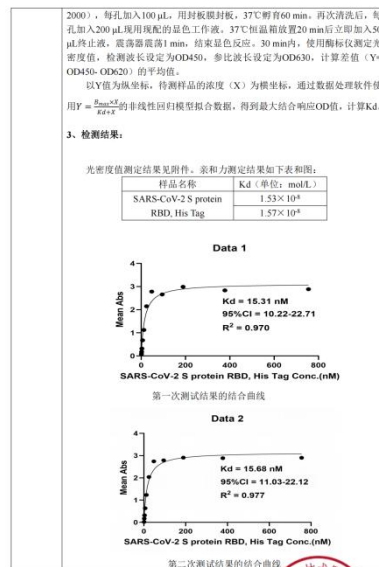
2、试验步骤

取浓度为100 μg/mL的HTN9 N蛋白, 用0.05 mol/L碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释靶标至1 μg/mL, 以每孔100 μL的量加入至酶标板中, 然后将酶标板置于4℃孵育16小时。

清洗: 弃去酶标板中的液体, 在吸水纸上轻轻拍干。然后每孔加入200 μL PBST (0.05%的吐温-20) 洗涤缓冲液, 室温静置3 min后弃去酶标板中的液体并在吸水纸上轻轻拍干, 重复5次。

以每孔200 μL的量将3% BSA的PBST封闭液加入至酶标板中, 37℃恒温孵育1 h。清洗后, 将得到的待测样品系列溶液各取100 μL加入至Elsa包被板中, 每个稀释度的待测样品重复3个孔, 以100 μL的稀释液作为空白对照, 37℃恒温孵育60 min。

再次清洗后, 按说明书选择抗体稀释液按指定比例稀释酶标抗体 (1:



验证人 (签字): 12月4日

验证单位 (盖章): 上海微谱生化技术有限公司

2025年 06月 18日

附件

表1 第一次测试结果数据

样品浓度 (nM)	OD450			OD630			OD450-OD630		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
754.72	2.921	2.934	2.911	0.036	0.034	0.038	2.885	2.900	2.873
377.36	2.872	2.883	2.860	0.037	0.035	0.039	2.835	2.848	2.821
188.68	3.025	3.035	3.013	0.036	0.034	0.037	2.989	3.001	2.976
94.34	2.903	2.912	2.894	0.247	0.240	0.252	2.656	2.672	2.642
47.17	2.817	2.829	2.806	0.036	0.034	0.037	2.781	2.795	2.769
23.58	2.188	2.197	2.178	0.038	0.037	0.039	2.150	2.160	2.139
11.79	1.163	1.172	1.153	0.037	0.035	0.039	1.126	1.137	1.114
5.90	0.715	0.723	0.709	0.037	0.036	0.038	0.678	0.687	0.671
2.95	0.351	0.361	0.346	0.036	0.035	0.037	0.315	0.326	0.309
1.47	0.214	0.223	0.209	0.037	0.036	0.038	0.177	0.187	0.171
0.74	0.118	0.125	0.114	0.036	0.035	0.037	0.082	0.090	0.077

表2 第二次测试结果数据

样品浓度 (nM)	OD450			OD630			OD450-OD630		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
754.72	2.938	2.965	2.908	0.035	0.033	0.037	2.903	2.932	2.871
377.36	2.921	2.952	2.890	0.037	0.035	0.038	2.884	2.917	2.852
188.68	2.949	2.980	2.911	0.037	0.036	0.038	2.912	2.944	2.873
94.34	2.825	2.858	2.792	0.037	0.035	0.039	2.788	2.823	2.753
47.17	2.779	2.808	2.751	0.038	0.036	0.039	2.741	2.772	2.712
23.58	2.075	2.101	2.050	0.038	0.037	0.039	2.037	2.064	2.011
11.79	1.271	1.299	1.243	0.038	0.036	0.040	1.233	1.263	1.203
5.90	0.674	0.701	0.647	0.038	0.037	0.039	0.636	0.664	0.608
2.95	0.354	0.381	0.327	0.035	0.033	0.036	0.319	0.348	0.291
1.47	0.208	0.234	0.182	0.037	0.035	0.039	0.171	0.199	0.143
0.74	0.059	0.055	0.067	0.037	0.035	0.039	0.022	0.020	0.028

(b) 酶联免疫吸附法 (ELISA) -SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag

验证报告

项目名称:《重组蛋白亲和力和测定方法》

验证单位:上海微谱技术服务有限公司

验证方法:表面等离子共振法 (SPR)

检测样品:Human CD19 (20-291) Protein, His Tag (Cat. No. CD9-HS2H2)

1、实验材料及仪器

主要试剂:

靶标: FMC63 MAh (Mouse IgG2a) (Acro Biosystems, 751 µg/mL)。

运行缓冲液: 含10 mM N-(2-羟乙基)哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES), 150 mM氯化钠 (NaCl), 3 mM乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.005%吐温-20 (Tween-20), pH调节至7.4。

鼠IgG (Fc) 捕获试剂盒, 2型 (货号: 29215281, Cytiva), 其中包括: 兔抗鼠IgG抗体 (1 mg/mL), 固定试剂 (10 mM醋酸钠, pH5.0), 再生试剂 (10 mM甘氨酸盐酸, pH1.7)。

氨基偶联试剂盒 (货号: BR100050, Cytiva): 115 mg N-羟基丁二酰亚胺 (NHS), 750 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和10.5 mL 1 M乙醇胺 (pH8.5)。每管EDC和NHS分别加入10 mL去离子水, 分装保存于-18℃至更低温度, 保质期两个月。

活化试剂: 400 mM EDC和100 mM NHS。

再生试剂: 10 mM甘氨酸盐酸, pH1.7。

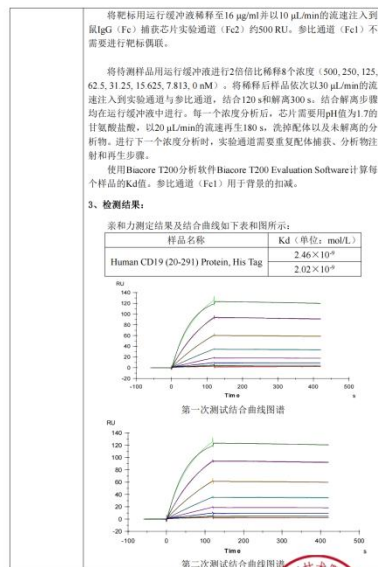
主要仪器及耗材: SPR生物分子互作分析仪 (Biacore T200)、CM5芯片 (BR100050)、Zeba 离心式脱盐柱 (Thermo Fisher, Pierce-89890)、微量分光光度计 (SPECTROstar[®], BMG LABTECH)。

2、试验步骤

将兔抗鼠IgG抗体用固定试剂 (10 mM醋酸钠, pH5.0) 稀释到30 µg/mL, 20 µL兔抗鼠IgG抗体加入至648 µL固定试剂中用于构建靶标捕获表面。然后加入400 mM EDC和100 mM NHS以10 µL/min的流速对CM5芯片表面进行420 s的活化。将30 µg/mL的兔抗鼠IgG抗体以10 µL/min的流速注入到实验通道 (Fc2) 约420 s, 固定量为9000至14000 RU。最后, 芯片用1 M乙醇胺以10 µL/min进行420 s封闭。参比通道 (Fc1) 与试验通道 (Fc2) 进行相同的操作。

使用脱盐柱及运行试剂将待测重组蛋白试剂进行脱盐处理, 处理后的样品用SPECTROstar[®]进行浓度测定。

蛋白名称	样品原浓度 (mg/mL)	样品原始溶剂	样品脱盐后浓度 (mg/mL)
Human CD19 (20-291) Protein, His Tag	0.629	1*PBS, pH7.3 with 0.01% Tween80, 11% Trehalose	0.6124



验证人 (签字): 刘彩娜

验证单位 (盖章): 上海微谱技术服务有限公司

2025年 06月 18日

2025年 06月 18日

检测检测专用章

(c) 表面等离子共振法 (SPR) -Human CD19 (20-291) Protein, His Tag

验证报告

项目名称:《重组蛋白亲和力和测定方法》

验证单位:上海微谱技术服务有限公司

验证方法:表面等离子共振法 (SPR)

检测样品:SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag (Cat. No. SPD-C52H3)

1、实验材料及仪器

主要试剂:

靶标: Human ACE2, Fc Tag (Acro Biosystems, AC2-HS257)。

运行缓冲液: 含10 mM N-(2-羟乙基)哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES), 150 mM氯化钠 (NaCl), 3 mM乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.005%吐温-20 (Tween-20), pH调节至7.4。

活化试剂: 400 mM EDC和100 mM NHS。

再生试剂: 10 mM甘氨酸盐酸, pH1.5。

主要仪器及耗材: SPR生物分子互作分析仪 (Biacore 8K)、Protein A捕获芯片 (Cytiva, 29127556)、Zeba 离心式脱盐柱 (Thermo Fisher, Pierce-89890)、微量分光光度计 (SPECTROstar[®], BMG LABTECH)。

2、试验步骤

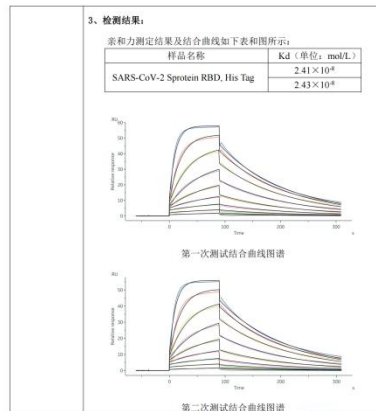
使用运行缓冲液以恒定速率进行系统预冲洗至基线稳定后, 用活化试剂活化芯片表面。将靶标用运行缓冲液稀释至5 µg/mL并以10 µL/min的流速注入到Protein A捕获芯片实验通道 (Fc2) 约200 RU, 参比通道 (Fc1) 不需要进行靶标的偶联。

使用脱盐柱及运行试剂将待测重组蛋白试剂进行脱盐处理, 处理后的样品用SPECTROstar[®]进行浓度测定。

蛋白名称	样品原浓度 (mg/mL)	样品原始溶剂	样品脱盐后浓度 (mg/mL)
SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag	0.6	1*HEPES with 0.005% Tween-20, pH7.4	0.52

将待测样品用运行缓冲液进行2倍倍比稀释10个浓度 (250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953, 0.977, 0.488)。将稀释后的待测样品依次以30 µL/min的流速注入到实验通道与参比通道。结合90 s和解离210 s。结合解离步骤均在运行缓冲液中进行。每一个浓度分析后, 芯片需要用pH值为1.5的甘氨酸盐酸, 以20 µL/min的流速再生30 s, 洗掉配体以及未解离的分析物。进行下一个浓度分析时, 实验通道需要重复配体捕获、分析物注射和再生步骤。

使用Biacore 8K分析软件Biacore Insight Evaluation Software计算每个样品的Kd值。参比通道 (Fc1) 用于背景的扣减。



验证人 (签字): 刘彩娜

验证单位 (盖章): 上海微谱技术服务有限公司

2025年 06月 18日

2025年 06月 18日

检测检测专用章

(d) 表面等离子共振法 (SPR) -SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag

3) 百斯医学诊断科技（北京）有限公司



附件

表 1 第一次测试结果数据

样品浓度 (nM)	OD450			OD620			OD450-OD620		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	3.496	3.443	3.561	0.0424	0.043	0.0431	3.4526	3.4	3.5179
4	3.443	3.424	3.435	0.0413	0.0411	0.0408	3.4017	3.3829	3.3942
0.8	3.001	3.047	3.229	0.0453	0.0599	0.0408	2.9557	2.9871	3.1882
0.16	1.531	1.375	1.416	0.0433	0.0418	0.0437	1.4877	1.3332	1.3723
0.032	0.43	0.378	0.475	0.0462	0.0523	0.0592	0.3838	0.3257	0.4158
0.0064	0.173	0.168	0.18	0.0399	0.0417	0.0498	0.1331	0.1263	0.1302
0.00128	0.084	0.091	0.091	0.0688	0.041	0.042	0.0152	0.05	0.049
0.000256	0.068	0.072	0.07	0.043	0.041	0.042	0.025	0.031	0.028

表 2 第二次测试结果数据

样品浓度 (nM)	OD450			OD620			OD450-OD620		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	3.658	3.452	3.566	0.0414	0.0422	0.0407	3.6166	3.4098	3.5253
4	3.464	3.33	3.436	0.0411	0.0404	0.0411	3.4229	3.2896	3.3949
0.8	3.141	2.907	2.937	0.0477	0.0464	0.041	3.0933	2.8606	2.896
0.16	1.72	1.503	1.412	0.0425	0.0431	0.0453	1.6775	1.4599	1.3667
0.032	0.373	0.443	0.522	0.0499	0.053	0.0446	0.3231	0.39	0.4774
0.0064	0.204	0.187	0.165	0.0407	0.0407	0.0406	0.1633	0.1463	0.1244
0.00128	0.086	0.081	0.081	0.0418	0.0415	0.0432	0.0442	0.0395	0.0378
0.000256	0.066	0.066	0.071	0.0404	0.0434	0.0404	0.0256	0.0226	0.0306

(a) 酶联免疫吸附法 (ELISA) -Anti-H7N9 N 蛋白抗体

验证报告

项目名称:《重组蛋白纯化、检测及鉴定方法》

验证单位:百斯医药科技(北京)有限公司

验证方法:酶联免疫吸附法(ELISA)

检测样品:SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag (Cat. No. SPD-CS2H3)

1. 实验材料及仪器

主要试剂名称和配制方法或货号如下表:

用途	名称	配制方法或货号
靶标	Human ACE2, Fe Tag	Acro Biosystems, AC2-H5257
包被液	ELISA包被液 (10x)	使用去离子水稀释10倍
洗涤缓冲液	20xTBST缓冲液	使用去离子水稀释20倍
封闭液	2% BSA的TBST缓冲液	称取2.0g BSA, 加入100 mL的TBST(1x)
稀释液	0.5%TBST缓冲液	每100 mL的TBST(1x)溶液中加入0.5g BSA
显色工作液	TMB显色工作液	称取20 mg TMB, 加入到1 mL DMSO中; 然后取250 μL, 与30 μL 3% H ₂ O ₂ 一起加入到50 mL 底物缓冲液中。
终止液	2 N硫酸	将27.2 mL 98% H ₂ SO ₄ 加入到472.8 mL超纯水中
酶标抗体	HRP conjugated Anti-His tag Antibody (AY63), mAb	Acro Biosystems, HIS-PLM535
检测原理、试剂、检测过程及结果	检测样品	用稀释液稀释至所需浓度 (0.0195-20 μg/mL), 并将每孔用稀释液以2倍进行梯度稀释, 获得系列梯度样品溶液, 记录其摩尔浓度。

主要仪器设备及耗材:天平、pH计、恒温孵育器、多功能酶标仪(BMG CLARIOSTAR), GraphPad Prism (v10.2) 数据处理软件, 96 ELISA 板。

2. 试验步骤

取浓度为100 μg/mL的147N9 N蛋白, 用0.05 mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释靶标至1 μg/mL, 以每孔100 μL的量加至酶标板中, 然后将酶标板置于4℃孵育16小时。

清洗: 弃去酶标板中的液体, 在吸水纸上轻轻拍干, 然后每孔加入200 μL PBST (0.05%的吐温-20) 洗涤缓冲液, 室温静置3 min后弃去酶标板中的液体并在吸水纸上轻轻拍干, 重复5次。

以每孔200 μL的量将3% BSA的PBST封闭液加至酶标板中, 37℃恒温孵育1h, 清洗后, 将得到的待测样品系列溶液各取100 μL加至ELISA包被板中, 每个稀释度的待测样品重复3个孔, 以100 μL的稀释液作为空白对照, 37℃恒温孵育60 min。

再次清洗后, 按说明书选择抗体稀释液按指定比例稀释酶标抗体 (1:

2000), 每孔加入100 μL, 用封板膜封板, 37℃孵育60 min, 再次清洗后, 每孔加入200 μL现用现配的显色工作液, 37℃恒温静置20 min后立即加入50 μL终止液, 振荡器振荡1 min, 结束显色反应, 30 min内, 使用酶标仪测定光密度值, 检测波长设定为OD450, 参比波长设定为OD630, 计算差值 (Y=OD450-OD630) 的平均值。

以Y值为纵坐标, 待测样品的浓度 (X) 为横坐标, 通过数据处理软件使用 $Y = \frac{K_{max} \cdot X}{K_d + X}$ 的非线性回归模型拟合数据, 得到最大结合响应OD值, 计算K_d。

3. 检测结果

光密度值测定结果见附件。亲和力和测定结果如下表和图:

样品名称	K _d (单位: mol/L)
SARS-CoV-2 S protein	1.49 × 10 ⁻⁴
RBD, His Tag	1.62 × 10 ⁻⁴

Data 1

Mean Abs

K_d = 14.86 nM

95%CI = 9.739-22.41

R² = 0.967

SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag Conc.(nM)

第一次测试结果的结合曲线

Data 2

Mean Abs

K_d = 16.20 nM

95%CI = 10.52-24.85

R² = 0.966

SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag Conc.(nM)

第二次测试结果的结合曲线

验证人(签字): 卢清扬

验证单位(盖章): 百斯医药科技(北京)有限公司

2025年6月18日

2025年6月18日

附件

表 1 第一次测试数据

样品浓度 (nM)	OD450			OD630			OD450-OD630		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
754.72	2.572	2.605	2.538	0.038	0.040	0.037	2.534	2.565	2.501
377.36	2.676	2.710	2.644	0.038	0.039	0.036	2.638	2.671	2.608
188.68	2.773	2.743	2.797	0.037	0.036	0.038	2.736	2.707	2.759
94.34	2.403	2.433	2.372	0.037	0.039	0.036	2.366	2.394	2.336
47.17	2.653	2.681	2.617	0.038	0.037	0.039	2.615	2.644	2.578
23.58	1.825	1.853	1.792	0.038	0.039	0.037	1.787	1.814	1.755
11.79	1.268	1.299	1.241	0.037	0.036	0.038	1.231	1.263	1.203
5.90	0.587	0.617	0.561	0.038	0.037	0.039	0.549	0.580	0.522
2.95	0.356	0.385	0.335	0.038	0.037	0.036	0.318	0.348	0.299
1.47	0.165	0.154	0.162	0.038	0.037	0.039	0.127	0.117	0.123
0.74	0.141	0.134	0.130	0.037	0.036	0.038	0.104	0.098	0.092

表 2 第二次测试数据

样品浓度 (nM)	OD450			OD630			OD450-OD630		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
754.72	2.558	2.589	2.527	0.038	0.040	0.037	2.520	2.549	2.490
377.36	2.818	2.850	2.784	0.037	0.038	0.036	2.781	2.814	2.746
188.68	2.960	2.993	2.927	0.038	0.037	0.039	2.922	2.956	2.888
94.34	2.712	2.741	2.684	0.036	0.038	0.035	2.676	2.703	2.649
47.17	2.642	2.671	2.613	0.038	0.037	0.039	2.604	2.634	2.574
23.58	1.790	1.822	1.758	0.037	0.038	0.036	1.753	1.784	1.722
11.79	1.227	1.259	1.195	0.038	0.037	0.039	1.189	1.222	1.156
5.90	0.632	0.661	0.603	0.037	0.036	0.038	0.595	0.625	0.565
2.95	0.316	0.345	0.287	0.038	0.037	0.039	0.278	0.308	0.248
1.47	0.156	0.148	0.157	0.037	0.038	0.036	0.119	0.110	0.121
0.74	0.066	0.063	0.059	0.038	0.037	0.039	0.028	0.026	0.020

(b) 酶联免疫吸附法 (ELISA) -SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag

验证报告

项目名称:《重组蛋白试剂》

验证单位:百斯医学诊断科技(北京)有限公司

验证方法	表面等离子共振法 (SPR)
检测样品	Human CD19 (20-291) Protein, His Tag (Cat. No. CD9-H52H2)

1、实验材料及仪器

主要试剂:

靶标: FMC63 MAb(Mouse IgG2a) (Acro Biosystems, 751 µg/mL)。

运行缓冲液: 含10 mM N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES), 150 mM氯化钠 (NaCl), 3 mM乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.005%吐温-20 (Tween-20), pH调节至7.4。

抗IgG (Fc) 捕获试剂盒, 2型 (货号: 29215281, Cytiva), 其中包括: 兔抗鼠IgG抗体 (1 mg/mL), 固定试剂 (10 mM醋酸钠, pH5.0), 再生试剂 (10 mM甘氨酸盐酸, pH1.7)。

氨基偶联试剂盒 (货号: BR100050, Cytiva); 115 mg N-羟基丁二酰肼 (NHS), 750 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和10.5 mL 1 M乙醇胺 (pH8.5)。每管EDC和NHS分别加入10 mL去离子水, 分装保存于-18℃至更低温度, 保质期两个月。

活化试剂: 400 mM EDC和100 mM NHS。

再生试剂: 10 mM甘氨酸盐酸, pH1.7。

主要仪器及耗材: SPR生物分子互作分析仪 (Biacore T200), CM5 芯片 (BR100530), Zeba 离心式脱盐柱 (Thermo Fisher, Pierce-89890), 微量分光光度计 (SPECTROstar[®], BMG LABTECH)。

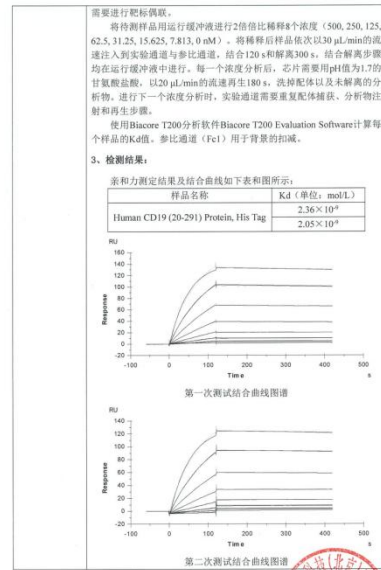
2、试验步骤

将兔抗鼠IgG抗体用固定试剂 (10 mM醋酸钠, pH 5.0) 稀释到30 µg/mL, 20 µL兔抗鼠IgG抗体加入到648 µL固定试剂中用于构建靶标捕获表面。然后用400 mM EDC和100 mM NHS以10 µL/min的流速对CM5芯片表面进行420 s的活化。将30 µg/mL的兔抗鼠IgG抗体以10 µL/min的流速注入到实验通道 (Fc2) 约420 s, 固定量为9000至14000 RU。最后, 芯片用1 M乙醇胺以10 µL/min进行420 s封闭。参比通道 (Fc1) 与试验通道 (Fc2) 进行相同的操作。

使用脱盐柱及运行试剂将待测重组蛋白试剂进行脱盐处理, 处理后的样品用SPECTROstar[®]进行浓度测定。

蛋白名称	样品原液浓度 (mg/mL)	样品原始溶剂	样品脱盐后浓度 (mg/mL)
Human CD19 (20-291) Protein, His Tag	0.629	1*PBS, pH7.3 with 0.01% Tween80, 11% Trisulfox	0.6124

将靶标用运行缓冲液稀释至16 µg/mL并以10 µL/min的流速注入到抗IgG (Fc) 捕获芯片实验通道 (Fc2) 约500 RU, 参比通道 (Fc1) 不



验证人(签字): 卢清扬

2025年6月18日

验证单位(盖章):

2025年6月18日

(c) 表面等离子共振法 (SPR) -Human CD19 (20-291) Protein, His Tag

验证报告

项目名称:《重组蛋白试剂》

验证单位:百斯医学诊断科技(北京)有限公司

验证方法	表面等离子共振法 (SPR)
检测样品	SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag (Cat. No. SPD-CS2H3)

1、实验材料及仪器

主要试剂:

靶标: Human ACE2, Fc Tag (Acro Biosystems, AC2-H5257)。

运行缓冲液: 含10 mM N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES), 150 mM氯化钠 (NaCl), 3 mM乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.005%吐温-20 (Tween-20), pH调节至7.4。

活化试剂: 400 mM EDC和100 mM NHS。

再生试剂: 10 mM甘氨酸盐酸, pH1.5。

主要仪器及耗材: SPR生物分子互作分析仪 (Biacore 8K), Protein A捕获芯片 (Cytiva, 29127556), Zeba 离心式脱盐柱 (Thermo Fisher, Pierce-89890), 微量分光光度计 (SPECTROstar[®], BMG LABTECH)。

2、试验步骤

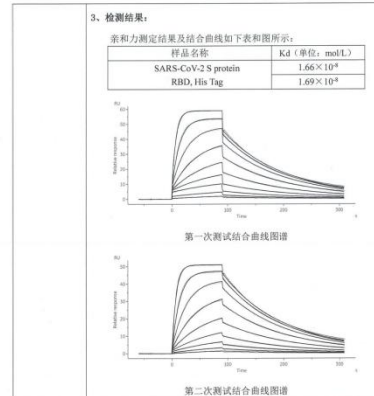
使用运行缓冲液以恒定速率进行系统预冲洗至基线稳定后, 用活化试剂活化芯片表面, 将靶标用运行缓冲液稀释至5 µg/mL并以10 µL/min的流速注入到Protein A捕获芯片实验通道 (Fc2) 约200 RU, 参比通道 (Fc1) 不需要进行靶标的偶联。

使用脱盐柱及运行试剂将待测重组蛋白试剂进行脱盐处理, 处理后的样品用SPECTROstar[®]进行浓度测定。

蛋白名称	样品原液浓度 (mg/mL)	样品原始溶剂	样品脱盐后浓度 (mg/mL)
SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag	0.6	1*HEPES with 0.005% Tween-20, pH7.4	0.52

将待测样品用运行缓冲液进行2倍倍比稀释10个浓度 (250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953, 0.977, 0 mM)。将稀释后的待测样品依次以30 µL/min的流速注入到实验通道与参比通道, 结合90 s和解离210 s, 结合解离步骤均在运行缓冲液中进行, 每一个浓度分析后, 芯片需要用pH值为1.5的甘氨酸盐酸, 以20 µL/min的流速再生30 s, 洗掉配体以及未解离的分析物, 进行下一个浓度分析时, 实验通道需要重复配体捕获、分析物注射和再生步骤。

使用Biacore 8K分析软件Biacore Insight Evaluation Software计算每个样品的Kd值。参比通道 (Fc1) 用于背景的扣除。



验证人(签字): 卢清扬

2025年6月18日

验证单位(盖章):

2025年6月18日

(d) 表面等离子共振法 (SPR) -SARS-CoV-2 S protein RBD, His Tag

2、经济与社会效益

本标准采用当前行业内最为成熟和主流的两种蛋白亲和力检测方法——酶联免疫吸附法（ELISA）和表面等离子共振法（SPR），通过建立科学、规范、可操作的亲和力测定技术体系，填补了国内在重组蛋白试剂亲和力评价方面的标准空白，预期将在经济和社会层面带来显著效益。ELISA具备成本低、通量高、操作简便等优势，适用于常规质量监控，而SPR则具备实时、无标记、高灵敏度的特点，适合高精度亲和力分析，两者互为补充，满足不同检测需求，将有效提升检测效率、降低实验成本，促进企业研发和生产流程标准化，尤其在国产重组蛋白加快替代进口的大背景下，为企业提升产品一致性与市场竞争力提供重要技术支撑。重组蛋白作为生命科学研究、药物开发和诊断应用中的关键试剂，其质量稳定性对科研数据的可重复性和临床应用的可靠性至关重要。本标准的实施将提高亲和力测定的规范性和数据可比性，增强科研结果的可信度，推动科研成果转化效率的提升；同时也为监管机构和采购方提供科学的质量评估依据，有助于构建统一、公正、可追溯的质量保障体系，促进我国生物试剂行业健康有序发展，提升我国在全球生物技术领域的标准话语权和国际影响力。

（四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

目前，国际上尚无专门针对“重组蛋白试剂亲和力测定方法”的ISO或IEC正式发布的国际标准，但在欧美国家，重组蛋白试剂广泛应用于生命科学、药物研发及诊断等领域，其亲和力检测多采用企业内部标准或行业指南，如美国PeproTech、赛默飞、R&D Systems、罗氏等公司均制定了自有的蛋白亲和力测定方案。常用检测技术包括酶联免疫吸附试验（ELISA）、表面等离子共振技术（SPR）、生物层干涉技术（BLI）和等温滴定量热法（ITC），其中ELISA因成本低、操作简便，在国际国内均为最常用的方法之一；而SPR和BLI等无标记实时检测技术由于其更高的灵敏度和数据精确度，正逐渐成为主流手段。

国外检测样品方面，例如Biacore（Cytiva）开发的SPR平台常用于检测蛋白—配体之间的结合亲和力，其结合RBD-ACE2的亲和力测定结果（如 $K_d \approx 0.2 \text{ nM}$ ）在国际文献中广泛引用。国产英柏Inter-Bio公司开发的SPR仪器，在相同测试项目中（RBD与ACE2结合），所获得的亲和力数据与Biacore系统结果高度一致，说明国产仪器在数据准确性、稳定性及重现性方面已达到国际先进水平。

此外，美国国家标准与技术研究院（NIST）等机构已将SPR用于蛋白活性浓度定量和标准物质互换性评价，中国药典2020年版也首次收录SPR方法，进一步促进了该技术在标准化检测中的应用。

本标准参考了上述国际和国内先进技术方案，综合吸收ELISA与SPR两种方法的优势，明确关键操作步骤与数据分析方式，在保持方法科学性、可操作性和通用性的基础上，提升了检测结果的准确性与重复性，体现了与国际主流技术路线的接轨。

（五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

本文件没有采用国际标准，本文件在制定过程中未查到同类国际标准。

（六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系

本文件与相关法律、法规、规章及相关标准协调一致，没有冲突。

（七）重大分歧意见的处理经过和依据

无。

（八）涉及专利的有关说明

无。

（九）实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议发布即实施。

（十）其他应予说明的事项

无。

《重组蛋白试剂 亲和力测定方法》标准起草组

2025 年 06 月