



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 重组蛋白试剂 亲和力测定方法

Recombinant protein reagents—Determination method of affinity

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(2025 年 XX 月 XX 日)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 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。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

# 重组蛋白试剂 亲和力测定方法

## 1 范围

本文件规定了重组蛋白试剂亲和力测定的通用方法。

本文件适用于在科学研究、生产和应用过程中对重组蛋白亲和力的测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**重组蛋白试剂** recombinant protein reagents

通过重组DNA等技术在宿主表达系统（如大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞）中表达的蛋白质经纯化后制备的试剂，广泛用于科研、诊断或工业用途。

### 3.2

**亲和力** affinity

在特定条件下，重组蛋白与其靶标之间单一结合位点的相互作用强度，通常以平衡解离常数（ $K_d$ ）表示，单位为摩尔每升（mol/L）。

### 3.3

**靶标** target

在特定条件下，能被重组蛋白特异性识别并结合的分子、分子结构或生物实体。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ELISA：酶联免疫吸附测定（Enzyme linked immunosorbent assay）

SPR：表面等离子体共振（Surface plasmon resonance）

PBS：磷酸盐缓冲溶液（Phosphate buffered saline）

BSA：牛血清白蛋白（Bovine serum albumin）

OD：光密度值（Optical Density）

## 5 酶联免疫吸附法（ELISA）（第一法）

### 5.1 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。

### 5.2 试剂与材料

#### 5.2.1 靶标

根据应用需求选择待测样品的靶标，需经过理化和生物活性分析验证，确保其纯度及结合活性。

#### 5.2.2 包被液

根据待包被靶标特性选择适宜的包被液，一般采用pH 9.6的0.05 mol/L碳酸盐缓冲液。

#### 5.2.3 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，可加入少量蛋白（如1% BSA）和少量表面活性剂（如0.05%的吐温-20）以保护待测样品中目标物的活性并减少背景干扰。

#### 5.2.4 洗涤缓冲液

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。

#### 5.2.5 封闭液

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。

#### 5.2.6 显色工作液

根据不同的显色系统以及不同指标（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。

#### 5.2.7 终止液

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）。

#### 5.2.8 酶标抗体

应选择与所检测样品种属来源相匹配的酶标记抗体。

### 5.3 仪器与设备

5.3.1 天平：感量为 0.01 g、0.001 g 和 0.0001 g。

5.3.2 pH 计：精度为 0.01。

5.3.3 恒温孵育器：37°C±1°C。

5.3.4 酶标板：选择高结合力的 ELISA 板（96 孔或其他规格），根据实验需要进行涂层。

5.3.5 酶标仪：有化学发光或自发光模块。

5.3.6 各种规格的离心管。

5.3.7 各种规格的微量移液器。

5.3.8 数据处理软件（如 GraphPad Prism）。

## 5.4 试验步骤

### 5.4.1 靶标包被

#### 5.4.1.1 包被固定靶标

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

#### 5.4.1.2 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 $200\text{ }\mu\text{L}$ 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。

#### 5.4.1.3 封闭

加入足量的封闭液至酶标板中， $37^{\circ}\text{C}$ 恒温器孵育1.0~1.5 h。

#### 5.4.1.4 清洗

重复步骤5.4.1.2。

### 5.4.2 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 $100\text{ }\mu\text{L}$ 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 $100\text{ }\mu\text{L}$ 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，酶标抗体孵育，显色，用酶标仪检测OD。

以得到的OD值为纵坐标，对应的样品浓度为横坐标，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。

### 5.4.3 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，记录其中重组蛋白的摩尔浓度，一般需要稀释8~10个浓度备用。

### 5.4.4 亲和力测定

#### 5.4.4.1 加样

将梯度稀释的待测样本各取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 加至5.4.1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 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的稀释液作为空白对照。 $37^{\circ}\text{C}$ 恒温器中孵育30~60 min。

#### 5.4.4.2 清洗

重复步骤5.4.1.2。

#### 5.4.4.3 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。

#### 5.4.4.4 清洗

重复步骤5.4.1.2。

#### 5.4.4.5 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。

#### 5.4.4.6 光密度值测定

反应终止30 min内,使用酶标仪测定OD值。

注: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,用检测波长的OD值减去参比波长的OD值得到实际的光密度值。

### 5.4.5 分析结果表述

#### 5.4.5.1 绘制结合曲线

以5.4.4.6得到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:

$Y$ ——OD值;

$B_{max}$ ——最大结合响应的OD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。

#### 5.4.5.2 结果表达及要求

通过数据分析软件计算得到最优的  $Kd$  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。

### 5.5 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%。

## 6 表面等离子共振法 (SPR) (第二法)

### 6.1 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。

## 6.2 试剂与材料

### 6.2.1 靶标

根据应用需求选择待测样品的靶标，需经过理化和生物活性分析验证，确保其纯度及结合活性。

### 6.2.2 偶联缓冲液

根据所选偶联方式，采购合适的偶联试剂盒或配置等效的偶联缓冲液。

### 6.2.3 运行缓冲液

根据待测样品特性或仪器说明书推荐选择HBS-EP运行缓冲液或其它等效缓冲溶液。

### 6.2.4 活化试剂

按仪器或试剂说明书推荐浓度配制。

### 6.2.5 封闭试剂

依照系统推荐选择配置乙醇胺溶液或其它等效溶液。

### 6.2.6 去离子水

符合GB/T 6682一级水标准。

## 6.3 仪器与设备

6.3.1 天平：感量为 0.01 g、0.001 g 和 0.0001 g。

6.3.2 pH 计：精度为 0.01。

6.3.3 SPR 生物分子互作分析仪

6.3.4 隔膜真空泵。

6.3.5 溶剂过滤器。

6.3.6 超纯水系统。

6.3.7 传感芯片：根据需要进行选择芯片，必要时可构建一个靶标捕获表面以实现灵活的靶标固定策略。

6.3.8 各种规格的微量移液器。

## 6.4 试验步骤

### 6.4.1 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。

#### 6.4.1.1 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速率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；

#### 6.4.1.2 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。

#### 6.4.1.3 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。

##### 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 $R_L$ 。

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

式中：

$R_L$ ——配体偶联水平；

$R_{max}$ ——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。

##### 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。

#### 6.4.1.4 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。

### 6.4.2 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，记录其中重组蛋白的摩尔浓度。须经0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤并脱气。

若待检样品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。

### 6.4.3 检测条件确认

#### 6.4.3.1 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。

#### 6.4.3.2 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、去垢剂等进行芯片再生，根据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。

### 6.4.4 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、解离时间以及再生液、再生液进样时间、流速、稳定时间。输入样品名称和梯度浓度信息。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。

### 6.4.5 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；结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；结合曲线卡方值应小，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。

### 6.5 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%。

## 7 报告内容

测试报告应至少包含以下信息：

- a) 靶标信息；
- b) 测试用设备名称及型号，试剂及其浓度等；
- c) 试验内容、操作条件等具体试验步骤；
- d) 测量分析结果，包括Kd值、结合曲线等。