

抗体亲和力测定

抗体与抗原表位或抗原决定簇之间的结合力称为抗体亲和力，其本质是一种非共价作用力，包括对氨基酸之间的吸引力，氢键，疏水性作用力等。抗体亲和力体现了一个抗体分子和一个半抗原分子或抗原分子的一个决定簇起反应的能力。

抗体亲和力的大小可以用亲和力常数 K_D （单位为升/质量摩尔浓度）表示，其计算公式为

$$K_D = [Ab \cdot H] / ([Ab][H])$$

其中[]表示摩尔浓度，Ab 表示抗体，H 表示半抗原，Ab—H 表示抗体与半抗原的结合物

亲和力常数 K_D 越高，则抗体结合半抗原的能力越强。抗体亲和力的强弱取决于抗体对位（Paratope）与所用抗原表位（epitope）之间的配合程度，包括接触面积的大小、吻合的密切程度、以及带点基团与疏水基团的分布等。

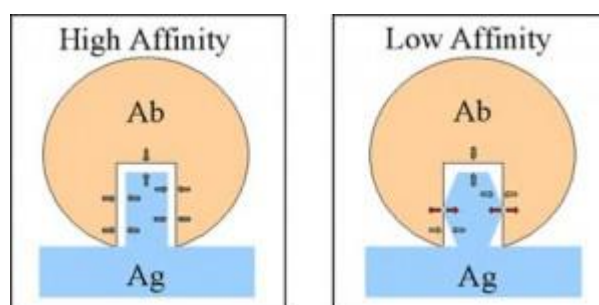
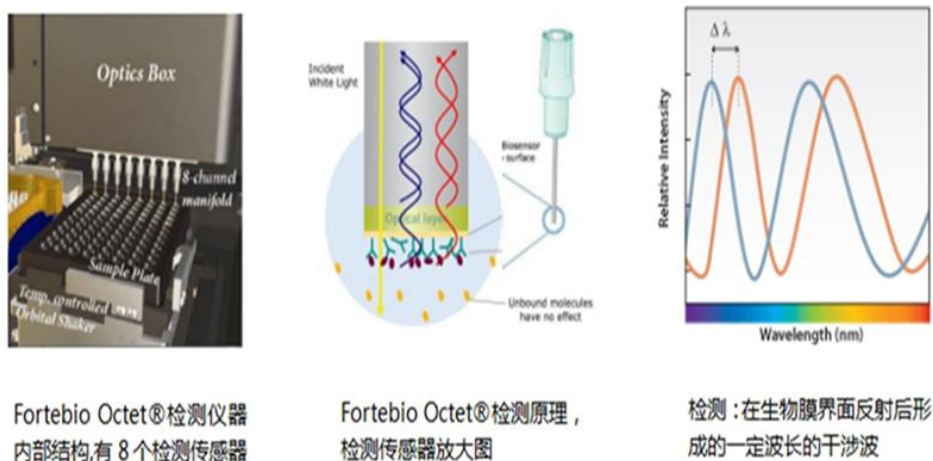


图 1：亲和力高低影响因素图解

抗体亲和力测定方法

生物膜干涉技术（BLI）

根据生物膜干涉技术（BLI），可利用 ForteBio Octet[®] 检测仪器对抗体亲和力进行测定的原理为：生物传感器底端由固定的相互作用分子组成的生物膜层覆盖，当具有一定带宽的可见光垂直入射生物膜层时，光在生物膜层的两个界面反射后形成被光谱仪检测到的一定波长的干涉波。固定分子与溶液中分子发生相互作用时，生物层厚度增加，干涉光谱曲线向波长增加的方向移动，相位移动由工作站探测并分析，可定量得出传感器表面分子数量变化及相关浓度与动力学数据。



Fortebio Octet®检测仪器内部结构,有8个检测传感器

Fortebio Octet®检测原理,检测传感器放大图

检测:在生物膜界面反射后形成的一定波长的干涉波

图 2 : Fortebio Octet®实验原理

德泰生物提供 [Fortebio Octet®抗体亲和力测定服务](#)，结果准确可靠，欢迎咨询！

固相放射免疫法 (SP-RIA)

固相放射免疫法可以比较准确的测出抗体亲和力常数，其操作步骤为：用抗原（如病毒颗粒或蛋白质）包被微板，加入系列稀释的定量单克隆抗体。温育至反应平衡后，洗去未结合的单克隆抗体加放射性同位素标记的抗小鼠 Ig 第二抗体，温育后洗涤，将小孔割下计数结合的放射性强度。只要保持包被抗原量恒定，即可按公式

$([Ab]_a/[Ab]_r - [Ab]_b)/([Ab]_a) = -nK$ 。其中 $[Ab]_a$ 为结合抗体浓度， $[Ab]_r$ 为总抗体浓度， n 为抗体结合价， K 为亲和力常数。

平衡透析法

利用平衡透析法进行抗体亲和力的测定需要两个前提：配体（半抗原分子）要小分子且可以穿过半透膜；配体分子可以以某种方式标记（例如同位素 3H ）

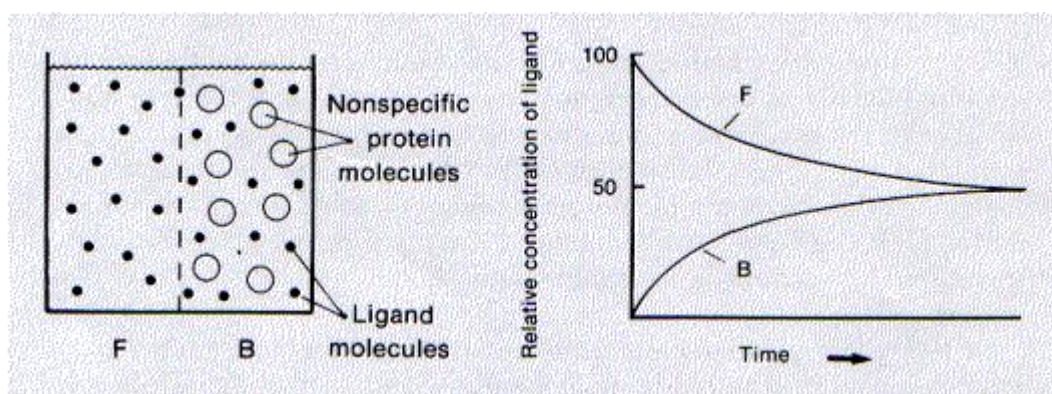


图 3 : 平衡透析法测抗体亲和力图解

将放射性标记的配体溶于缓冲液置于中间由半透膜隔开的透析室的一侧（F室），将非特异性抗体置于透析室的另外一侧（B室）。随着时间的推移，配体会透过半透膜从F室到达B室，配体与非特异性抗体不发生结合，则各室的配体浓度随时间变化如右图所示。

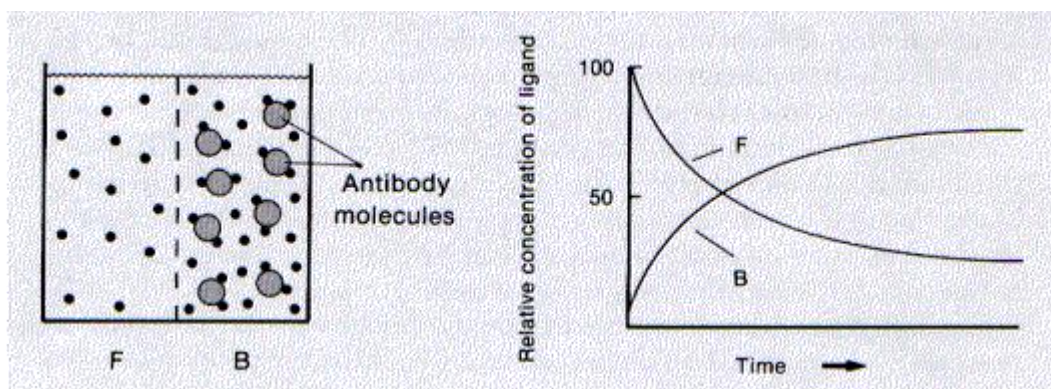


图 4：平衡透析法测抗体亲和力图解

将放射性标记的配体溶于缓冲液置于中间由半透膜隔开的透析室的一侧（F室），将非特异性抗体置于透析室的另外一侧（B室）。随着时间的推移，配体会透过半透膜从F室到达B室，在B室中配体与特异性抗体结合，各室的配体浓度随时间变化如右图所示。

当抗原-抗体结合反应 $Ab + H \rightleftharpoons Ab \cdot H$ 达到平衡时，利用方程式 $1/[b] = 1/k \times 1/[Ab] \times 1/[H] + 1/[Ab]$ 即可计算得到亲和力常数 K（其中 [b] 为结合配体的质量摩尔浓度，[H] 为游离配体的质量摩尔浓度，[Ab] 为抗体结合位点浓度，由抗体质量摩尔浓度 × 抗体结合价得到）。

对于无法穿过半透膜的大分子抗原，可以利用能穿过半透膜的 Fab 抗体片段来进行抗体亲和力的测定实验。

结合抗原沉淀法

将单价抗原与相应抗体同在溶液中温育进行抗原-抗体反应。在反应达到平衡后，用 50% 饱和硫酸或 15% 聚乙二醇进行沉淀，将结合与游离抗原分离，分别测定浓度，继而按照上述公式计算出亲和力常数 K。

放射免疫法（RIA）

将系列稀释的定量单克隆抗体与痕量的放射标记抗原分子在溶液中一同温育（单克隆抗体必须大大过量），平衡后测定结合曲线。根据米-曼氏动力学原理，50% 最大结合处单克隆抗体结合价浓度的倒数即为亲和常数 K。

酶联免疫吸附实验（ELISA 法）

ELISA 的灵敏度很高，利用 ELISA 可以测出 10^{-8} M 数量级的亲和力常数，可以满足一般抗体亲和力的测定需要。且 ELISA 无需对抗原或抗体进行标记，操作简便易行，是目前常用的亲和力测定方法。其操作方法为：将抗体与定量的抗原一同在溶液中温育，进行抗原-抗体反应。当反应达到平衡后，将溶液移至包被有相同固相抗原的聚苯乙烯微板中，用常规间接法 ELISA 测定溶液中剩余的游离抗体量。利用测出的 OD 值直接计算出亲和常数。当所用抗原 \geq 所用抗体量 10 倍时，计算中可对抗体量忽略不计，这时可以用公式 $A_0/(A_0-A)=1+Kd/a$ 计算出亲和力。其中 A_0 为无抗原存在时抗体的 OD 值，A 为加入了质量摩尔浓度为 a 的抗原后的 OD 值，Kd 为抗体亲和力常数的倒数。

[竞争 ELISA 法测定抗体亲和力](#)

表面等离子共振法 (SPR)

SPR 测定抗体亲和力是基于表面等离子共振技术建立的一种亲和力测定技术。只需按照仪器说明对进行操作，在加好样品后，便可以得到亲和力常数。相较于竞争 ELISA 法，SPR 法测定抗体亲和力有诸多优势，如可以实时监测反应的动态过程，实验结果重现性好、仪器记录的数据不能随意更改，减少了主观因素的影响、实验的重复性更好等。

[表面等离子共振法测定抗体亲和力](#)

抗体亲和力测定的意义

在重组抗体被生产出来之后，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。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和力必须高于一定的阈值，才能保证测定的灵敏度和可靠性。用抗体偶联于固相进行亲和纯化抗原时，为避免强烈的洗脱条件造成抗原变性，需中等亲和力的抗体，以便能用较温和的条件进行洗脱。由于一般抗血清抗体是亲和力相差很大的多克隆抗体混合物，用于上述不同目的时，其中相应亲和力的组分将能发挥预期的作用。而用单克隆抗体取代多克隆抗体血清时，就必须对其亲和力进行测定，才能选出合适的备用者。另外，由于某些单克隆抗体对某一抗原的特异性亲和力随环境条件（如温度、PH、离子成分与强度等）的改变（甚至很微小的变化），会有很大的差别，故为某一目的而选择单克隆抗体时，应采取与实际应用时条件相仿的方法测定其亲和力。

相关服务

[重组抗体制备服务](#)

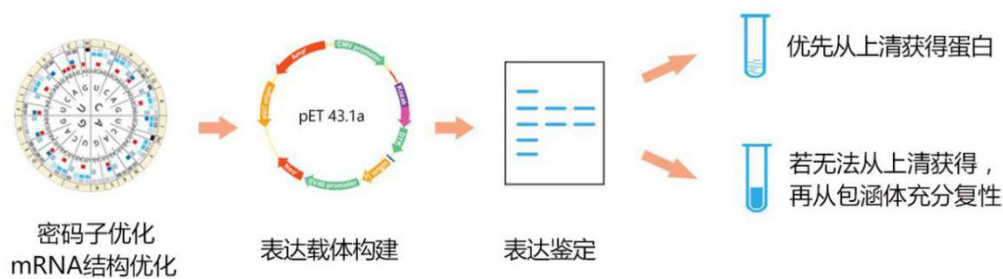
金建平,《生物工程学报》,1987,3 (3):110-113

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

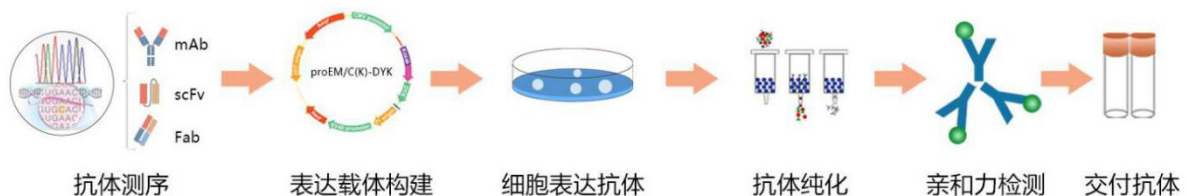
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

