

竞争 ELISA 法测定抗体亲和力

抗体亲和力测定的方法很多，竞争 ELISA 法是一种简便易行的亲和力测定方法，本文主要介绍竞争 ELISA 法测定抗体亲和力的原理、操作步骤以及注意事项。如果了解更多抗体亲和力的测定方法，查看[抗体亲和力测定方法介绍](#)。

原理

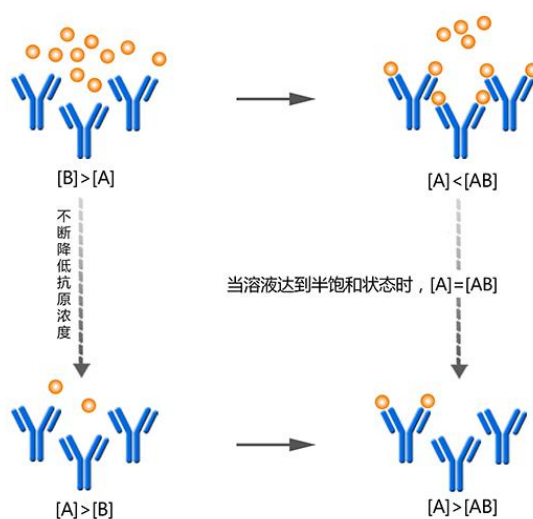
抗原抗体的结合是一个可逆的反应： $A+B \rightleftharpoons AB$ （A 表示抗体，B 表示抗原，AB 表示抗原抗体结合物）。

当反应达到平衡时，解离常数 $K_d = [A][B]/[AB]$ ，[AB]表示反应平衡时抗原抗体结合物的浓度，[A]表示反应平衡时游离抗体的浓度，[B]表示反应平衡时游离抗原的浓度。

- ① 当反应体系中抗体很少，而抗原过量时，反应平衡后 $[AB] > [A]$ ；
- ② 当反应体系中抗原量很少，而抗体过量时，反应达到平衡后 $[AB] < [A]$ ；
- ③ 当反应体系中抗原抗体的量刚好合适时，反应达到平衡后处于半饱和状态，此时 $[AB] = [A]$ ，则

$$K_d = [A][B]/[AB] = [B]。$$

在半饱和状态下，如果抗体的浓度很低，反应消耗的抗原很少，则反应后游离的抗原浓度[B]约等于总的抗体浓度[B]_总，此时 $K_d = [B] \approx [B]_{总}$ 。因此，只要在抗体浓度较低的情况下，找到可以在反应平衡后达到半饱和状态的抗原浓度[B]_总，便可以得到解离常数。



操作步骤

竞争 ELISA 法测出的 K_d 值的准确性，依赖于一个大前提：将反应混合物加入包被抗原板后，包被抗原与游离抗体的结合不会破坏抗原抗体反应体系的平衡状态（如果抗原板中抗原浓度过高，结合的游离抗体超过了一定的量，抗原抗体反应体系的平衡会被破坏，此时测得的 OD 值偏大，最终导致结果偏大）。通常允许抗原板结合的最大游离的抗体量为 10%。在进行 ELISA 法检测抗体亲和力实验时，需要确保抗原不会破坏反应体系的平衡。通常可以用以下操作步骤来确定该包被抗原的浓度是否过高：

包被抗原板，然后用 3% 的 MPBS 室温封闭 2h，PBS 洗涤；

准备梯度稀释的抗体溶液（稀释前的抗体浓度与竞争 ELISA 实验中的抗体浓度相同），每个稀释液取 100μL；

加入第一块抗原板中，一式三份（见下图 a），孵育 1 个小时；

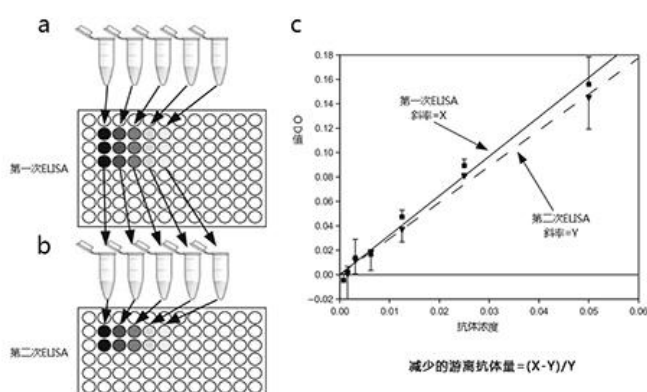
使用微量移液器小心移出第一块板中抗体稀释液，将三份相同浓度的稀释液放入一个管中，每个稀释液取 100μL 加入第二块抗原板中，一式两份（见下图 b），孵育 1 个小时，PBS 洗涤；

加入酶标二抗，孵育 1 个小时，PBS 洗涤；

每个孔中加 100μL 底物，显色 30min；

终止显色反应，测定各个孔 OD 值；

将得到 OD 值与对应的抗体浓度结合，分别就第一块抗原板与第二块抗原板做两条拟合曲线（见下图 c）；



- 对比两条曲线，如果之间的差值小于 10%，则说明该包被抗原的浓度符合要求，如果大于 10%，则说明该包被抗原浓度过高，需对包被抗原进行稀释后重新测定。

竞争 ELISA 测抗体亲和力实验流程

1. 包被抗原板，然后用 3% 的 MPBS 室温封闭 2h，PBS 洗涤。
2. 在一排试管中，利用有限稀释法建立从 0.1 nmo/L~1 μ mol/L 浓度梯度的抗原 PBS 溶液，加入抗体溶液(浓度 \leq 0.5 μ mol/L)使总体积为 100 μ l。
3. 室温孵育 30min 后，加 90 μ l 反应混合物到前述已包被抗原的微孔中，微孔中预先加入 30% 的 MPBS 30 μ l 后孵育，但时间不宜超过 10min (时间不宜过长，过长会导致混合物中反应平衡体系被破坏，最终实验数据不准确)。充分洗涤抗原板。
4. 加入酶标二抗，孵育 1h，PBS 洗涤。
5. 加入显色底物显色，显色 30min 后加入终止液停止反应，进行 OD 值读数。

抗原浓度较低时，反应平衡后[A]较大，被抗原板捕获的游离抗体多，信号强;当抗原浓度高时，反应平衡后[A]较小，被抗原板捕获的游离抗体少，信号弱;当抗原浓度高到一定程度时，将没有信号。在最强信号一半时的状态为半饱和状态，此时[A]=[AB]， $K_d=[B]\approx[B]_{总}$ 。将测得的 OD 值记录，结合梯度稀释的抗原浓度绘制拟合曲线，最终找到最强信号一半的点，对应的抗原浓度即解离常数 K_d 。

注意事项：

酶标抗体建议不要使用 HRP 偶联抗体，竞争 ELISA 法测抗体亲和力实验是在抗体浓度很低的条件下进行，利用 HRP 偶联抗体并不能很好的获得信号。为了获得更好的信号，建议使用 AP 偶联的鼠单克隆抗体。

德泰提供抗体亲和力检测服务，可以准确的测定抗体的亲和力。

相关阅读

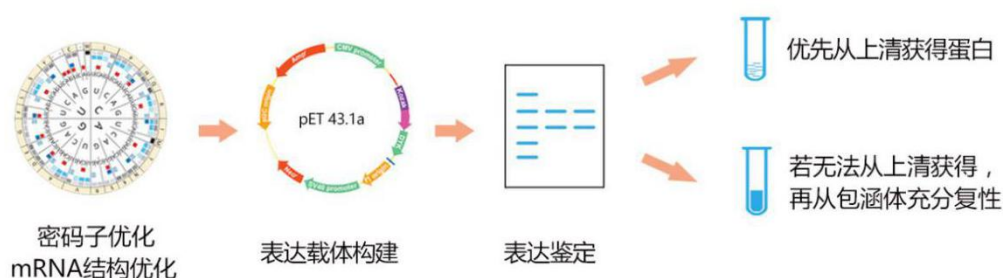
[表面等离子共振法 \(SPR\) 测定抗体亲和力](#)

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

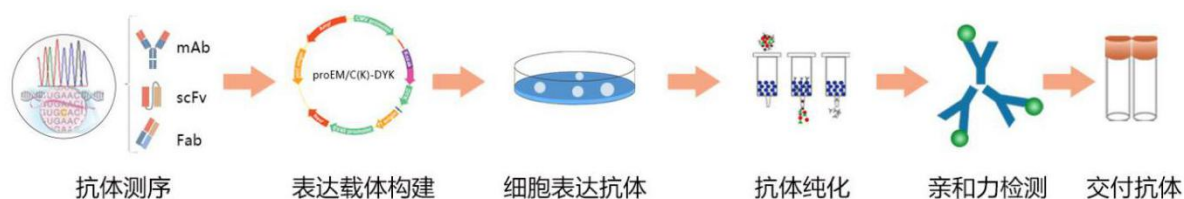
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



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

