

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。

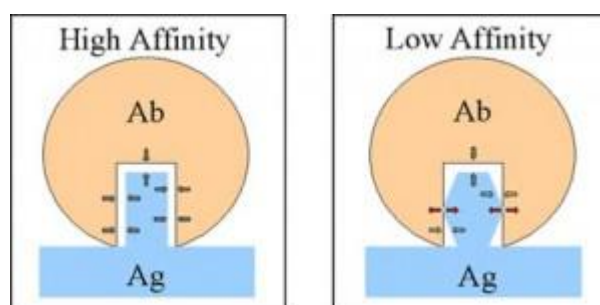


图 1：亲和力高低影响因素图解

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。

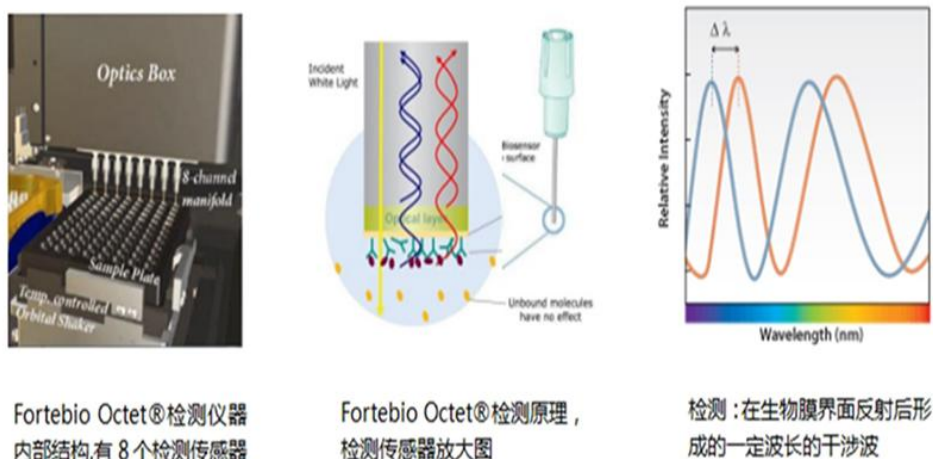


图 2 : Fortebio Octet®实验原理

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

$([Ab]_a/[Ab]_t - [Ab]_b)/([Ab]_a) = -nK$ 。其中 $[Ab]_a$ 为结合抗体浓度, $[Ab]_t$ 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)

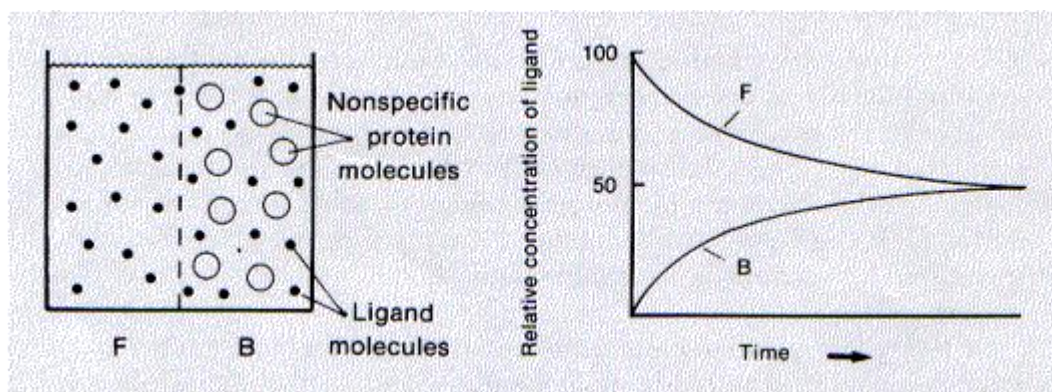


图 3 : 平衡透析法测抗体亲和力图解

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。

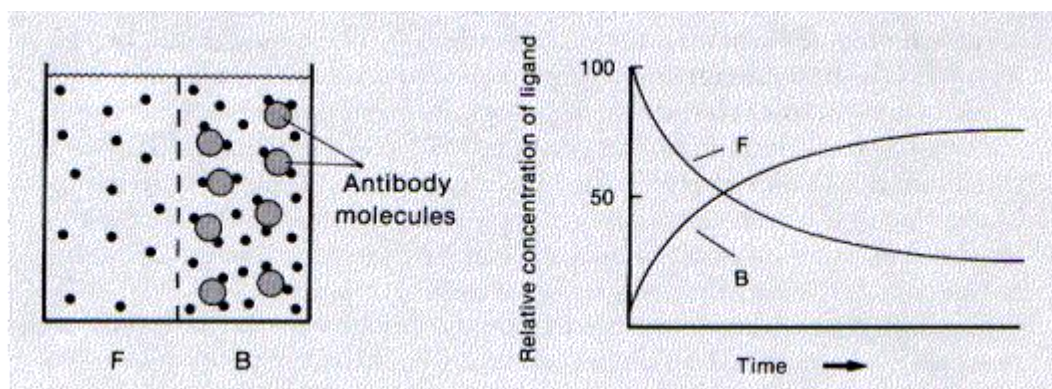


图 4：平衡透析法测抗体亲和力图解

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 $A_0/(A_0-A)=1+K_d/a$ 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， K_d 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

更多优质服务推荐

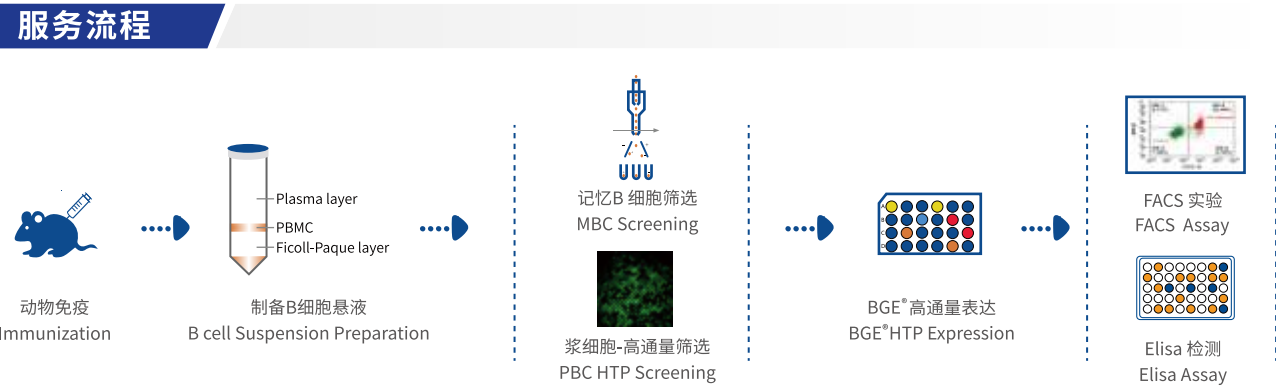
1

SingleB® mAb Discovery Service SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

平台优势	
 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫	 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失	 重轻链天然配对,亲和力更优
 高通量,周期短,单抗发现快至29天	 ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种	
 小鼠	 兔
 羊驼	 人源化小鼠
 猪	 犬
 绵羊	 人





Recombinant Antibody Expression Service

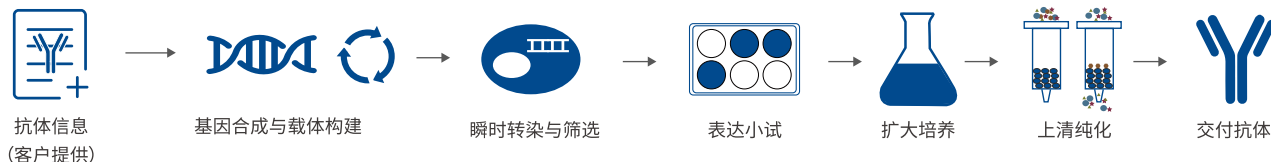
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、 $(\text{Fab}')_2$ 、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

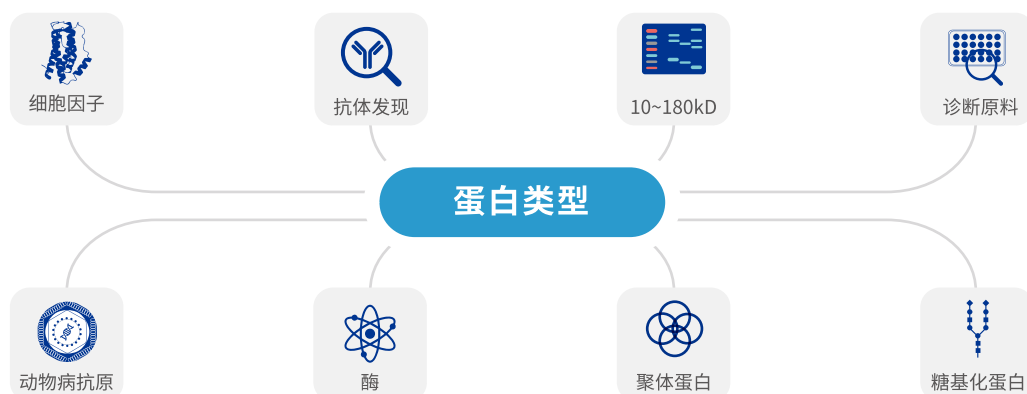


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

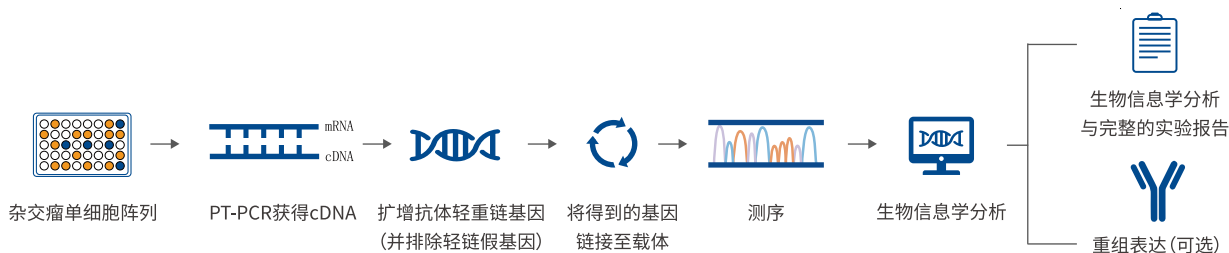
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



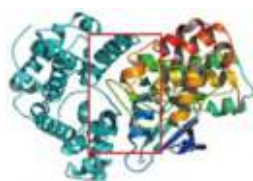
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



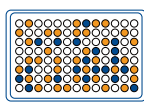
基因合成&质粒抽提



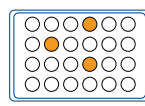
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L