

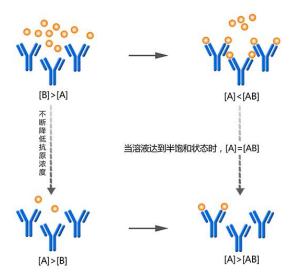
竞争 ELISA 法测定抗体亲和力

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。如果想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: $A+B \hookrightarrow AB$ (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]。



操作步骤

Tel: (025) 5889- 4959 www.DetaiBio.com <u>Sales@DetaiBio.com</u>



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 100mL;加入第一块抗原板中,一式三份(见下图 a),孵育 1 个小时;

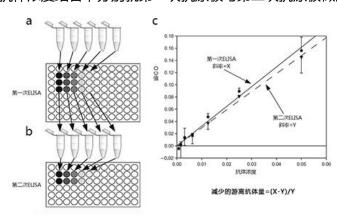
使用微量移液器小心移出第一块板中抗体稀释液,将三份相同浓度的稀释液放入一个管中,每个稀释液取 100mL 加入第二块抗原板中,一式两份(见下图 b),孵育 1 个小时,PBS 洗涤;

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。

Tel: (025) 5889- 4959 www.DetaiBio.com <u>Sales@DetaiBio.com</u>



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。
- 在一排试管中,利用有限稀释法建立从 0.1 nmo/L~1µmol/L 浓度梯度的抗原 PBS 溶液,加入抗体溶液(浓度≤0.5µmol/L) 使总体积为 100µl。
- 3. 室温孵育 30min 后,加 90μl 反应混合物到前述已包被抗原的微孔中,微孔中预先加人 30%的 MPBS 30μl 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

Tel: (025) 5889- 4959 www.DetaiBio.com <u>Sales@DetaiBio.com</u>

更多优质服务推荐



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

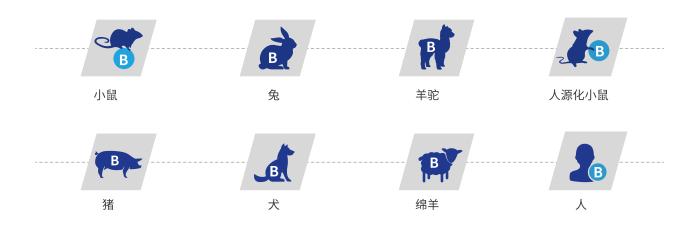


高通量,周期短,单抗发现快至29天

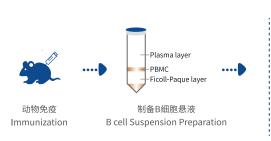


ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程











BGE®高通量表达 BGE®HTP Expression



FACS Assay



Elisa 检测 Elisa Assay



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、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长lgG、lgM。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





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。





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。

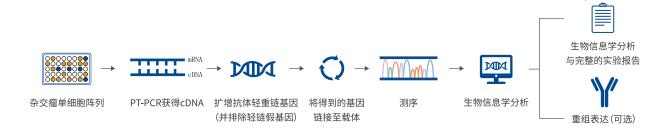
应用场景

- 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κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的lgM和lgG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

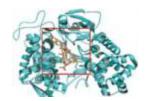


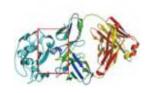


德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down,免疫共沉淀,酵母双杂交等相比,具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

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。



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



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



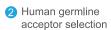
改造后的抗体人源化程度>90%



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

















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	

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