



以抗体竞争结合抗原测定单抗亲和力常数的研究

亲和力常数(Kd)是抗原/抗体结合反应的平衡常数,测定Kd的方法有很多种,如硫氰酸盐洗脱法[1]、尿素洗脱法[2]、间接ELISA法[3], [4]、生物传感器法[5]和竞争结合法[6]等,在这些方法中前面3种的检测结果不够精确,而生物传感器检测法需要购置昂贵的仪器,而Friguent等[6]首先建立的竞争结合法具有检测精确、简便易行的特点。本研究对Friguent的方法进行改良,用抗体竞争结合抗原,用双抗体夹心ELISA法检测抗原的结合率,推算反应平衡时各组分的浓度计算出亲和力常数值。发现检测结果的精确性和重现性有所提高。

本实验原理如下:

抗原抗体反应方程式: $Ag+Ab \rightleftharpoons AbAg$

反应初始浓度: $a_0 \quad i_0$

反应平衡各组分浓度: $a_0(1-B) \quad i_0-a_0B \quad a_0B$

其中 a_0 是抗原的初始浓度, i_0 是抗体的初始浓度, B 是抗原的结合率,以双抗体夹心法ELISA检测初始抗体和已结合抗原的抗体的A值 A_0 和 A_i , $B=(A_0-A_i)/A_0$, 此时:

$$Kd = a_0B / [a_0(1-B)(i_0-a_0B)]$$

推导出 $Kd(i_0-a_0B) = B/(1-B)$ (1)

在实验中固定抗原浓度 a_0 值,改变抗体浓度 i_0 值形成一系列反应系统,测出每个反应系统的 B 值,以 (i_0-a_0B) 为横坐标, $B/(1-B)$ 为纵坐标作图,斜率就是亲和力常数 Kd 。

1 材料和方法

1.1 实验材料

鱼明胶、山羊抗鼠IgG二抗酶结合物、过氧化脲、四甲基联苯胺、生物素(已活化)、亲和素购自SIGMA公司;辣根过氧化物酶、吐温-20上海东风试剂公司进口分装;酶联免疫反应96孔板购自丹麦Nunc公司;基因工程重组IL-8抗原(相对分子质量8000)、两株抗IL-8单抗(6E6-1、6E6-2)购自加拿大YES公司;其余试剂均为国产分析纯。

全自动洗板机、酶标仪为DYNEX产品;超纯水机的型号为Millipore-Q PLUS;电子分析天平为METTLER产品;微量进样器为ICHIRYO产品。

1.2 实验方法

1.2.1 以抗体竞争结合抗原测定亲和力常数实验方法

1.2.1.1 检测IL-8抗原的双抗体夹心法ELISA系统的制备 将抗IL-8单抗6E6-1溶解在0.05 mol/L 碳酸缓冲液(pH9.5)中,终浓度为1 μ g/ml,每孔100 μ l将溶液加到96孔板中4 $^{\circ}$ C包被过夜,以含1%BSA的PBS溶液对板进行封闭,将板干燥后在4 $^{\circ}$ C保存备用;抗IL-8单抗6E6-2的生物素化,以及亲和素与过氧化物酶的连接按参考文献[7]进行。

1.2.1.2 以6E6-1抗体竞争结合IL-8抗原测定亲和力常数 ①IL-8抗原溶液初始浓度为2 ng/ml (2.5×10^{-13} mol/L), 抗IL-8单抗6E6-1的初始浓度为500 ng/ml (36×10^{-13} mol/L), 向下倍比稀释(表1)和抗原混合建立8个反应系统, 在37 °C反应1 h; ②以每孔100 μ l的量将反应液以双孔加入到包被了6E6-1单抗的免疫反应板, 37 °C孵育1 h后洗板5次; ③加入100 μ l生物素化6E6-2抗体溶液37 °C反应半小时, 然后加入50 μ l亲和素/过氧化物酶连接物溶液37 °C反应半小时, 洗板5次, 加入底物显色15 min后加入终止液, 测定 D_{450} 值计算各个反应溶液的抗原结合率, 并推算亲和力常数。

表 1 在不同浓度抗体竞争下的抗原结合率(系列 1)

Tab.1 Binding proportion of Ag competed by Ab at different concentrations(series 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8
$a_0(10^{13}$ mol/L)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
$i_0(10^{13}$ mol/L)	36	18	9	4.5	2.25	1.12	0.56	0
D_{450}	0.142	0.338	0.505	0.757	1.042	1.280	1.389	1.578
B	0.910	0.812	0.680	0.523	0.342	0.195	0.123	0

a_0 : Original concentration of IL-8 antigen; i_0 : Original concentration of 6E6-1 McAb; B: Binding proportion of IL-8 antigen equal to $(A_0 - A_i) / A_0$, A_0 is absorption value measured on 450 nm for Ag when Ab concentration was 0, A_i is absorption value measured on 450 nm for Ag in different concentrations of Ab.

1.2.1.3 改变条件重复1.2.1.2实验测定亲和力常数 将1.2.1.2中的抗原初始浓度改成3.2 ng/ml (4×10^{-13} mol/L), 抗体的初始浓度从1000 ng/ml (72×10^{-13} mol/L)往下倍比稀释, 建立8个反应系统, 将生物素化抗体和亲和素酶结合物浓度调低一半, 按照1.2.1.2中的步骤②、③检测抗原结合率, 并推算亲和力常数。

1.2.2 以Friguent法测定亲和力常数的实验步骤

1.2.2.1 检测抗IL-8抗体原的间接法ELISA系统的制备 将IL-8抗原溶解在0.05 mol/L 碳酸缓冲液(pH9.5)中, 终浓度为1 μ g/ml, 以每孔100 μ l的量将溶液加到96孔板中4 °C包被过夜, 以含1%BSA的PBS溶液对板进行封闭, 将板干燥后在4°C保存备用;

1.2.2.2 以IL-8抗原竞争结合6E6-1抗体测定亲和力常数 反应系统中抗IL-8单抗6E6-1的初始浓度为20 ng/mL, IL-8抗原的初始浓度从1000 ng/ml (1250×10^{-13} mol/L)往下倍比稀释, 形成8个反应系统(表3), 在37 °C反应1 h; ②以每孔100 μ l将反应液以双孔加入到包被了IL-8抗原的免疫反应板, 37 °C孵育1 h后洗板5次; ③加入100 μ l山羊抗鼠二抗每结合物溶液37 °C反应1 h, 洗板5次, 加入底物显色15 min后加入终止液, 测定 D_{450} 值计算各个反应系统的抗原结合率推算亲和力常数。

1.2.2.3 改变条件重复1.2.2.2实验测定亲和力常数 将实验方法2中的抗体初始浓度改成40 ng/ml (2.5×10^{-13} mol/L), 抗原的初始浓度从3 200 ng/ml (400×10^{-12} mol/L)往下倍比稀释, 建立反应系统(表4), 将酶结合物浓度调低一半, 按照2.2.2.2中的步骤②、③检测抗原结合率, 并推算亲和力常数。

2 实验结果

2.1 以抗体竞争结合抗原测定亲和力常数实验结果

2.1.1 按照1.2.1.2反应系列测得的结果(表1) 其中 a_0 是IL-8抗原初始浓度, i_0 是6E6-1单抗初始浓度, 单位都是 10^{-13} mol/L。B是抗原结合率, $B = (A_0 - A_i) / A_0$, A_0 和 A_i 分别是抗体浓度为0和各浓度时的抗原酶联检测 D_{450} 值。对 $B / (1 - B)$ 作图求得斜率(亲和力常数)为 2.61×10^{-12} mol/L ($r = 0.9475$)。

2.1.2改变实验条件按照1.2.1.3形成反应系列测得的结果 对 $B/(1-B)$ 作图求得斜率(亲和力常数)为 2.39×10^{-12} mol/L($r=0.9347$)。实验结果与改变实验条件之前测定的数值十分接近。

2.2 以抗原竞争结合抗体测定亲和力常数实验结果

2.2.1 按照1.2.2.2反应系列测得的结果 其中 a_0 是6E6-1单抗初始浓度, i_0 是IL-8抗原初始浓度, 单位都是 10^{-13} mol/L。 B 是抗体结合率, $B=(A_0-A_i)/A_0$, A_0 和 A_i 分别是间接法ELISA检测初始抗体和已结合抗原的抗体的 D_{450} 值。

从实验结果显示需要抗原远远过量才能对抗体形成竞争抑制, 可以直接用抗原初始浓度 i_0 对 $B/(1-B)$ 作图求得斜率(亲和力常数)为 5.57×10^{-10} mol/L($r=0.9363$)。

2.2.2 改变条件按照1.2.2.3形成反应系列测得的结果 直接用抗原初始浓度 i_0 对 $B/(1-B)$ 作图求得斜率(亲和力常数), 得出 K_d 值为 1.41×10^{-10} mol/L($r=0.9285$)。实验结果比抗原/抗体浓度未提高时降低了近4倍。

3 讨论

以抗体结合抗原方法检测比抗原结合抗体方法测出的亲和力常数要高2个数量级, 原因分析如下: 抗体是Y型结构, 具有两个抗原结合位点, 当一个位点被抗原封闭后另一个位点仍然可以结合到固相的抗原上, 只有抗体的两个抗原结合位点都被封闭才能阻止抗体被间接法ELISA测出, 而抗体结合第二个抗原是比结合第一个抗原困难的, 这造成了需要大大超量的抗原才能通过间接法ELISA检测到一定的抗体结合率, 根据公式 $K_d = B/[i_0(1-B)]$ 测出的 K_d 值也因为抗原大大超量而远低于实际情况。

而本研究以抗体竞争结合抗原, 液相单抗和固相单抗竞争结合抗原的同一个位点, 通过双抗体夹心法ELISA测出的抗原结合率, 反映的是真实的抗原/抗体反应平衡情况, 计算出的抗体亲和力常数更加接近真实的情况。

以抗原竞争结合抗体的方法, 只有抗原初始浓度远大于抗体初始浓度是才能形成抗体的结合率, 在计算结果时只考虑抗原初始浓度和抗体结合率的关系: $K_d i_0 = B/(1-B)$ 。当抗体初始浓度变化时抗原初始浓度(i_0)必须随着变化, 才能够维持相同的抗体结合率, 这就导致了测出的 K_d 值随着条件的变化而变化。

而使用抗体结合抗原的方法, 反应系统中抗原初始浓度与抗体初始浓度相差不大, 计算结果时考虑的是游离抗体浓度($i_0 - a_0 B$)与抗原结合率的关系: $K_d(i_0 - a_0 B) = B/(1-B)$, 条件变化时抗原初始浓度、抗体初始浓度和抗原结合率形成联动关系, 在相同的抗原结合率下游离抗体浓度相同, 所以不同检测检测条件下测得的 K_d 结果具有良好的重现性。

随着抗体人源化技术的发展和基因工程抗体的出现, 越来越多的单克隆抗体被开发成药物应用于临床, 亲和力常数是单抗作为药物的重要质控指标。本研究对Friguent方法进行改良后, 保留了原方法需要设备简单、易于开展的优点, 而且结果的稳定性和重现性得到了提高, 是很适合在单克隆抗体药品生产企业使用的检测方法。

参考文献:

[1]王刚, 王琰, 化冰, 等. 链替代技术提高抗角蛋白人Fab的亲和力[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(2): 160-3.

[2]李革, 熊杰, 刘志峰. 巨细胞病毒特异性IgG抗体亲和力测定及其临床意义[J]. 中华实用儿科杂志, 2001, 16(3): 162-4.

[3]傅思武, 周殿元, 赖卓胜, 等. 抗艰难梭菌毒素A单抗的制备及特性分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(3): 376-8.

[4]王刚焱, 鱼涛, 马兆扬, 等. 甲基对硫磷单克隆抗体的研制及鉴定[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19(4): 265-7.

[5]朱勇, 金伯泉, 刘雪松. 用生物传感器测定抗重组 $\alpha 2a$ -干扰素单克隆抗体的亲和力及抗原识别表位[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(2): 322-4.

[6]Friguent B, Chaffatte AF, Lisa DO, et al. Measurement of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complex by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Immunol Methods, 1985, 77 (2): 305.

[7]沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 140-2.

[回结果列表](#)