

以抗体竞争结合抗原测定单抗亲和力常数的研究

郭杰标¹, 郭锐², 刘艳华³ (¹中德生物工程有限公司, 江西 南昌 330029; ²韶关职业病防治院, 广东 韶关 512026; ³韶关学院医学院, 广东 韶关 512026)

摘要:目的 在 Friguent 方法基础上建立更加稳定可靠的基于抗原/抗体竞争结合原理的单抗亲和力常数(Kd)检测方法。方法 以抗体对抗原进行竞争结合,通过双抗体夹心法检测在一定抗体浓度竞争下抗原的结合率计算 Kd 值。结果 用改良方法在两次不同条件下检测抗 IL-8 单抗的 Kd 值分别为: 2.61×10^{-12} mol/L 和 2.39×10^{-12} mol/L, 而使用 Friguent 方法在两次不同条件检测抗 IL-8 单抗的 Kd 值分别为: 5.57×10^{-10} mol/L 和 1.41×10^{-10} mol/L。结论 相对于 Friguent 方法,本研究计算出的 Kd 值更能反映抗原/抗体结合的真实情况,而且在不同实验条件下检测结果重现性强。

关键词:单克隆抗体;抗原;亲和力常数;酶联免疫吸附检测

中图分类号:R33 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)07-1057-03

Measurement of affinity constant of monoclonal antibody by competitive antibody binding to antigen

GUO Jie-biao¹, GUO Rui², LIU Yan-hua³

¹Zodolabs Biotechnology Limited Company, Nanchang 330029, China; ²Prevention and Treatment Center for Occupational Diseases of Shaoguan, Shaoguan 512026, China; ³Medical College of Shaoguan University, Shaoguan 512026, China

Abstract: **Objective** To develop a more reliable and stable method for determining monoclonal antibody (mAb) affinity constant based on competitive antibody/antigen binding. **Methods** The Kd value was calculated based on the relationship between the binding proportion of the antigen and the original concentration of the mAb that competed for the binding site of the antigen. **Results** The Kd values measured with this improved method under two different conditions were 2.61×10^{-12} mol/L and 2.39×10^{-12} mol/L, and those with Friguent method in these two conditions were 5.57×10^{-10} mol/L and 1.41×10^{-10} mol/L, respectively. **Conclusion** Compared with Friguent method, the Kd values measured with this improved method are closer to the actual value, and the measurement results under different experiment conditions are more stable.

Key words: monoclonal antibody; antigen; affinity constant; ELISA

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 i_0

反应平衡各组分浓度: $a_0(1-B)$ $i_0 - a_0B$ 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_1 , $B = (A_0 - A_1) / A_0$, 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

收稿日期:2005-11-02

作者简介:郭杰标(1971-),男,工程师,本科,电话:13509869766,

E-mail: fjlzq@tom.com

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 μg/ml,每孔 100 μl 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;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 μl 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 μl 生物素化 6E6-2 抗体溶液 37 °C 反应半小时,然后加入 50 μl 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 D₄₅₀ 值计算各个反应溶液的抗原结合率,并推算亲和力常数。

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 μg/ml,以每孔 100 μl 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 μl 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 μl 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 D₄₅₀ 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 a₀ 是 IL-8 抗原初始浓度, i₀ 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= (A₀-A_i)/A₀, A₀ 和 A_i 分别是抗体浓度为 0 和各浓度时的抗原酶联检测 D₄₅₀ 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)。

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

a₀: Original concentration of IL-8 antigen; i₀: Original concentration of 6E6-1 McAb; B: Binding proportion of IL-8 antigen equal to (A₀-A_i)/A₀, A₀ 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.

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 a₀ 是 6E6-1 单抗初始浓度, i₀ 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= (A₀-A_i)/A₀, A₀ 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 D₄₅₀ 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 i₀ 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 i₀ 对 B/(1-B) 作图求得斜率 (亲和力常数), 得出 Kd 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 $Kd = B/[i_0(1-B)]$ 测出的 Kd 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: $Kdi_0 = B/(1-B)$ 。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 Kd 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 ($i_0 - a_0B$) 与抗原结合率的关系: $Kd(i_0 - a_0B) = B/(1-B)$,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,所以不同检测条件下测得的 Kd 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 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,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 α 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.

(上接 1056 页)

对于白内障手术是否联合取硅油目前尚有争议,文献报告单纯硅油取出术后视网膜脱离复发率为 17.4%,且白内障术中联合硅油取出可造成视网膜脱离复发率提高^[6,7]。近年许多文献报道了白内障摘除联合硅油取出,包括囊外摘除和超声乳化摘除术。但我们因考虑到大部分玻璃体切除硅油填充患者都经过 2~3 次手术,有的甚至经过 4 次以上的手术才视网膜复位,而且往往这类病人的另眼视力也差,甚至是独眼,所以我们只是对术中出现硅油大量溢出或少部分视网膜条件较好或大量硅油乳化、角膜变性的病人行白内障术中联合取硅油,而对单纯硅油并发性白内障而并未出现其他并发症患者采取较慎重的态度。综上所述,对于玻璃体切除硅油填充术后并发性白内障进行手术,无论是晶体囊外摘除术还是超声乳化摘除术联合人工晶体植入或联合硅油取出术,都能不同程度提高患者的视力,改善患者生活质量。晶体超声乳化具有更安全、稳定的优点,是目前首选的手术方

式,熟练、轻巧的手术操作也是手术成功的关键。

参考文献:

- [1] 李绍珍.眼科手术学[M].第 2 版,北京:人民卫生出版社,1997:696-8.
- [2] Federman JL, Schubert HD. Complications associated with the use of silicone oil at 150 eyes after retina-vitreous surgery [J]. Ophthalmology, 1988, 95(7):870-6.
- [3] Gonvers M. Temporary silicone oil tamponade in the management of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy [J]. Am J Ophthalmol, 1985, 100:239-41.
- [4] 朱弼,缪浴宇,许迅.视网膜脱离硅油注入术后白内障的手术治疗[J].中国实用眼科杂志,2005,23(5):516-8.
- [5] 王志良,孙倩,张哲,等.硅油填充眼并发性白内障手术方式探讨[J].中国实用眼科杂志,2003,21(11):842-4.
- [6] 赵明威,蒋宇振,黎晓新.眼内硅油对屈光状态影响的理论推导与临床观察[J].眼科研究,2003,21(3):292-5.
- [7] Larkin GB, Flaxel CJ, Leaver PK. Phacoemulsification and silicone oil removal through a single corneal incision[J]. Ophthalmology, 1998, 105(11):2023-7.