

单克隆抗体亲和力的测定及其意义

金建平

(第四军医大学, 西安)

随着单克隆抗体杂交瘤技术日益广泛的应用, 需要对获得的单克隆抗体 (McAb) 进行系统的分析鉴定, 以确定其在各种免疫学试验中的价值。除了对 McAb 的免疫球蛋白链理化性质、结合抗原的特异性以及检测抗原时的敏感度进行分析外, 测定 McAb 对特定抗原的结合亲和力, 对选择合适的 McAb 用于某一特定的目的是十分重要的。

抗体亲和力是指一个抗体分子与一个半抗原分子或抗原分子的一个决定簇起反应的能力。由抗体 (Ab) 与半抗原 (H) 所形成复合物 (Ab·H) 的解离平衡常数表示: $K = [Ab \cdot H] / [Ab][H]$, 单位为升/克分子。亲和力常数 K 越高, 抗体结合半抗原的能力越强。抗体亲和力取决于抗体对位 (Paratope) 与所作用抗原表位 (Epitope) 之间的配合程度 (接触面积的大小、吻合的密切程度以及带电基团与疏水基团的分布等)。由于传统方法制出抗血清中的抗体是含有许多不同亲和力抗体组分的混合物, 故对其只能测出抗血清对某一半抗原的平均亲和力。而对大分子蛋白质抗原, 由于存在多个抗原决定簇, 只能测出抗血清中抗体对抗原分子上全部决定簇的反应能力, 称之为亲合力或活度 (Avidity)^[1]。McAb 的高度均一性, 才使得能够实际测定抗原-抗体反应的真实亲和力, 并使“亲和力”和“活度”这两个概念的区分更加明确。本文旨在就较常

用的 McAb 亲和力测定方法及其意义作一简要回顾。

测定单克隆抗体亲和力常用的方法

(一) 平衡透析法

对作用于小分子半抗原的 McAb, 利用小分子能透过半透膜的特点, 可用本法测定亲和力。将一定量的 McAb 和半抗原分别置于由半透膜隔开的透析小室两侧, 使半抗原分子透入抗体室, 与抗体发生结合反应。当 $Ab + H \rightleftharpoons Ab \cdot H$ 反应达到平衡时, 分别测定游离与结合半抗原的浓度, 由修改的 Sips 方程式计算亲和常数: $1/[b] = 1/K \times 1/[Ab] \times 1/[H] + 1/[Ab]$ 。式中 $[b]$ 为结合半抗原的克分子浓度; $[H]$ 为游离半抗原的克分子浓度; $[Ab]$ 为抗体结合位点的浓度, 等于抗体克分子浓度 \times 抗体结合价 ($IgG = 2, IgM = 10$)。若改变反应物的浓度, 用 $1/[b]$ 对 $1/[H]$ 作图时, McAb 所得到的结果应为一条直线, 可验证 McAb 亲和力的均一性^[2]。在抗体总浓度未知时, 可用相同浓度的 McAb 对两个不同浓度的半抗原作平衡透析, 这时两次透析的平衡常数分别为:

- (1) $K_1 = [b]_1 / ([Ab]_x - [b]_1)[H]_1$
- (2) $K_2 = [b]_2 / ([Ab]_x - [b]_2)[H]_2$

本文于1988年8月11日收到。

本文承蒙汪美先教授、金伯泉讲师审校, 特此致谢。

式中 $[b]_1$ 、 $[b]_2$ 分别为两次透析的结合半抗原浓度； $[H]_1$ 、 $[H]_2$ 分别为两次透析的游离半抗原浓度； $[Ab]_x$ 为未知的抗体总浓度。先由(1)式求出 $[Ab]_x$ ，代入(2)式，即可求出亲和力常数 $K^{[3]}$ 。当抗原颗粒很大时(如病毒颗粒)，也可用能透过抗体 Fab 片段的膜作平衡透析测定抗体亲和力^[4]。

(二) 结合抗原沉淀法

将单价抗原与相应 McAb 一同在溶液中温育，反应达到平衡后，用50%饱和硫酸铵或15%聚乙二醇(PEG 6000)，进行 Farr 氏沉淀，将结合与游离抗原分离，分别测定后，再以与平衡透析时相同的方法计算亲和力常数^[5]。

(三) 放射免疫法 (RIA)

在以上两种方法中，均可用放射性同位素标记半抗原来进行测定。对蛋白质抗原，尤其是一些难以纯化和定量者，可将系列稀释的定量 McAb，与痕量的放射标记抗原在溶液中一同温育 (McAb 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，以50%最大结合处 McAb 结合价浓度的倒数为亲和常数 $K^{[6]}$ 。

(四) 酶联免疫吸附试验法 (ELISA)

将 McAb 与定量抗原一同在溶液中温育，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，可由测出的吸光度值直接计算出亲和常数。由于 ELISA 测定时仅约10%的游离抗体结合到固相上，故认为测定过程不引起明显的平衡点移动。当所用抗原 \geq 所用抗体量10倍时，计算中可对抗体量略去不计，计算公式为： $A_0/(A_0 - A) = 1 + K/a_0$ 。式中 A_0 为无抗原存在时的抗体 ELISA 吸光度值； A 为加入了克分子浓度为 a_0 的抗原后的吸光度值， K 为亲和力常数的倒

数。ELISA 的敏感度使本法能测出 $10^{-9}M$ 数量级的亲和力常数，已满足一般测定 McAb 亲和力的需要。并由于本法可用杂交瘤培养上清或腹水等 McAb 粗制品进行亲和力测定，从而能在融合后早期对所获得 McAb 进行亲和力评价，决定取舍，这是本法的一大优点。本法的另一优点是无需对抗原或抗体进行标记，故简便易行，且防止了由于标记造成的结构修饰而引起的测定误差^[7]。

(五) 相对亲和力测定方法

以上方法均是测定 McAb 在溶液中的固有亲和力，测算较为复杂。并且要求抗原或抗体中至少有一者是单价的，测得的结果才能准确。故除测定 McAb 对半抗原的亲和力外，最好用抗体 Fab 片段测定与大分子抗原的亲和力。因此，实际应用中往往测定某一组 McAb 对特定抗原的相对亲和力较为方便，亦足以指导 McAb 的用途选择。有时亦将测得的相对亲和力称为 McAb 在某一体系中的活度或功能亲和力。常用测定方法如下：

1. 定量免疫电泳法：火箭电泳时火箭形区域的面积是抗原量的函数，但较高亲和力的抗原-抗体反应将产生较高大的火箭形区域。可根据加入系列稀释抗原后的火箭电泳面积与抗原量作图得到的曲线斜率，来评价抗体的亲和力^[8]。根据同样原理，进而可更简便地用反向定量免疫电泳法测定，以比较一组 McAb 对同一抗原的相对亲和力^[9]。根据免疫沉淀反应的要求，只有当抗原和抗体均是多价时，才能用本方法测定。

2. 固相放射免疫法 (SP-RIA)：用抗原(如病毒颗粒或蛋白质等)包被微板，加入系列稀释的定量 McAb。温育至反应平衡后，洗去未结合 McAb，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，即可按下式计算抗体亲和力： $([Ab]_B/[Ab]_T - [Ab]_B)/[Ab]_B = -nK$ 。式中 $[Ab]_B$ 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^[10]。

根据相同原理，也可用ELISA来测定McAb在固相测定系统中的相对亲和力。另外可根据定量系列稀释McAb，在相同条件下测定其在间接法ELISA中的终点浓度，来比较一组McAb在固相测定体系中的相对亲和力。将杂交瘤细胞培养上清用双抗体夹心法ELISA测定其中的小鼠Ig含量，可得出其中McAb的浓度，测定时的标准曲线可由已知浓度的正常小鼠Ig得出。在固相法测定时，控制固相抗原表位密度在较低水平，可使McAb呈单价结合状态，让亲和力的影响更容易表现出来^[11]。

单克隆抗体亲和力测定的意义

(一) 为适应不同用途选择单克隆抗体提供依据

为保证RIA、ELISA、免疫荧光检测(IFA)等免疫学试验的灵敏度和可靠性，所用抗体对特异性待测抗原的亲和力必须高于一定的阈值。当用特异性抗体进行体内解毒、抗毒或中和治疗，用药物或毒素等偶联于抗体治疗恶性肿瘤，以及将放射性同位素等示踪剂偶联于抗体进行活体病灶特异性定位诊断等情况下，为使效果确实可靠、毒副作用尽可能小，均需要用高亲和力抗体。而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，则需用中等亲和力的抗体，以便能用较温和的条件进行洗脱^[6]。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McAb取代多克隆抗血清时，就必须对其亲和力进行测定，才能选出合适者备用。另外，由于某些McAb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McAb时，应采取与实际应用时条件相仿的方法测定其亲和力^[12]。

(二) 杂交瘤融合成功后早期预选McAb

应用ELISA等简便方法，可在杂交瘤细胞系第一次克隆化后，即对其McAb亲和力进行测定评价。进而可结合制备目的，早期决定取舍，以达节约材料、缩短实验周期。

(三) 验证McAb的均一性

根据平衡透析、结合抗原沉淀或RIA测定亲和力时 $1/[b]$ 对 $1/[H]$ 作图得到的曲线形态是否为直线，可验证被测McAb是否像预期的那样为亲和力均一的纯品^[13]。

(四) 研究抗体亲和力对多种免疫学检测抗体方法的影响

目前常用的多种检测特异性抗体水平的免疫学方法，如ELISA、SP-RIA、免疫球蛋白沉淀试验、IFA、补体结合试验及固相血凝等，均是亲和力依赖性的^[14]。用已知免疫球蛋白类别和亲和力的McAb，研究多种固相免疫检测方法对不同亲和力抗体测定情况的结果表明，只有当固相抗原大大过量，并以滴定终点加标准对照作为判定标准时，才可能对总抗体水平进行定量，否则将只反映抗体群体中高亲和力组分的水平。用间接法ELISA等多层次、需多次洗涤的检测方法，将难以测出感染早期和杂交瘤筛选等情况下的低

亲和力抗体^[14,15]。ELISA方法筛选杂交瘤上清时的吸光度值高低,也主要由亲和力决定(包括待测 McAb 与固相抗原及酶标第二抗体与待测 McAb 的结合亲和力),上清中 McAb 浓度则为次要因素^[16]。

(五) 免疫复合物研究

可用已知亲和力的单克隆抗体,研究免疫复合物的形成机理^[17]。

(六) 研究免疫球蛋白的生物学性质

抗体的许多生物学性质,如抗御细菌感染、排除抗原、结合补体等由抗体介导的免疫功能,均与抗体亲和力有关,亲和力高者作用强于低者。用已知不同亲和力的 McAb 进行有关研究,有助于探讨上述机理^[5]。

小 结

McAb 具有高度均一性的特点,使测定其亲和力成为可能,并且必要。应用平衡透析、结合抗原沉淀、RIA、ELISA 或定量免疫电泳等方法测定 McAb 对特定配体 (Ligand) 的亲和力,可指导在不同免疫学方法中选用合适的 McAb、早期评价 McAb 的优劣、验证 McAb 的均一性、研究抗体亲和力对检测抗体水平的影响、研究免疫复合物形成及抗体生物学功能等。在实际工作中,用 ELISA 或 RIA 等简便方法测定 McAb 的亲和力或活度,已足以指导 McAb 的制备和应用。

参 考 文 献

- [1] 王世中:中国医学百科全书·免疫学,上海科技出版社,pp.34—35,1983.
- [2] Hunter, M.M. et al.; *J. Immunol.*, 129 (3):1165—1172, 1982.
- [3] Eisen, H.V. and Siskind, G.M.; *Biochemistry*, 3:996, 1964.
- [4] Fazekas, S. et al.; *J. Immunol.*, 90: 154—164, 1963.
- [5] Brown, S.E. et al.; *J. Immunol. Meth.*, 72 (1):41—48, 1984.
- [6] Van, Heyningen, V. et al.; *J. Immunol. Meth.*, 62 (2):147—153, 1983.
- [7] Friguert, B. et al.; *J. Immunol. Meth.*, 77 (2):305—319, 1985.
- [8] Birkmeyer, R.C. et al.; *J. Immunol. Meth.*, 44 (3):271—284, 1981.
- [9] Birkmeyer, R.C. et al.; *J. Immunol. Meth.*, 49 (2):141—150, 1982.
- [10] Frankel, M.E. and Gerhard, W.; *Mol. Immunol.*, 16 (1):101—106, 1979.
- [11] Lew, A.M.; *J. Immunol. Meth.*, 72 (1):171—176, 1984.
- [12] Goding, J.W.; *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 1983, Academic Press, London, pp.44—45.
- [13] Steward, M.W. and Petty, R.E.; *Immunology*, 22:747—756, 1972.
- [14] Peterfy, F. et al.; *J. Immunol.*, 130 (4):1809—1813, 1983.
- [15] Nimmon, G.R. et al.; *J. Immunol. Meth.*, 72 (1):177—187, 1984.
- [16] 金建平等;中国免疫学杂志, 2 (2):111—116, 1986.
- [17] Jacobsen, C. et al.; *J. Immunol. Meth.*, 50 (1):77—88, 1982.