

抗体表位分析方法

背景简介

单克隆抗体具有高度均一性及对靶分子的高亲和性、特异性，其与相应抗原的反应性决定于其所识别的抗原表位，确定相应表位在抗原结构上的位置是单克隆抗体筛选中的关键步骤。

常用的单克隆抗体表位的分析方法，包括 ELISA 法、生物酶解法及化学切割法、噬菌体随机肽库、X-射线晶体学、丙氨酸扫描、氘氘交换质谱(HDX-MS)、生物信息学表位预测方法。

分析方法

(1) X-射线共晶体学及低温电子显微镜分析：可直接观察抗原和抗体之间的相互作用，分辨率图高；缺点耗时、昂贵，而且不是所有蛋白都易于结晶。

(2) 基于阵列的寡肽扫描技术。利用来自目标蛋白重叠和非重叠片段的寡肽序列文库，测试目标抗体与抗原的结合作用。方法快速、相对便宜。

(3) 定点诱变：在目标蛋白质的序列中引入氨基酸的系统突变；测试抗体与突变蛋白结合性变化来鉴定构成表位的氨基酸。

(4) 氘氘交换(HDX)：提供抗原与抗体相结合的溶剂可及性信息，在结合区域，溶剂可及性降低。确定抗原-抗体复合体在其天然溶液中的相互作用位点，HDX 表位作图快速、准确。

(5) 生物酶解法及化学切割法。首先处理抗原分子以获得长短不同的多肽片段，再利用单克隆抗体筛选可与其发生阳性反应的片段，分析阳性片段的氨基酸序列后合成该序列，进而确定起关键作用的单个氨基酸。

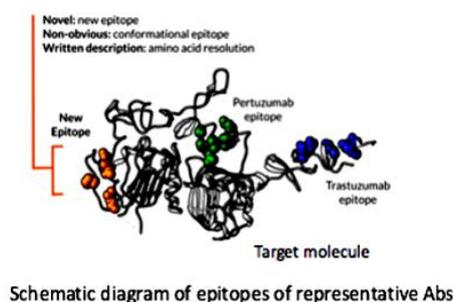
(6) 基于 ELISA 的分析：相加试验和竞争抑制试验（双抗体竞争）

①ELISA 相加试验

该方法首先将抗原分别与两种单克隆抗体作饱和曲线，确定能使抗原饱和的适宜抗体浓度，分别将第 1 种、第 2 种饱和浓度及两种饱和浓度的单克隆混合物与该抗原结合，测定相应 A450，分别为 A1、A2 及 A1+2，通过 A 值得到相加指数（AI），公式为 AI（%） $= [2 \times A1 + 2 / (A1 + A2) - 1] \times 100\%$ 。如单克隆抗体浓度可将抗原饱和，当两种单抗针对相同表位时，AI 将趋近于 0，两种抗体的表位不同的，AI 将接近 100%，结果一般以 AI > 50% 或 AI < 50% 进行判定。

② 竞争抑制试验

实验时，抗原包板后同时加入未标记的待检单克隆抗体和酶标的对照单克隆抗体，当两种单克隆抗体的表位特异性相同时，酶标对照单克隆抗体与待检单克隆抗体发生竞争，从而出现抑制现象。通过检测 A450 计算抑制率，计算方式多样，仅列出 3 种：抑制率（%） $= [(A \text{ 基点对照} - A \text{ 抑制}) / A \text{ 基点对照}] \times 100\%$ 、抑制率 $= 1 - \log_2(A \text{ 抑制} / A \text{ 基点对照})$ 、抑制率（%） $= [(1 - A \text{ 抑制}) / A \text{ 基点对照}] \times 100\%$ ，其中 A 基点对照为酶标对照组，不加任何竞争抗体；A 抑制为两种单抗存在时的测量值。当酶标对照单抗无其他竞争抗体时，A 值为最大，计算结果越接近 100%，说明两种抗体识别的表位越接近；越接近 0，说明两种抗体识别的表位相关性越小。



（参考文献：[1]赵晓瑞,毛晓燕.单克隆抗体表位分析技术的研究进展[J].中国生物制品学杂志,2018,31(5):555-562.

Adriana Zeevi et al. Human leukocyte antigen epitope analysis to assess complement- and non-complement-binding donor-specific antibody repertoire in a pediatric heart transplant recipient[J]. Human Immunology, 2011, 73(1) : 48-51.)