

Countstar® FL 在抗体亲和力实验中的应用

简介:

抗体是自然产生用于帮助免疫系统抵御细胞内外侵害的免疫球蛋白。免疫荧光法测定细胞水平的抗体亲和力大小是评价抗体效果非常重要的指标，当前主要的测定方法是利用流式细胞仪以实现相对定量。而 Countstar® FL 可通过间接免疫荧光法检测不同抗原抗体反应呈现的平均荧光强度直接定量评价抗体亲和力大小，同时也可检测细胞浓度、活率。此外，可获得细胞图片，实验过程中实时拍摄明场和荧光图像。Countstar® FL 为客户在抗体药物筛选中提供了快速、准确、可靠的抗体亲和力检测方法。Countstar® FL（图 1）是一个智能的、直观的细胞分析仪器用于多种细胞实验，包括细胞转染，细胞凋亡，细胞表面标志物，细胞活力，抗体亲和力和细胞周期的评估。该系统提供了强大的荧光定量结果。易于使用的自动化程序指导你完成从细胞图像采集到数据分析的过程。



图 1 .Countstar® FL 系统结合数字显微镜和图像分析功能的台面设备

材料:

Countstar 产品

Countstar® FL 细胞分析仪

Countstar®样品板

0.2% 台盼蓝染色液 (CS0101001-50)

其他材料

CHO 细胞系

DMEM 细胞培养基(Hyclone-SH30243.01)

胎牛血清(Hyclone-SH30084.03)

胰蛋白酶(Hyclone-SH30042.01)

其中，CHO 细胞系稳定表达 X 蛋白，用于评价原研药和仿制药的亲合力

一抗：不同浓度梯度的 002-BMK1,002-BMK2, AB1, AB2, AB3, AB4, AB5, AB6, AB7, AB8, AB9, PCSK-9。其中，002-BMK1,002-BMK2 能特异性的与 X 蛋白结合（阳性抗体），PCSK-9 是阴性对照抗体。

二抗：Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-mouse IgG (Biolegend)，5μg/mL

软件

GraphPad Prism5[®]

方法：

细胞培养条件

1. CHO 细胞培养在完全培养基中，组成为：500mLDMEM 培养基，2 mM L-谷氨酰胺, 1.5 g/L 碳酸氢钠和 10% 胎牛血清。于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养 48 小时；
2. 消化收集细胞。

染色步骤

1. 使用台盼蓝计数测定细胞浓度；
2. 准备 3×10^5 个细胞/每个反应；
3. 细胞样品于 400g 下离心 3-5 分钟，去上清，用 100μL PBS 重悬；
4. 轻轻混匀细胞样品，于 400g 下离心 3-5 分钟，去上清，用 100μL Cellstaining buffer 重悬；
5. 在细胞样品中加入不同浓度梯度的一抗，每种抗体最高浓度为 10μg/mL，4

倍梯度稀释，最低浓度为 0.01 μ g/mL；

6. 37℃下，避光孵育 60 分钟；
7. 细胞样品于 400g 下离心 3-5 分钟，去上清，用 100 μ L PBS 重悬；
8. 轻轻混匀细胞样品，于 400g 下离心 3-5 分钟，去上清，用 100 μ L Cellstaining buffer 重悬；
9. 在每个反应组内加入 5 μ g/mL 二抗；
10. 常温下，避光孵育 30 分钟；
11. 细胞样品于 400g 下离心 3-5 分钟，去上清，用 100 μ L PBS 重悬；
12. 轻轻混匀细胞样品，于 400g 下离心 3-5 分钟，去上清，用 100 μ L Cellstaining buffer 重悬；
13. 混匀样品，加入 20 μ L 于细胞计数板中，上机检测。

注：以上操作可使用 EP 管或 96 孔板。

图像获取及数据分析

1. 选用“台盼蓝计数”进行细胞浓度和活率测定；
2. 单荧光模块的程序用于获取 FITC 通道下 Alexa Fluor[®] 488 的图像；
3. 每个样品采集 1 或 3 个视野（该实验检测 1 个视野）；
4. 检测过程中直接呈现数据结果，图像获取和数据分析完成后，导出数据结果。

抗体亲和力检测过程如图 2。

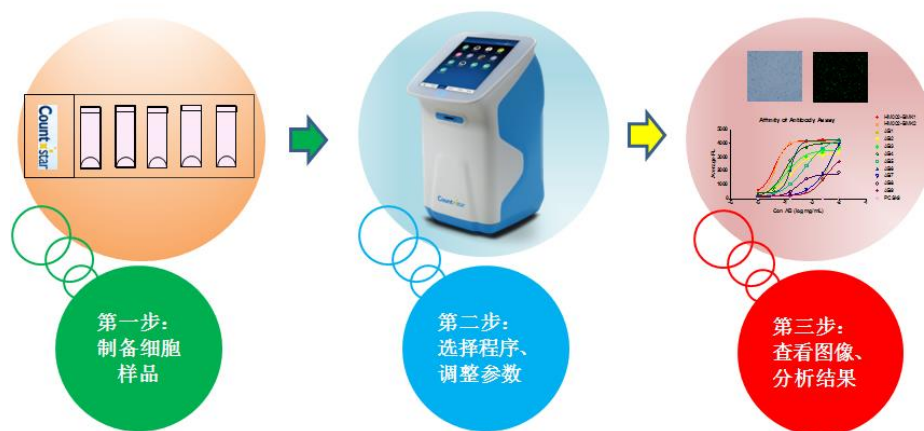


图 2. 抗体亲和力检测过程

不同抗体梯度稀释添加剂量

选用 96 孔板测定不同抗体与 CHO 细胞反应的剂量效应实验，包括原研药、抗体药和阴性对照(图 3)。一抗浓度按照下表指示梯度降低(10μg/mL-0.01μg/mL)。

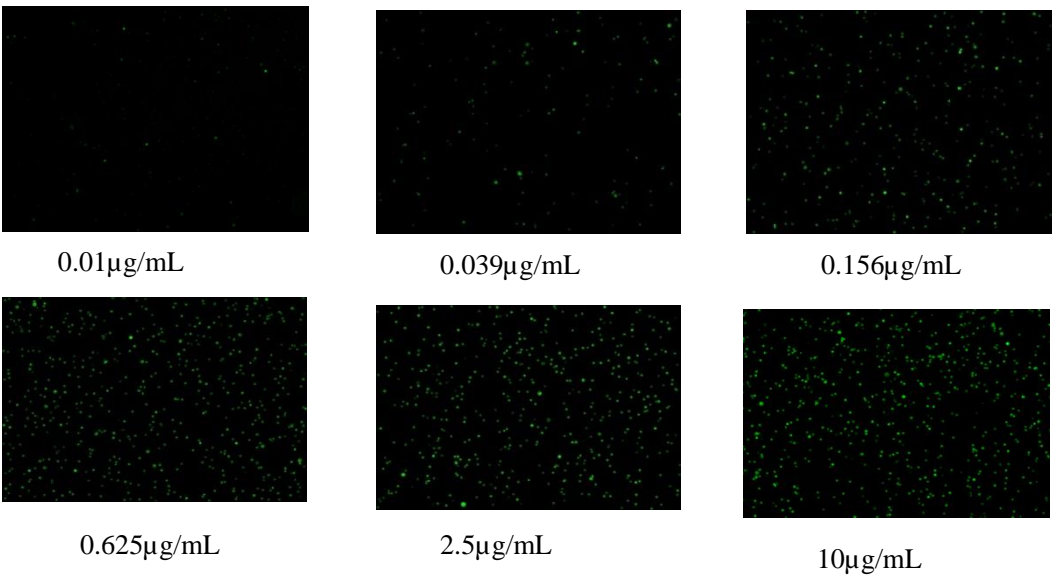
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗体名称	002-BMK1	002-BMK2	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	PCS K9
A	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
B	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
C	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625
D	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156
E	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
F	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

μg/mL

图 3. 96 孔板中抗体浓度. 每孔中有 CHO 细胞（30 万个），二抗(5μg/mL)及图示一抗(0.01, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5, 10μg/mL).其他孔为空.

Countstar® FL 系统图像获取

Countstar® FL 内置的抗体亲和力检测程序进行明场，FITC 通道下 Alexa Fluor® 488 图像的获取。明场的图像作为一个参考标准对荧光场的图像进行分割，进而获取荧光场的信号。不同浓度梯度 AB4，最高浓度 PCK9 和 002-BMK1 样本图像结果如图 3 所示。



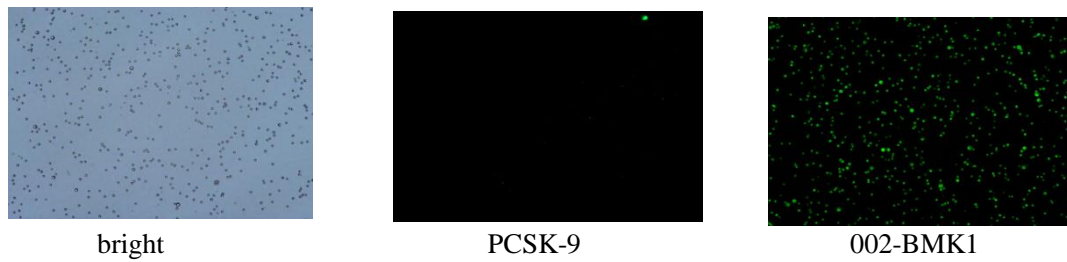
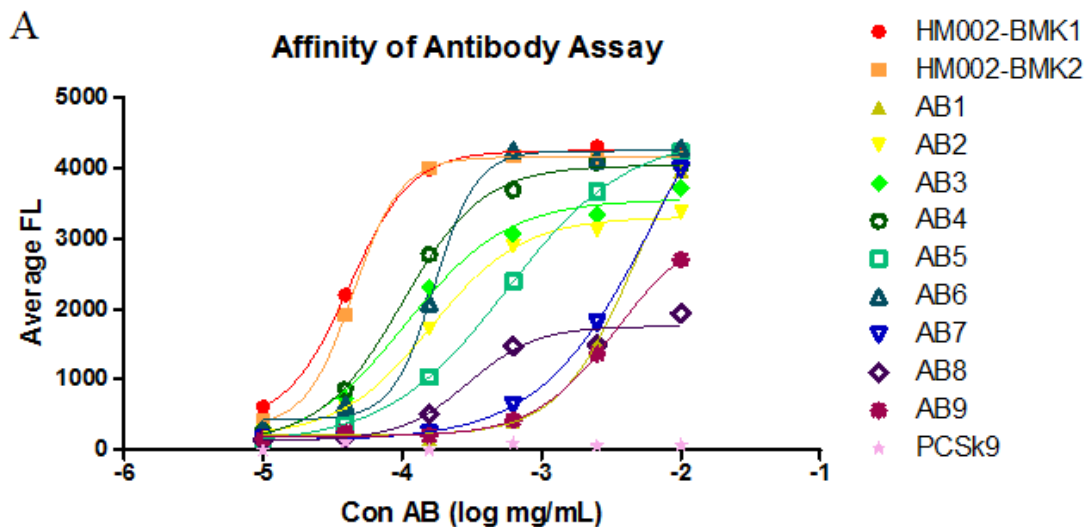


图 4. 0.01, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5, 10 μ g/ml AB4 与 CHO 细胞反应后的细胞图像. 图像显示抗体浓度越高, 荧光信号越强. 002-BMK1 抗体能特异性的与 X 蛋白结合, PCSK-9 为阴性对照抗体. 图像代表 002-BMK1 样品有较强的荧光信号, PCSK-9 样品基本没有荧光信号.

抗体亲和力定量分析

不同抗原抗体反应呈现的平均荧光强度直接定量评价抗体亲和力大小. 稳定表达 X 蛋白的 CHO 细胞系应用于分析抗体亲和力, Countstar[®]FL 可直接显示测试结果, 并将数据导出进行分析. 使用 GraphPad Prism5[®]对抗体的 EC₅₀ 进行分析(Fig. 5A). 测试结果显示样品荧光强度随着一抗浓度升高而增加, 平均荧光强度曲线代表不同浓度下每个抗体的反应活性, 其中 PCSK-9 为阴性对照抗体, 样品基本没有荧光信号. 各抗体的 LogEC₅₀ 结果显示原研药的抗体亲和力比仿制药更好, 而仿制药中 AB2, AB3, AB4, AB6 效果较好, 可进行下一步实验(Fig. 5B). Countstar[®] FL 系统为评价抗体亲和力提供直接可靠的结果.



	HM002-BMK1	HM002-BMK2	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	PCSk9
Bottom	388.9	321.8	215.7	187.7	24.26	115	90.4	437	137.9	135.9	194.7	NA
Top	4238	4148	4982	3299	3551	4031	4455	4235	6508	1754	3202	NA
LogEC50	-4.382	-4.351	-2.344	-3.796	-3.975	-4.005	-3.25	-3.769	-2.172	-3.53	-2.468	NA
HillSlope	1.944	2.532	1.629	1.326	1.186	1.49	1	2.884	1.044	1.768	1.475	NA
EC50	0.00004153	0.00004457	0.004533	0.00016	0.00011	9.9E-05	0.000563	0.00017	0.00673	0.0003	0.003405	NA

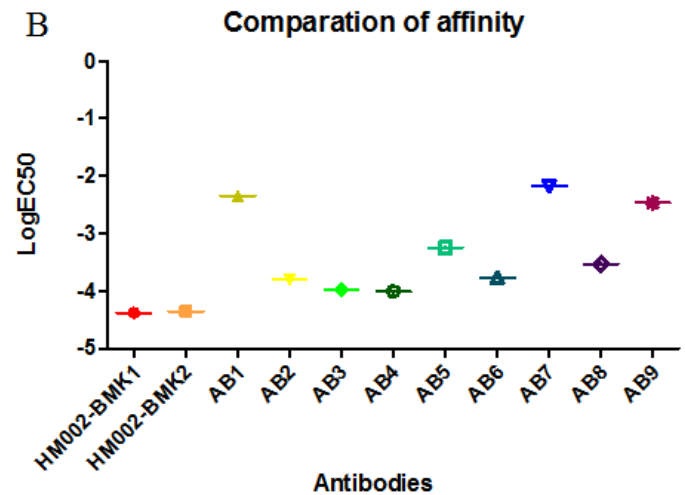


图 5. 抗体亲和力定量分析结果. A.不同浓度梯度抗体下不同抗原抗体反应中平均荧光强度.B.原研药和仿制药的分析结果比较.

总结:

Countstar® FL 系统提供了一个快速，直接，容易的方法评价抗体亲和力。此外，它是融合了电子显微镜，图像处理，自动细胞计数于一体的设备。另外，Countstar® FL 提供扩展功能，用户可以根据自身需要进行定制。Countstar® FL 是一款高度可移动的设备，内置多种预设程序，便于用户快速获取准确，稳定，可高度重现的数据。仪器中每个应用模块简单易用，大大简化了常规实验室的工作，给客户 提供高质量的科研数据。Countstar® FL 为客户开展抗体亲和力实验提供一个直接可靠的实验结果。

网址: <http://www.countstar.cn>

上海睿钰生物科技有限公司总部

电话: +86-021-33735070

传真: +86-021-52261001

邮件: marketing@countstar.cn

地址: 上海市松江区沈砖公路 6000 号创异工房 C3 栋 301 室, 201619

睿钰生物科技有限公司欧洲分部

电话: +49-160-97847082

传真: +49-5225-8714881

邮件: bodo.kohring@countstar.cn

地址: Bachstraße 16, 32139 Spenge, Germany

Countstar® FL 仅限用于科研!

