

人Fc gamma RI / CD64结合试剂盒 (TR-FRET)

【产品名称】

人Fc gamma RI / CD64结合试剂盒 (TR-FRET)

【规格】

100 Tests & 500 Tests

【货号】

FRT-03

【用途】

该试剂盒用于促进抗体候选药物的ADCC和ADCP功能性评价,以及对人CD64特异性抗体进行高通量筛选。它也可以作为一种通用的检测工具来鉴定抗体药物与人CD64结合的能力。仅供研究使用 (RUO)。

【背景】

Fc γ 受体 (Fc γ Rs) 在许多免疫效应细胞中表达,可介导抗体功能。人Fc γ 受体由Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIa (CD32a)、Fc γ RIIc (CD32c)、Fc γ RIIIa (CD16a) 四种激活受体、一种抑制性受体Fc γ RIIb (CD32b) 和一种功能尚不清楚的受体Fc γ RI Ib (CD16b) 组成。

Fc γ RI (CD64) 是70kDa穿膜糖蛋白,属Ig超家族成员,胞膜外区有3个C2结构。人Fc γ RI (CD64) 是高亲和力受体,主要与人的单体IgG1、IgG3以及小鼠IgG2a和IgG3结合。与人IgG4 结合的亲和力明确降低,与人IgG2则无结合能力。

Fc γ RI (CD64)主要分布于单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等,但表达水平各不相同。

Fc γ 受体通过其胞外结构域 (ECD) 与IgG Fc的铰链区域相互作用。在IgG中, Fab段可以直接与特定的抗原结合,由此决定抗体的特异性和亲和力,同时, Fc段可以与免疫细胞表达的Fc γ 受体相互作用,从而激活免疫效应功能如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和抗体依赖性的细胞吞噬作用 (ADCP) 来清除外来物,这些相互作用对治疗性抗体的疗效和安全性很重要。Fc γ RI (CD64)

的主要功能之一就是通过对ADCP激活骨髓细胞吞噬IgG1和IgG结合的靶细胞。体外检测治疗性抗体与Fc γ 受体的相互作用已经作为抗体功能性能评价的指标。

人Fc gamma RI / CD64结合试剂盒（TR-FRET）采用在TR-FRET技术（时间分辨荧光共振能量转移）技术，钨螯合物标记的人Fc γ RI (CD64)（供体）和FA标记的人IgG1抗体（受体）在均相体系中结合，旨在促进抗体候选药物的ADCC和ADCP功能性评价，以及在0.5-1小时内高通量筛选人CD64特异性抗体。具有灵敏度高、检测时间短、使用方便等特点。

【检测原理】

本试剂盒应用TR-FRET竞争法。将生物素标记的人Fc γ RI (CD64)与钨螯合物标记的亲合素混合后作为能量供体（Donor），使用特定荧光素FA标记Human IgG1抗体作为能量受体（Acceptor）。实验将包括3个简单的步骤：

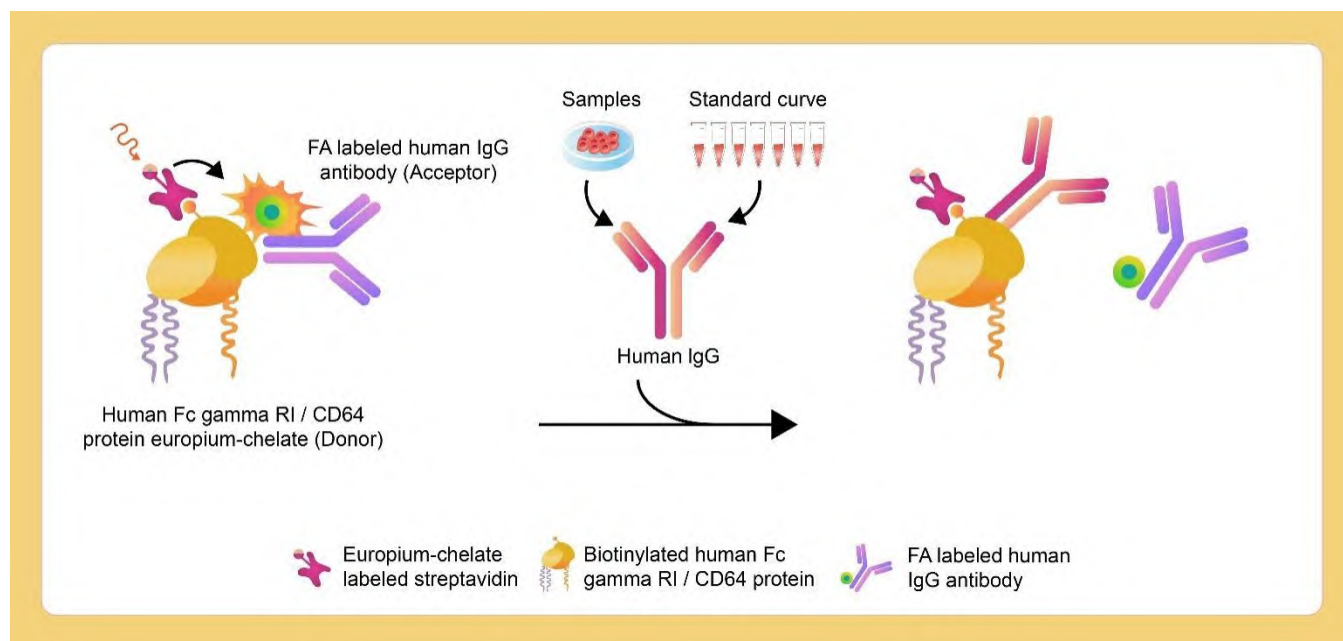
- 1) 先将样本与Donor混合，室温孵育0.5小时；
- 2) 再加入FA标记Human IgG1（Acceptor），室温孵育0.5小时；
- 3) 使用酶标仪TR-FRET模块读取665 nm和620 nm的荧光信号。

根据公式 $\text{Ratio} = \frac{\text{Signal } 665 \text{ nm}}{\text{Signal } 620 \text{ nm}} \times 10^4$ 计算Ratio值，Ratio值与样本中抗体的含量呈负相关。

当检测样本中不含与人Fc gamma RI / CD64结合的组分，钨螯合物偶联的人Fc gamma RI / CD64将与FA标记Human IgG1抗体（Acceptor）结合，此时能量供体和能量受体非常接近，能量供体在特定光源激发下发出的620nm的信号，该信号被能量受体接收，发出665nm的信号。

当检测样本中含有可与钨螯合物偶联的人Fc gamma RI / CD64（Donor）结合的组分，将阻止其与FA标记Human IgG1（Acceptor）结合，从而无法发生能量传递，检测信号减弱。

图1 实验原理图



【产品组份】

表1.产品组份

ID	组份名称	规格 (100Tests)	规格 (500Tests)	物理状态	存储条件	
					未开启	已开启
FRT03-C01	Human Fc gamma RI / CD64 Protein Europium-chelate	0.6 µg	3 µg	干粉	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
FRT03-C02	FA labeled human IgG antibody	2.4 µg	12 µg	干粉	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
FRT03-C03	Human IgG standard	100 µg	500 µg	干粉	2-8°C	-70°C
FRT03-C04	Sample Dilution Buffer	10 mL	10 mL	液体	2-8°C	2-8°C
FRT03-C05	Detection Buffer	10 mL	10 mL	液体	2-8°C	2-8°C

【需要但未提供的实验仪器与耗材】

1. 单道、多道微量移液器和移液器吸头：需满足10 µL、100 µL、1000 µL加样需求
2. 微孔板振荡器
3. 酶标仪，含TR-FRET模块，可检测665 nm/620 nm荧光信号
4. 离心管：1.5 mL，10 mL

5. 计时器
6. 96孔浅孔白色酶标板或384孔白色酶标板：如HTRF 96-well, white plate, low volume (Revvity, Cat.No. 66PL96100); White Opaque 384-well Microplate (Perkinelmer, Cat.No. 6007299)
7. 用于冻干组分重构用的去离子水或蒸馏水

【储存条件】

1. 未开封：试剂盒保存于2-8°C，有效期见外包装盒标签。
2. 已开封：试剂盒开封后各组分按照表1存贮条件保存，有效期自开封之日起为30天。

注：不要使用过期试剂。

【试剂准备】

使用前将所有试剂恢复至室温 (20°C-25°C)。如果溶液中有晶体形成，需平衡溶液至晶体完全溶解（可将溶液放置于恒温培养箱37°C平衡10-15 min）。

按照表2建议，用超纯水将所提供的冻干品配制成存储溶液，在室温下溶解15至30分钟，轻轻吹吸混匀，避免剧烈摇动或涡旋。重构的存储液应在-70°C保存，建议冻融次数不要超过2次。

注：Human Fc gamma RI / CD64 Protein Europium-chelate与FA labeled human IgG antibody存储液应避光保存。

表2. 配制方法

ID	组份名称	规格 (100Tests)		规格 (500Tests)		存储液浓度
		总量	重构水体积Vol.	总量	重构水体积	
FRT03-C01	Human Fc gamma RI / CD64 Protein Europium-chelate	0.6 µg	60 µL water	3 µg	300 µL water	10 µg/mL
FRT03-C02	FA labeled human IgG antibody	2.4 µg	60 µL water	12 µg	300 µL water	40 µg/mL
FRT03-C03	Human IgG standard	100 µg	50 µL water	500 µg	250 µL water	2000 µg/mL

【检测流程】

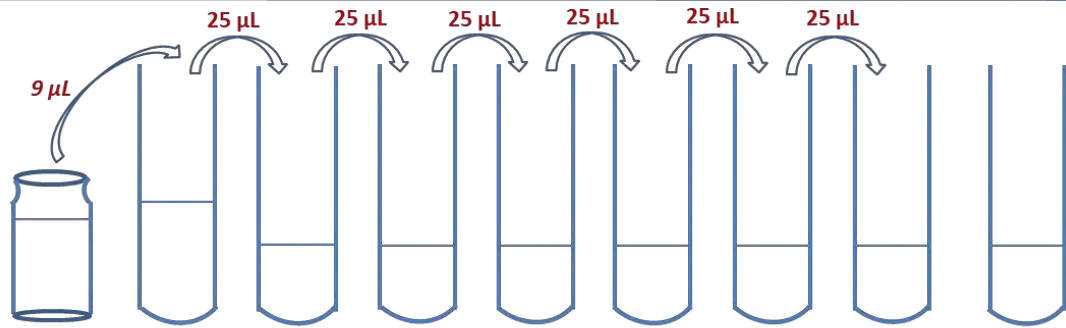
1. 加样

1.1 根据实验需要对样本进行系列稀释。

1.2 若使用试剂盒内的 Human IgG standard (FRT03-C03)作为参考品, 请按照图 2 用 Sample Dilution Buffer 对参考品进行稀释处理。将待检测的样本用 Sample Dilution Buffer 进行合适的稀释处理。

1.3 每孔加入 10 μ L 稀释处理后的参考品或样本。

图 2 Human IgG standard 参考品工作液的制备

Tubes/ Solution Code	Human IgG Stock Solution	Std 7	Std 6	Std 5	Std 4	Std 3	Std 2	Std 1	Std 0 (Blank)
Operating									
Solution Conc.	2000 μ g/mL	150 μ g/mL	37.5 μ g/mL	9.375 μ g/mL	2.344 μ g/mL	0.586 μ g/mL	0.146 μ g/mL	0.037 μ g/mL	0 μ g/mL
Dilution Buffer Vol.		111 μ L	75 μ L	75 μ L	75 μ L	75 μ L	75 μ L	75 μ L	75 μ L

2. 加 Donor

将 Human Fc gamma RI / CD64 Protein Europium-chelate 存储液(10 μ g/mL)使用 Detection Buffer 稀释至 1 μ g/mL, 配制为 Donor 工作液, 该工作液现用现配。每孔加入 5 μ L Donor 工作液, 用封板膜将微孔板封好, 在室温 (20°C-25°C) 震荡 (400-600 rpm) 孵育反应 30 分钟。

3. 加 Acceptor

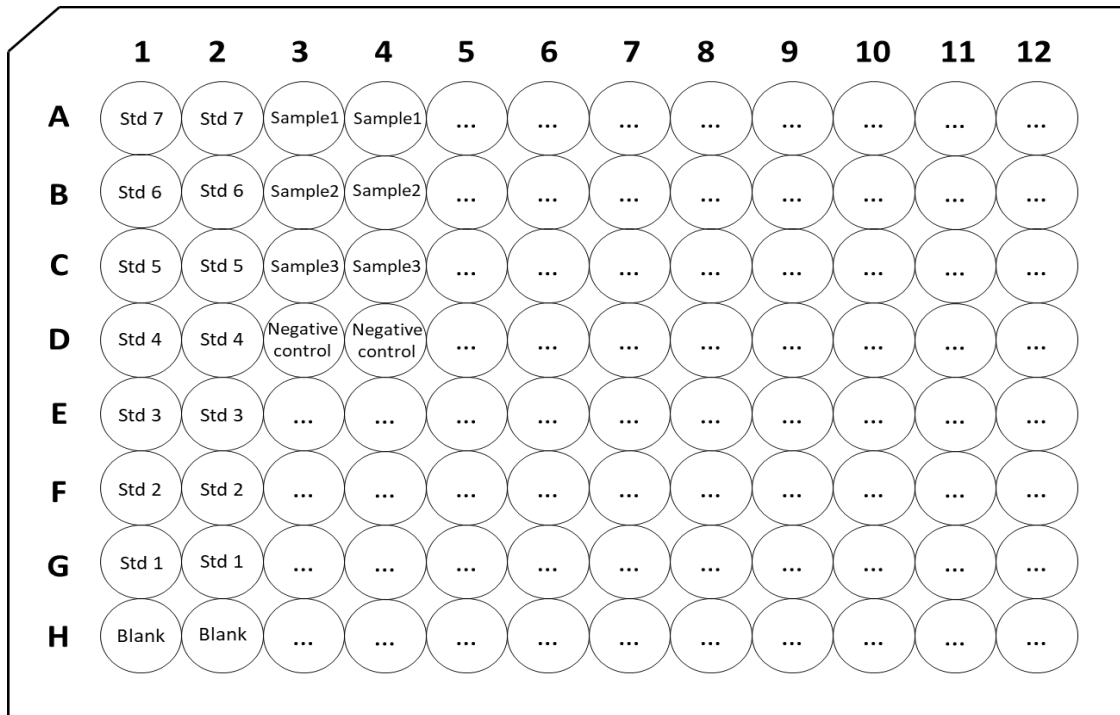
将 FA labeled human IgG antibody 存储液(40 μ g/mL)使用 Detection Buffer 稀释至 4 μ g/mL, 配制为 Acceptor 工作液, 该工作液现用现配, 避光保存。每孔加入 5 μ L Acceptor 工作液, 用封板膜将微孔板封好, 在室温 (20°C-25°C) 震荡 (400-600 rpm) 孵育反应 30 分钟。

根据实验需要参考图 3 和表 3 进行微孔板加样设计, 在对应板孔内加入对应反应液。

表 3. 微孔板加样设计参考

	1	2	3	4
A	10 μ L Std7 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Std7 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Sample1 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Sample1 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液
B	10 μ L Std6 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Std6 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Sample2 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Sample2 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液
C	10 μ L Std5 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Std5 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Sample3 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Sample3 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液
D	10 μ L Std4 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Std4 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Sample Dilution Buffer 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Detection Buffer	10 μ L Sample Dilution Buffer 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Detection Buffer
E	10 μ L Std3 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Std3 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液
F	10 μ L Std2 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Std2 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液
G	10 μ L Std1 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Std1 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液
H	10 μ L Sample Dilution Buffer 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液	10 μ L Sample Dilution Buffer 5 μ L Donor 工作液 5 μ L Acceptor 工作液

图 3. 微孔板设计参考



4. 读数

用酶标仪 TR-FRET 模块读取 665 nm/620 nm 信号。

5. 计算 Ratio

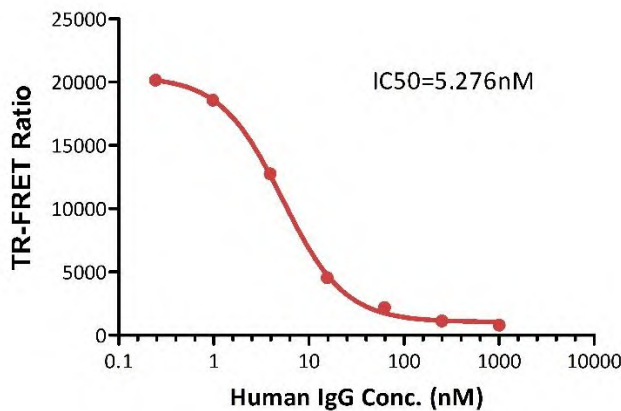
参考公式 $\text{Ratio} = \frac{\text{Signal } 665 \text{ nm}}{\text{Signal } 620 \text{ nm}} \times 10^4$ 计算 Ratio。

【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用，不能用于治疗 and 诊断。
2. 请严格按使用说明进行操作。
3. 不同批号的试剂不能混用。不可与其他厂家试剂混用。
4. 使用前各组份需平衡至室温，保证溶液晶体全部溶解。请在无尘洁净的环境下进行操作使用。
5. 试剂盒请在 2-8°C 保存，请勿使用超过有效期的试剂盒。
6. 请根据实验需要配制各组份工作液，工作液即配即用，不可保存。

【典型数据】

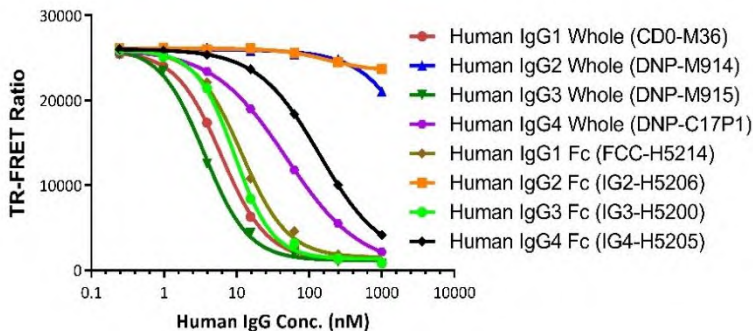
每次实验，每块酶标板都需要设置标准曲线，具体 Ratio 值可能因不同实验室、实验员或设备而不同，不同型号酶标仪不同增益下检测荧光信号具体数值不同，具体应根据设备调整参数，如果信号过强，可以调低仪器的增益，建议参阅酶标仪用户手册中的说明。以下示例数据来源于 BMG Labtech Clariostar Plus 酶标仪，结果仅供参考。



Human IgG standard Conc.	Human IgG standard Conc.	Signal 665 nm	Signal 620 nm	Ratio
150 µg/mL	1000 nM	1935	24398	793
37.5 µg/mL	250 nM	2819	24758	1139
9.375 µg/mL	62.5 nM	5371	24461	2196
2.344 µg/mL	15.625 nM	10816	23776	4549
0.586 µg/mL	3.906 nM	27800	21796	12755
0.146 µg/mL	0.977 nM	36700	19756	18577
0.037 µg/mL	0.244 nM	39438	19572	20150
0 µg/mL	0 nM	39462	19237	20514

【检测不同抗体亚型】

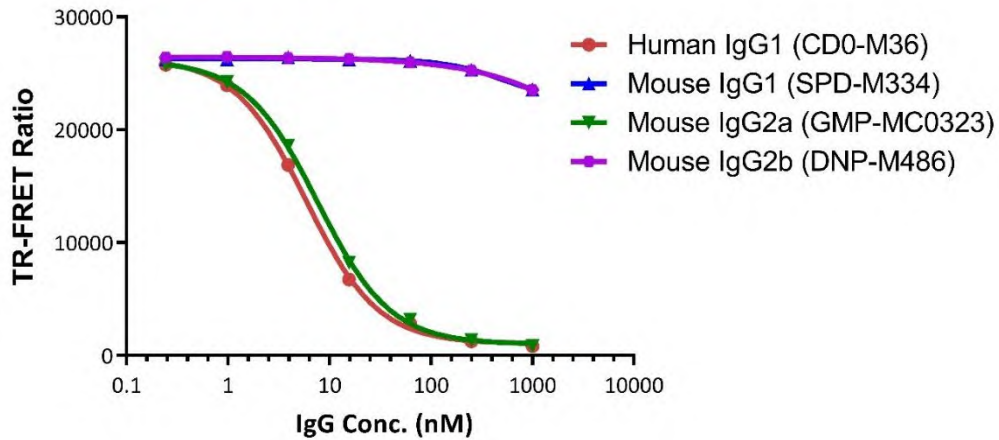
使用本试剂盒分别检测了不同亚型的人 IgG 全抗和 Fc 片段与人 CD64 的结合活性，包括 human IgG1、human IgG2、human IgG3 及 human IgG4，结果如下图，人 CD64 与人 IgG1、IgG3、IgG4 亲和力为 nM 水平，而与人 IgG2 不结合。



Antibody	IC50 (nM)
Human IgG1 Whole (CD0-M36)	6.183
Human IgG2 Whole (DNP-M914)	No Binding
Human IgG3 Whole (DNP-M915)	3.598
Human IgG4 Whole (DNP-C17P1)	48.83
Human IgG1 Fc fragment (FCC-H5214)	11.74
Human IgG2 Fc fragment (IG2-H5206)	No Binding
Human IgG3 Fc fragment (IG3-H5200)	9.353
Human IgG4 Fc fragment (IG4-H5205)	139.4

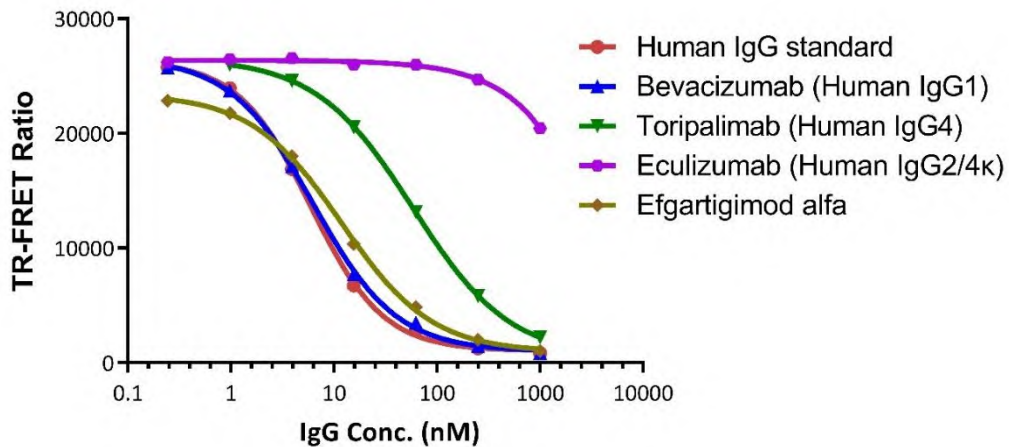
【种属交叉】

使用本试剂盒分别检测了不同亚型的小鼠 IgG 与人 CD64 的结合活性，包括 mouse IgG1、mouse IgG2a、mouse IgG2b，结果如下图，人 CD64 与小鼠 IgG2a 结合活性高，不与小鼠 IgG1 和 IgG2b 结合。



【FDA 批准的抗体药物检测应用】

使用本试剂盒检测了 4 种经 FDA 批准的抗体药物与人 CD64 结合活性。贝伐珠单抗、特瑞普利单抗和艾加莫德与人 CD64 结合为 nM 水平，依库珠单抗的 Fc 被改造设计，其铰链区为 Human IgG2 的铰链区，CH2-CH3 区为 Human IgG4 的 CH2-CH3 区，其与人 CD64 不结合。



【基质效应】

向稀释的缓冲液中加入不同水平的 DEME、RPMI1640、FBS 和 HSA 来验证潜在的基质效应。

