

人Fc gamma RIIIA / CD16a (V176)结合试剂盒 (TR-FRET)

【产品名称】

人Fc gamma RIIIA / CD16a (V176)结合试剂盒 (TR-FRET)

【规格】

100 Tests & 500 Tests

【货号】

FRT-07

【应用】

该试剂盒用于抗体候选药物的ADCC功能性评价，以及对人CD16a (V176)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CD16a (V176)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 RIIIb (CD16b) 组成。

Fc γ RIIIa (CD16a) 是一种具有短C-端细胞质尾的跨膜受体，胞膜外区含有2个免疫球蛋白结构域，与IgG的结合是低亲和力的，可与人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4相互作用，但与人IgG1和IgG3的亲和力比和人IgG2和IgG4的亲和力高。Fc γ RIIIa (CD16a) 主要在巨噬细胞、肥大细胞和NK细胞上表达。Fc γ RIIIa (CD16a) 通过与IgG的Fc段结合，可以触发各种效应功能，如吞噬、脱颗粒和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。

人Fc gamma RIIIA / CD16a (V176)结合试剂盒 (TR-FRET) 采用TR-FRET技术 (时间分辨荧光共振能量转移) 技术，铈螯合物标记的人Fc gamma RIIIA / CD16a (V176) (供体) 和FA标记的人IgG1抗体 (受体) 在均相体系中结合，可用于抗体候选药物的ADCC功能性评价，在0.5-1小时

内高通量筛选人CD16a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 gamma RIIIA / CD16a (V176)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：

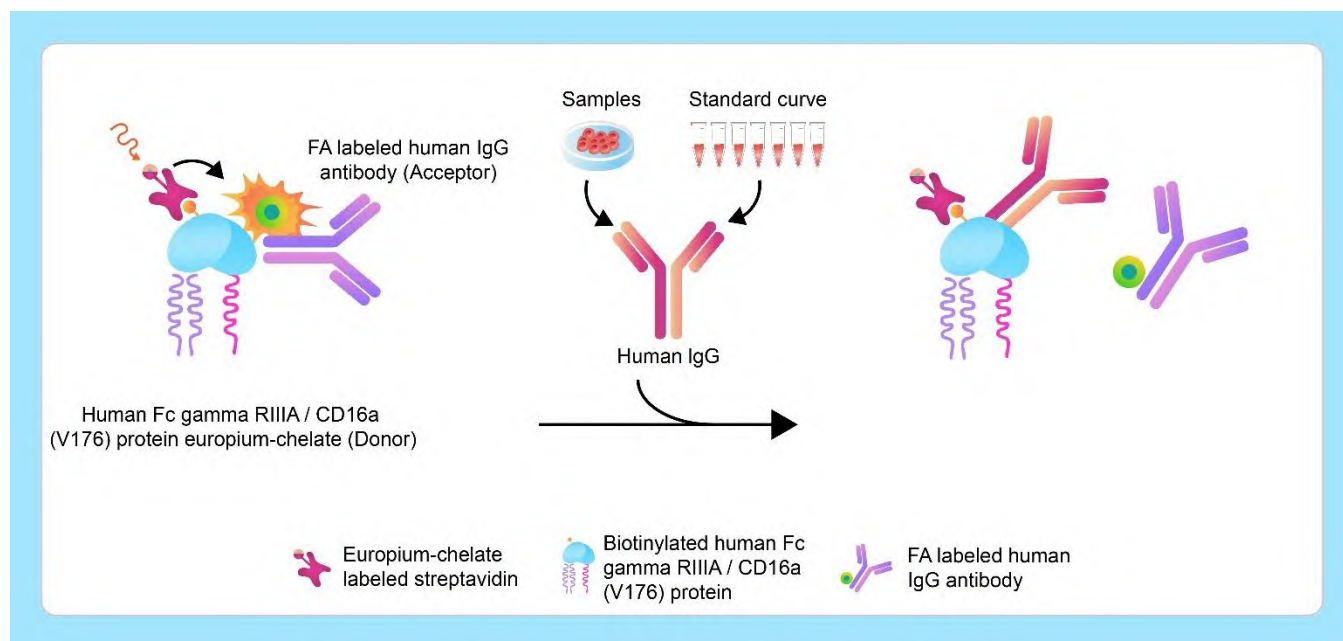
- 1) 先将样本与Donor混合，室温孵育0.5小时；
- 2) 再加入FA标记Human IgG1（Acceptor），室温孵育0.5小时；
- 3) 使用酶标仪TR-FRET模块读取665 nm和620 nm的荧光信号。

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 RIIIA / CD16a (V176)结合的组分，钨螯合物偶联的人Fc gamma RIIIA / CD16a (V176)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 RIIIA / CD16a (V176)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

组份货号	组份名称	规格 (100Tests)	规格 (500Tests)	物理状态	存储条件	
					未开启	已开启
FRT07-C01	Human Fc gamma RIIIA / CD16a (V176) Protein Europium-chelate	100 tests	500 tests	干粉	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
FRT07-C02	FA Labeled Human IgG Antibody	100 tests	500 tests	干粉	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
FRT07-C03	Human IgG Standard	400 µg	2 mg	干粉	2-8°C	-70°C
FRT07-C04	Sample Dilution Buffer	10 mL	10 mL	液体	2-8°C	2-8°C
FRT07-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，有效期见外包装箱标签。
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 RIIIA / CD16a (V176) Protein Europium-chelate与FA labeled human IgG antibody存储液应避光保存。

表2. 配制方法

组份货号	组份名称	规格 (100Tests)		规格 (500Tests)		存储液浓度
		总量	重构水体积	总量	重构水体积	
FRT07-C01	Human Fc gamma RIIIA / CD16a (V176) Protein	100 tests	60 µL	500 tests	300 µL	/
FRT07-C02	FA Labeled Human IgG Antibody	100 tests	60 µL	500 tests	300 µL	/
FRT07-C03	Human IgG standard	400 µg	200 µL	2 mg	1000 µL	2000 µg/mL

【检测流程】

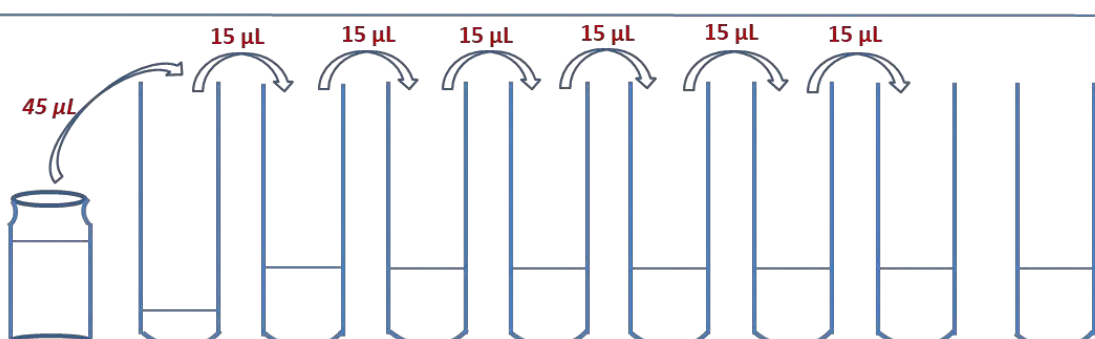
1. 加样

1.1 根据实验需要对样本进行系列稀释。

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 μL 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		15 μL	15 μL	15 μL	15 μL	15 μL	15 μL	15 μL	
Solution Conc.	2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	375 $\mu\text{g}/\text{mL}$	93.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$	23.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Dilution Buffer Vol.		15 μL	45 μL	45 μL	45 μL	45 μL	45 μL	45 μL	45 μL

2. 加 Donor

用 Detection Buffer 将 Human Fc gamma RIIIA / CD16a (V176) Protein Europium-chelate 存储液稀释 10 倍，配制为 Donor 工作液，该工作液现用现配。每孔加入 5 μL 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

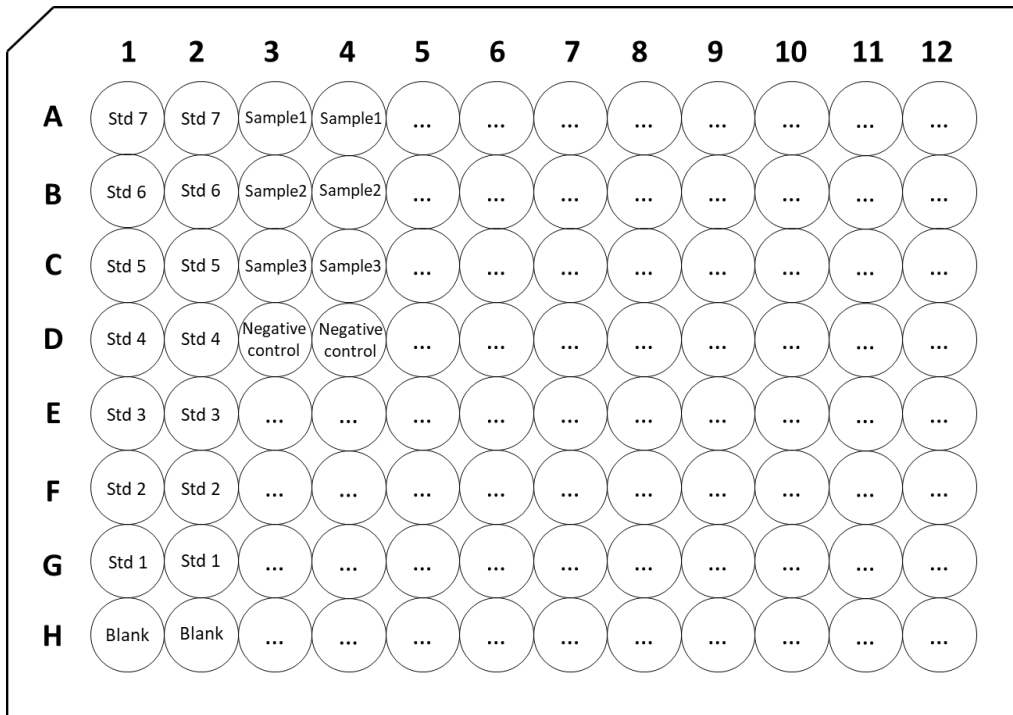
用 Detection Buffer 将 FA labeled human IgG antibody 存储液稀释 10 倍，配制为 Acceptor 工作液，该工作液现用现配，避光保存。每孔加入 5 μL Acceptor 工作液，用封板膜将微孔板封好，在室温（20°C-25°C）震荡（400-600 rpm）孵育反应 30 分钟。

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

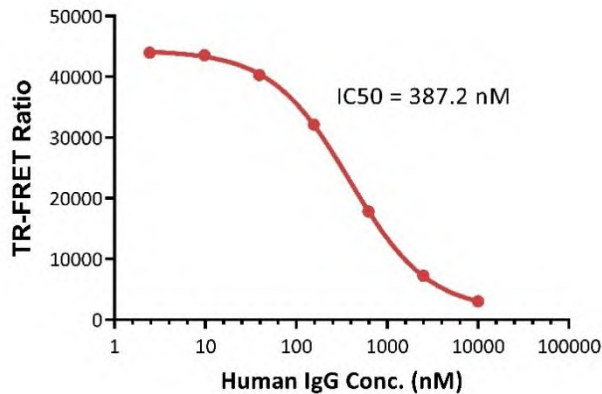
参考公式 $\text{Ratio} = \frac{\text{Signal } 665 \text{ nm}}{\text{Signal } 620 \text{ nm}} \times 10^4$ 计算 Ratio。

【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】

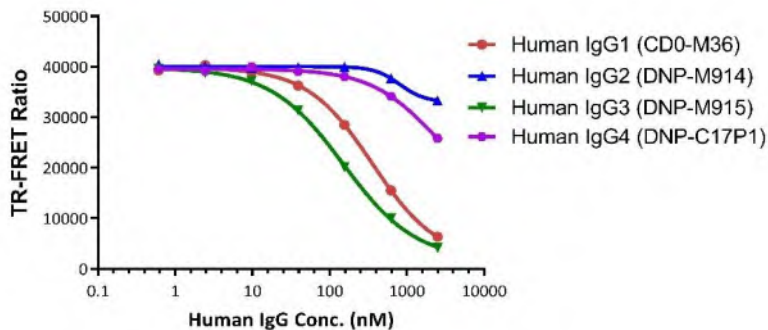
每次实验，每块酶标板都需要设置标准曲线，具体 Ratio 值可能因不同实验室、实验员或设备而不同，不同型号酶标仪不同增益下检测荧光信号具体数值不同，具体应根据设备调整参数，如果信号过强，可以调低仪器的增益，建议参阅酶标仪用户手册中的说明。以下示例数据来源于 BMG Labtech CLARIOstar Plus 酶标仪，结果仅供参考。



Human IgG standard Conc.	Human IgG standard Conc.	Signal 665 nm	Signal 620 nm	Ratio
1500 µg/mL	10000 nM	11178	36974	3023
375 µg/mL	2500 nM	24235	33481	7238
93.75 µg/mL	625 nM	50886	28593	17797
23.44 µg/mL	156.25 nM	74989	23318	32159
5.86 µg/mL	39.06 nM	91986	22827	40297
1.46 µg/mL	9.77 nM	92060	21137	43554
0.37 µg/mL	2.44 nM	91896	20889	43993
0 µg/mL	0 nM	91696	20301	45168

【检测不同抗体亚型】

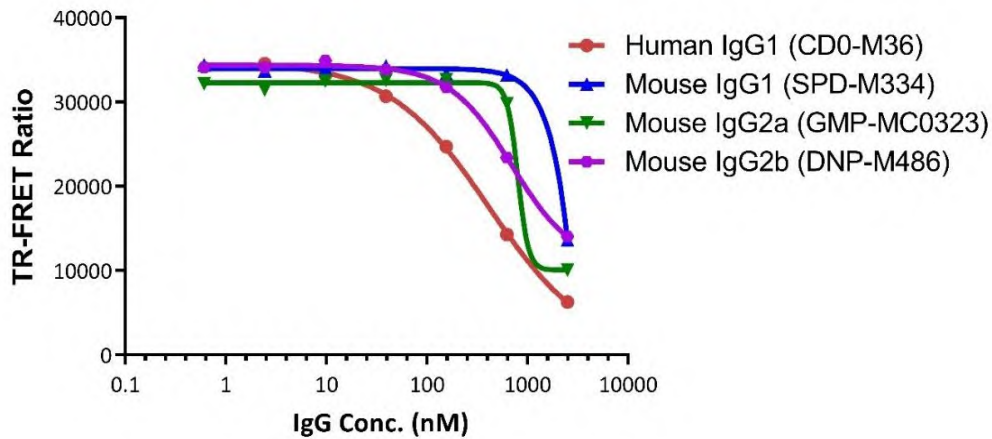
使用本试剂盒分别检测了不同亚型的人 IgG 与人 CD16a (V176) 的结合活性，包括 human IgG1、human IgG2、human IgG3 及 human IgG4，并得到了不同的 IC50。结果如下图，人 CD16a (V176) 与人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 结合的亲和力较低，其中与 IgG1 和 IgG3 的亲和力高于 IgG2 和 IgG4。



Antibody	IC50 (nM)
Human IgG1 Whole (CD0-M36)	358.6
Human IgG2 Whole (DNP-M914)	812.9
Human IgG3 Whole (DNP-M915)	150.5
Human IgG4 Whole (DNP-C17P1)	2266

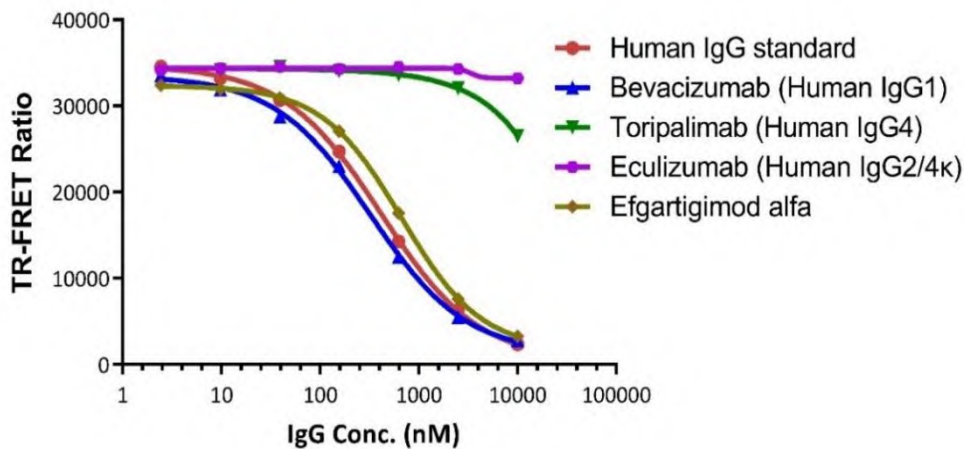
【种属交叉】

使用本试剂盒分别检测了不同亚型的小鼠 IgG 与人 CD16a (V176) 的结合活性，结果如下图，人 CD16a (V176) 与小鼠 IgG1、小鼠 IgG2a 和小鼠 IgG2b 等抗体结合很弱甚至不结合。



【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 CD16a (V176) 结合活性。贝伐珠单抗和艾加莫德与人 CD16a (V176) 结合为 300 nM 到 700 nM 水平，特瑞普利单抗和 CD16a 不结合，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 CD16a (V176) 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。

