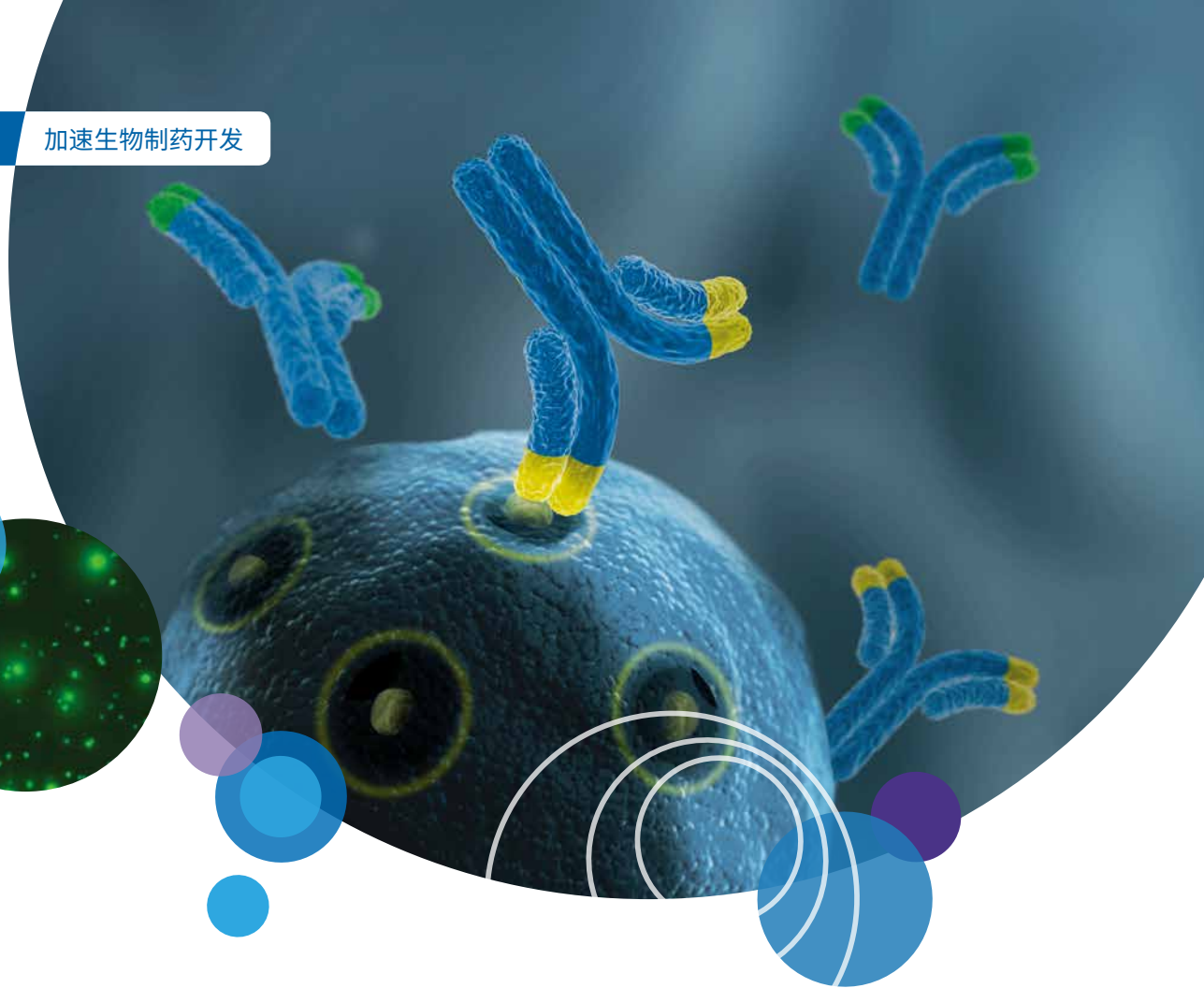


加速生物制药开发



加强单抗研究 抢占发展先机

成熟的抗体开发解决方案，从靶标验证到扩增放大

简介	2
靶标验证	3
靶点筛选	4
高通量细胞筛选	6
质控用于放大培养	14
抗体开发解决方案	16

简介

单克隆抗体(mAbs)作为潜在的治疗药物，持续受到广泛关注和期待。随着抗体偶联药物(antibody-drug conjugate)和双特异性抗体产品陆续进入市场，单克隆抗体的应用仍然是治疗发展的关键部分。虽然在抗体开发和放大过程中的一些关键步骤依然是一个重要挑战，但是高质量的单克隆抗体工程细胞株的获取已触手可及。我们的系列产品方案采用专属技术设计来缩短稳定细胞株的开发时间，并获得稳定的高亲和力和高表达水平的细胞克隆，以加速您的抗体开发。

为您提供全面的，经过行业证明的完整解决方案，加速您的研究、缩短上市时间，您值得拥有！

我们提供了完整的解决方案，以解决抗体发现研究的所有阶段——从目标验证、筛选和克隆选择到特征性检测和规模放大。我们的全面的产品组合旨

在优化您的生产力，使得安全有效的治疗方法更快地推向市场。Molecular Devices公司作为你的合作伙伴，将为您提供专业的技术方案和支持，帮助您快速优化方案提升效率，加速您的研究、缩短上市时间。

- 全自动高表达细胞株筛选和挑取
- 新型抗体内化和结合分析检测
- 便捷的表达检测分析
- 单克隆性的客观验证
- 具有数十年经验的领先供应商

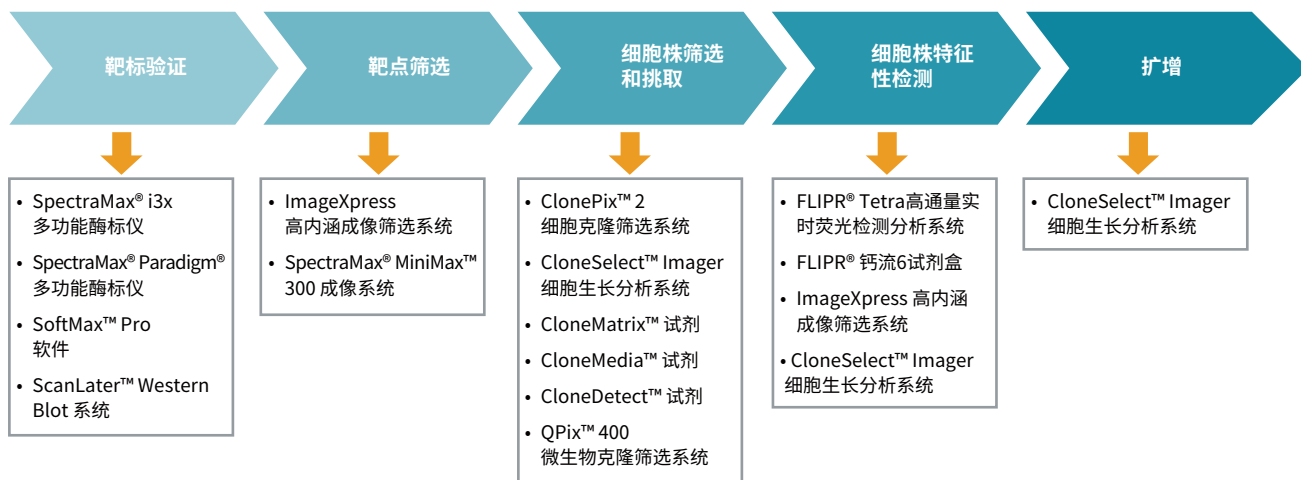


图1: Molecular Devices公司应用于单克隆抗体靶标验证、筛选、特征性检测和扩增等阶段的仪器、软件和试剂方案。

靶标验证

Molecular Devices检测平台推出了在抗体开发中验证靶标的重要工具，将蛋白表达测定带向新的水平并扩大了western blot的检测能力。

利用细胞成像系统测定蛋白Marker表达

监测细胞增殖和蛋白表达对许多靶标验证实验而言是最基础的，但传统方法需要繁琐的标记。带有MiniMax 300细胞成像计数仪的SpectraMax i3x让您无需使用有害染料即可进行细胞计数。只要经GFP转染，SoftMax Pro软件中的自动分析工具便可对转染细胞数量和非转染细胞数量进行统计。并且，带有MiniMax 300细胞成像系统可选功能的SpectraMax i3x提供了可视化和大量信息，数据丰富程度远远高于单一的每个孔的荧光强度。检测到的荧光区域定位于表达感兴趣标记的细胞当中，通过SoftMax Pro软件可轻松描绘出剂量应答曲线并确定IC₅₀。

改进后的Western Blot检测

为了改善传统western blots蛋白定量和扩大工作流程的灵活性，驱动我们开发出了ScanLater Western Blot系统。SpectraMax i3x和SpectraMax Paradigm多功能微孔板读板机使用钇元素二抗可使条带保存30天以上。这些条带非常稳定，可被分割甚至重新标记额外的抗体。通过与Softmax Pro软件的整合，我们可以在读数完成后直接进行定量。

资源

- 下载资料:
DAPI 染色的替代方案：成像和活细胞计数
- 下载资料:
在SpectraMax i3多功能检测平台上进行GFP转染优化
- 下载资料:
无荧光染料的非标记细胞成像分析技术

- 轻松测定每个细胞或每个孔的marker表达水平
- 使用读板机提高western blots蛋白定量效果
- 适合多种多样的应用需要：荧光检测或StainFree™技术

- 下载资料:
使用微孔读板机的细胞成像系统检测标签蛋白的表达
- 下载资料:
如何利用ScanLater免疫蛋白印迹技术对未知蛋白进行定性分析和定量检测

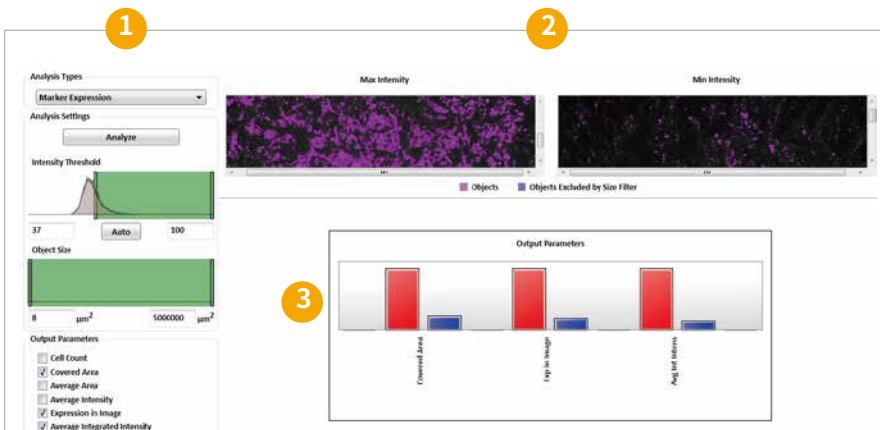


图 2：读板前测试阳性和阴性样品的分析参数。SoftMax Pro软件界面有许多可视化部分以帮助创建优化的图像分割参数：1：调节背景强度和物体大小阈值来识别荧光细胞。2：通过软件标记查看阳性和阴性孔的细胞分割结果以检验是否需要进一步调整。3：选择可以体现阳性和阴性细胞两者差异的数据输出到柱状图中。Marker表达实验模板用于识别标记了荧光素偶联抗VCAM抗体的细胞区域。VCAM-1的存在表明具有阳性炎症反应。

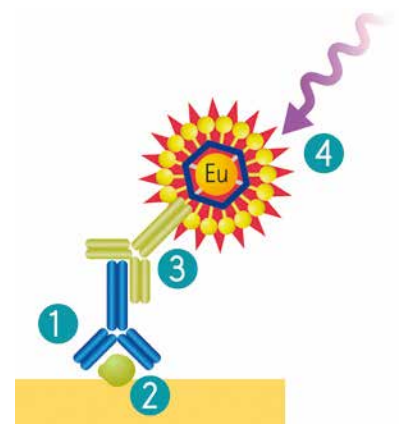


图 3：ScanLater Western Blot系统工作流程。使用已有一抗(1)结合感兴趣蛋白(2)标记ScanLater二抗(3)结合一抗。通过ScanLater TRF Western Blot检测卡盒检测(4)。

靶点筛选

高通量成像为研究抗体结合提供了一个很好的方法。抗体研发可以通过传统的ELISA法和基于荧光微孔分析技术 (fluorometric microvolume assay technology, FMAT) 的方法。ImageXpress Micro高内涵成像分析系统能使您在一块板子中同时对多种不同细胞进行抗体检测，更快速的筛选出高表达细胞系。

ELISA是采用将表位变性后检测的方法，筛选出的抗体对变性前抗原构想的结合有可能是低亲和力的。利用ImageXpress® Micro宽场高内涵分析系统进行操作的单抗结合检测方法可以让科学家们在同一个平板孔中检测多种不同细胞的表面抗体结合情况。这一系统也可以将检测规模提升到1536孔板，并且只需要2-3微升的样本。即使用更低的二抗浓度，其检测范围和灵敏度也不会下降，甚至有所提高。

应用成像法检测细胞个数及细胞形态

细胞标记ATP或细胞活性染料后可用酶标仪读取荧光或化学发光值的方法来间接评价细胞个数。然而这种方法可得到细胞个数的近似值，但是无法提供可视化结果如细胞均一性，细胞大小及形态变化等。SpectraMax® MiniMax™300细胞成像计数仪灵敏度是普通酶标仪的100倍，每孔的检测下限可达一个细胞。

专利的StainFree™细胞检测算法可以在SpectraMax® MiniMax™300细胞成像计数仪中计算得到细胞个数及细胞融合度，并且避免了染色对细胞的伤害，节约了宝贵的科研时间和经费。

- 多种杂交瘤细胞同时检测
- 检测通道设置多样且灵活
- 无需清洗的检测方法可以增加特异性，减少操作时间
- 应用范围广，可用于贴壁细胞，悬浮细胞及免疫磁珠
- 高敏感度可检测低丰度抗原

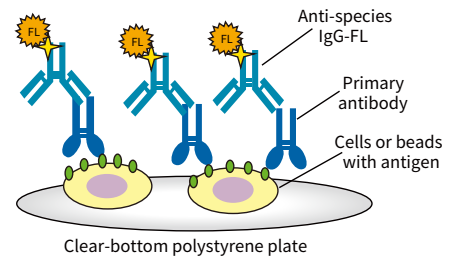


图4 单抗结合检测。 悬浮细胞或抗体包被磁珠样本加入到96,384,1536孔板中。然后加入一抗(目标抗体)，接着用二抗对一抗进行标记来检测一抗的结合情况。

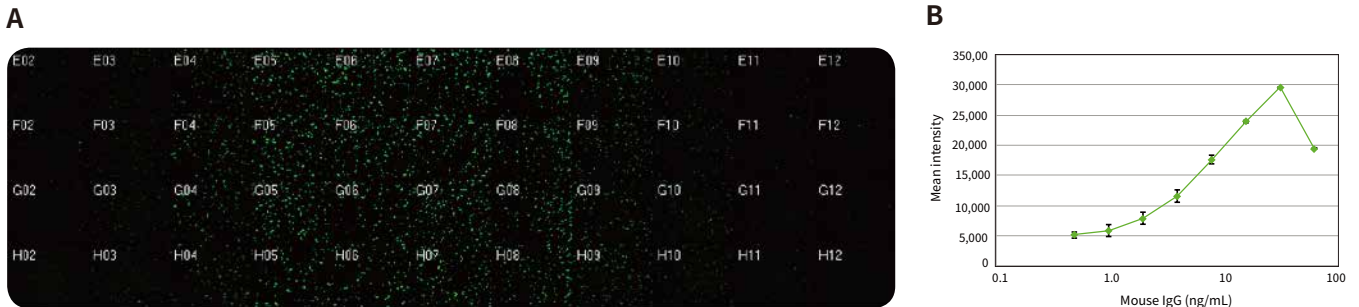


图5 免疫磁珠的一抗结合检测。 (A) 12.7微米包被羊抗小鼠抗体的磁珠被结合到不同浓度的小鼠IgG抗体上，并加到微孔板中，在孔板中与标记AlexaFluor488的二抗室温下共孵育1-2个小时，实验设四个复孔及同型抗体对照孔。图像为10X PlanFluor物镜拍摄，孔板的缩略图清晰的显示出抗体结合的浓度梯度。(B) 应用MetaXpress®高内涵图像采集和分析软件分析结果：LLD为0.5 ng/mL (30 pg/well)，在1-31ng/mL之间呈线性关系。

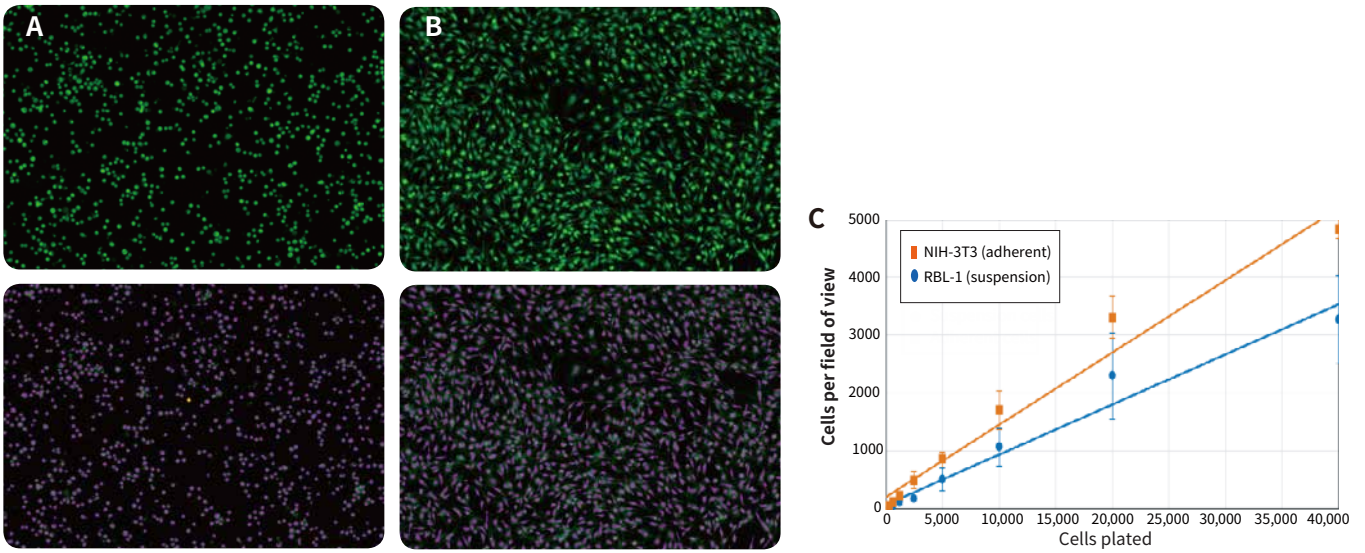


图6 A, 左: 悬浮细胞 (RBL-1 白血病细胞) 核标记荧光后成像。紫色标记为识别到并计数的细胞。A,右: 贴壁细胞 (NIH-3T3成纤维细胞) 具有不同的细胞形态, MiniMax细胞成像计数仪软件可准确讲所有细胞识别到, 并计数。B: 悬浮和贴壁细胞都可倍准确计数, 细胞数跨越4个数量级, 线性 $R^2>0.96$ 。

资源

- 下载资料:

[应用成像法检测细胞个数及细胞形态](#)

高通量细胞筛选

不要错过优质细胞克隆。利用ClonePix系统自动筛选和挑取出高产细胞株，然后用CloneSelect Imager系统挑出快速生长的单克隆细胞株。

ClonePix系统和CloneSelect Imager系统是筛选稀有高产细胞株流程中的重要组成部分(图7)。利用CloneMedia半固体培养基试剂，以及ClonePix和CloneSelect Imager，可确保杂交瘤细胞和重组细胞株，如CHO、HEK以及其他细胞，形成分离的细胞克隆。一旦克隆形成，ClonePix系统可以对上千个克隆进行排序并挑选出高产细胞。接着，CloneSelect Imager系统可用于校正产量、评估汇合度以及验证单克隆性，从而挑出源自单个细胞的最佳克隆。

- 加快筛选优质细胞株
- 发现稀有的高产细胞株
- 快速验证单克隆性
- 客观分析细胞汇合度
- 适于贴壁细胞和悬浮细胞

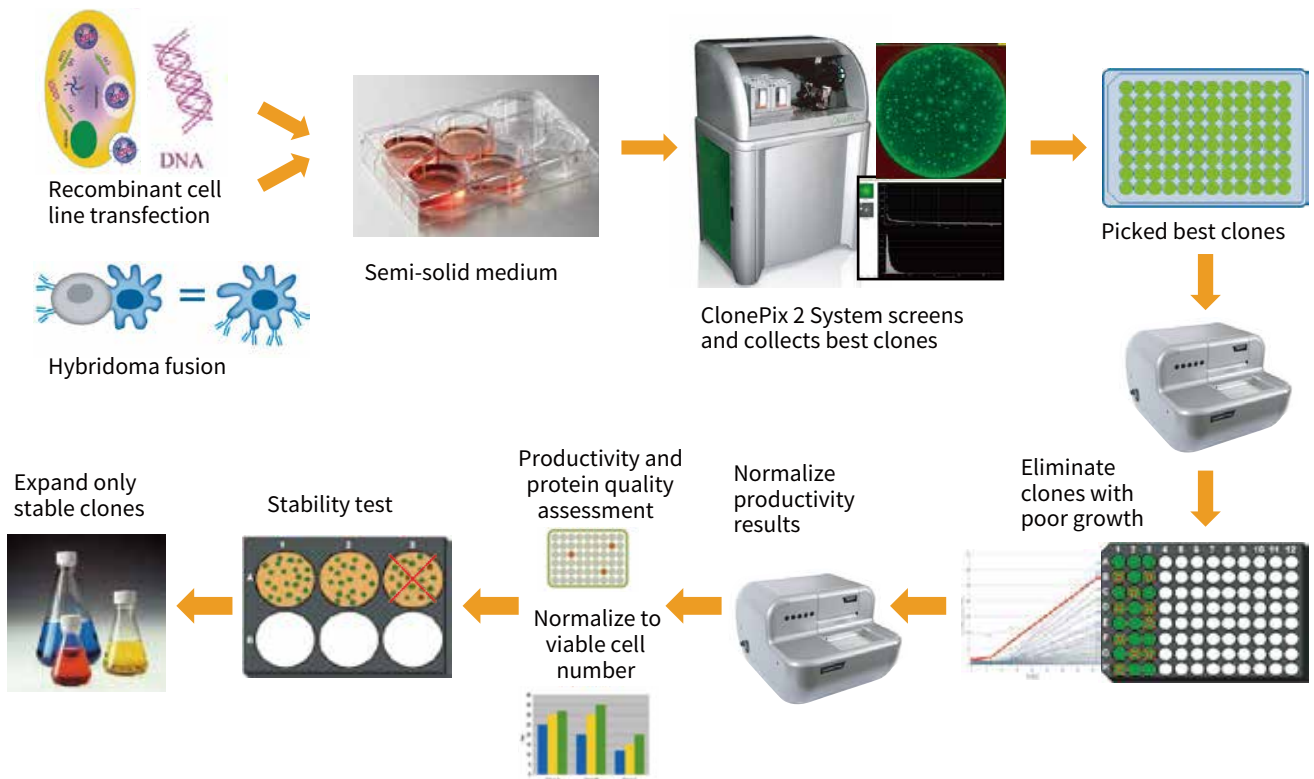


图7：抗体发现流程中的ClonePix系统和CloneSelect Imager系统。

ClonePix技术加速抗体发现

ClonePix系统的原理很简单，但效果却是显著的。将哺乳动物细胞接种至半固体培养基，待克隆形成，ClonePix系统利用专利的产量或抗原特异性检测方法筛选和挑取最优的细胞克隆。

CloneMedia试剂可以确保高概率的单克隆性，同时维持高度的克隆异质性，从而容易分离出稀有的高表达克隆。此外，细胞克隆也更加容易扩增，减少空孔的数量，保证每块板都能筛选96个克隆。

ClonePix系统自动成像(白光和荧光)、并基于一系列参数(如尺寸、圆度、克隆间距以及抗体表达量和特异性)筛选和挑取哺乳动物细胞克隆。

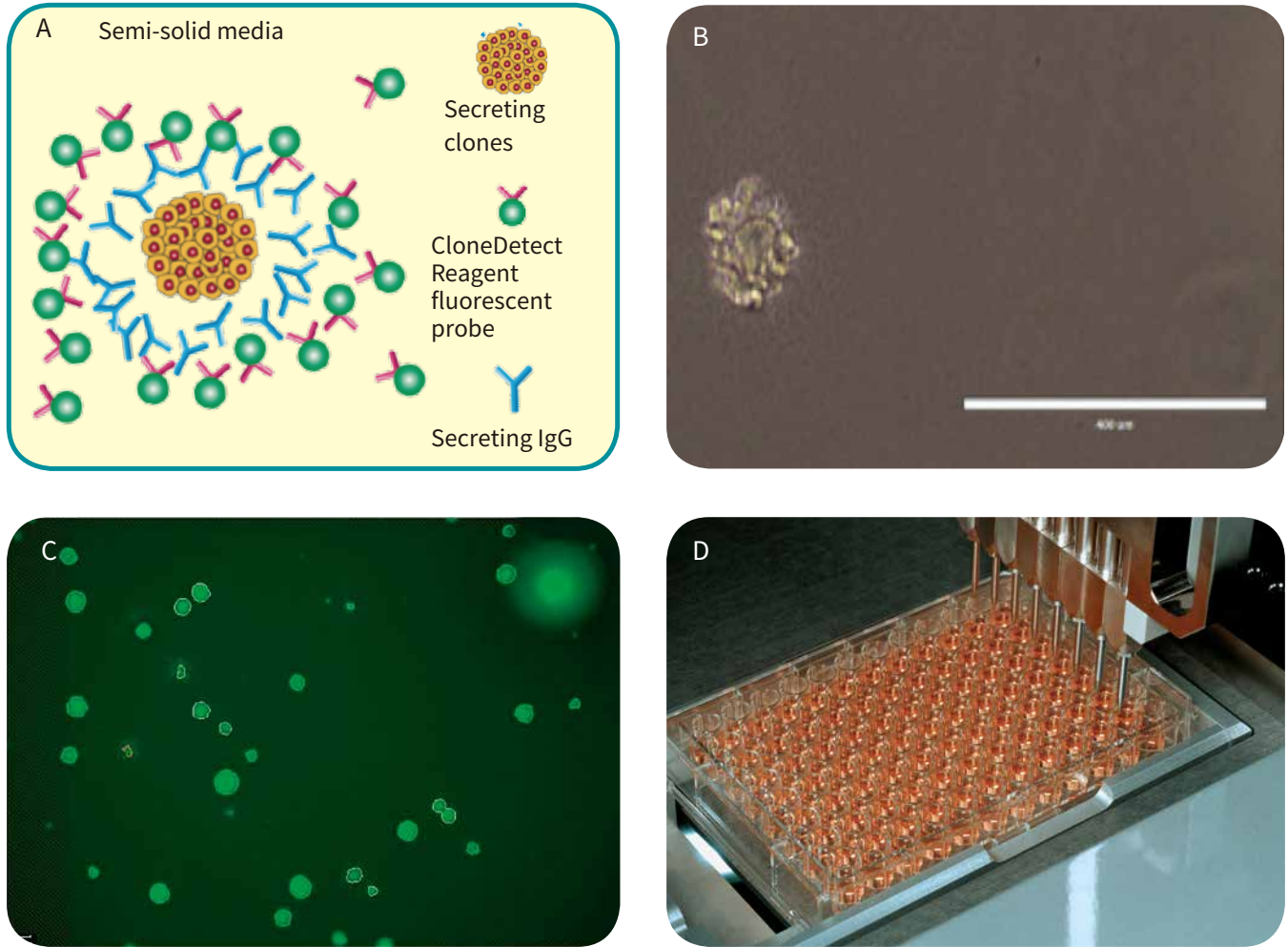


图8: ClonePix技术原理。 (A) 检测在半固体培养基中生长的细胞克隆分泌的蛋白质的原理。(B) 在克隆周边沉淀的蛋白质的白光图像(途中为杂交瘤细胞克隆分泌的抗体)。注意光学澄清度和球形的克隆(对克隆完整性很重要)源自CloneMedia半固体培养基。(C) ClonePix系统检测和筛选目标克隆。(D) 自动挑取克隆后，ClonePix系统将其转移至目标孔板。

快速筛选表达GPCR的细胞株

ClonePix系统提供了一种新方法用于快速评估哺乳动物细胞株的GPCR目标蛋白表达水平。ClonePix可以可靠地检测GPCR细胞克隆的不同表达水平。此外，结果显示荧光强度与GPCR介导的胞浆内钙流变化幅度呈现正相关，这是由于质膜上GPCR蛋白muscarinic receptor M1表达水平差异引起的。

ClonePix系统可以有效地检测和挑取表达GPCR的克隆，然后CloneSelect Imager系统可以筛选出快速生长的细胞克隆。阳性的快速生长的细胞克隆可以提供GPCR蛋白用于后续的抗体开发。

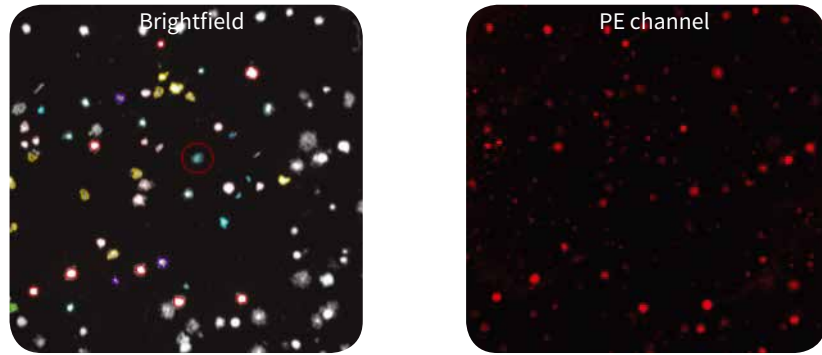


图9: ClonePix系统检测CHO-M1细胞。ClonePix系统揭示CHO-M1细胞株不同的荧光强度，表明其可以区分不同的GPCR M1蛋白的表达水平。软件在白光通道下识别克隆并用圆圈圈出，然后计算克隆的荧光强度。

资源

- 观看网络讲座：
[Identification and selection of GPCR cell lines with the ClonePix 2 System](#). Barbara Robertson, BMS and Alison Glaser, Molecular Devices.
- 下载应用文章：
[ClonePix技术快速筛选和开发高表达GPCR的哺乳细胞系](#)
- 下载介绍：
[FLIPR钙流6检测试剂盒介绍](#)

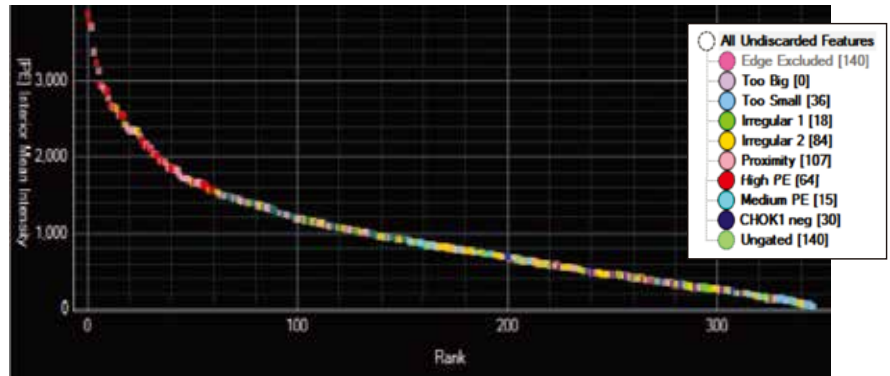


图10: CHO-M1的荧光排序图。基于形态和荧光强度识别并分离克隆。根据克隆尺寸，形状和克隆间距等形态指标筛选可挑取克隆。形态理想的克隆根据内部荧光强度排序，然后分成四个组：高、中、CHO-K1阴性和未分组部分。CHO-K1阴性组根据背景信号强度设定。所有属于该组的克隆都被证实来自对应的阴性对照孔。未分组的克隆信号强度较低但稍高于背景。

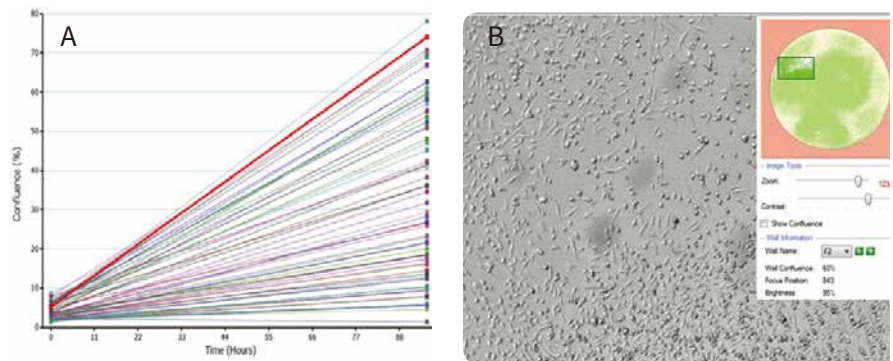


图11: 快速测定细胞汇合度以挑取出快速生长的克隆。ClonePix系统挑取克隆后接种至96孔板，其中加入200 μ l的Ham's F12培养基+10% FBS+G418用于CHO-M1细胞克隆，以及不含G418的相同培养基用于CHO-K1克隆。用CloneSelect Imager成像这些孔板用于确认克隆的转移和生长(A)。细胞培养一周后再次用CloneSelect Imager分析以确认细胞增殖(B)。随后将细胞转移至384孔板，用FLIPR Tetra系统和FLIPR Calcium 6试剂从功能上确认GPCR蛋白表达。

加快病毒特异性杂交瘤细胞的开发

ClonePix系统通过减少人工操作以及提供高灵敏的分泌性克隆检测方法，加快和推动杂交瘤细胞的筛选流程。

ClonePix系统和CloneSelect Imager系统被用于高通量地筛选、挑取和生长评估数百个杂交瘤细胞亚克隆(亲本克隆的历史抗体产量低于1mg/L)。

这个工作流程高效自动化地筛选、拯救和稳定了一株高产杂交瘤细胞株，其生产高度特异性的抗体靶向病毒的抗原。

图12: 按200个细胞/ml的密度将杂交瘤细胞接种至半固体培养基。加入荧光偶联的CloneDetect试剂实现原位检测分泌的IgG抗体。ClonePix系统对克隆进行白光成像(150ms, A)和荧光成像(500ms, B)。FITC信号强度的差异表明杂交瘤细胞不稳定、非单克隆性。基于排序图，单克隆的、高表达的克隆被挑取出来。

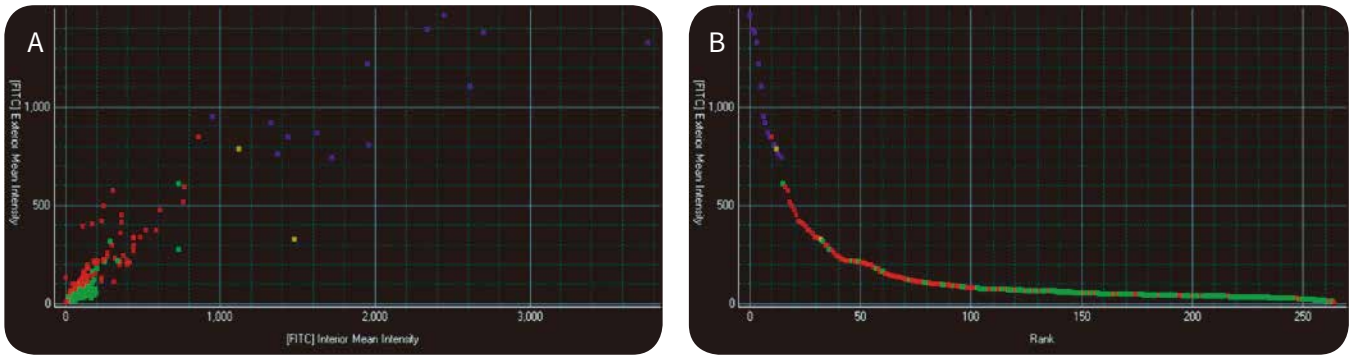
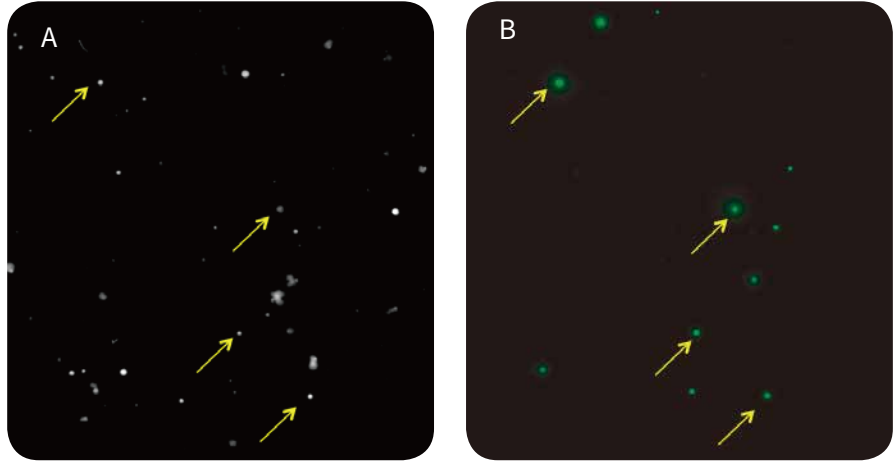


图13: 直观显示亲本杂交瘤细胞株的IgG表达水平。(A) 散点图显示Exterior Mean Intensity和Interior Mean Intensity线性相关，表明抗体分泌正常。抗体产量低源于细胞群体内的异质性，仅有少量杂交瘤细胞分泌抗体，占群体的5-6%，而大部分细胞不分泌抗体。(B) 排序图显示被挑取的细胞克隆(紫色)。

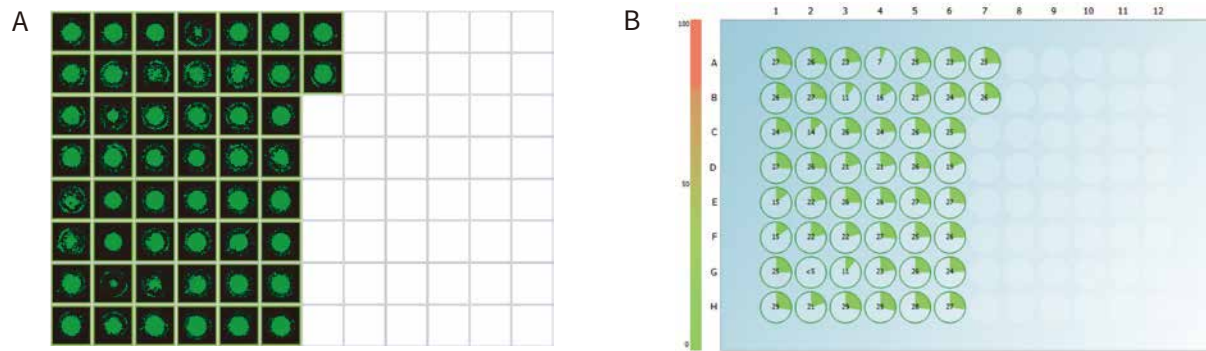


图14: CloneSelect Imager软件分析确定生长状况良好的克隆。图像分析揭示克隆的形态和生长特征(A)和克隆的数量和面积(B)，从而有效地最终克隆生长。

验证单克隆性和稳定的IgG分泌

ClonePix系统可以简单地验证高产克隆的表达水平。在这个例子中，两个亚克隆在扩增后重新按200个细胞/ml的密度接种至CloneMedia半固体培养基中，其中加入CloneDetect。ClonePix软件的可视化和分析表明IgG正常分泌，且群体内的细胞都有均一的分泌因此产量较高。

在新的ds-NDA病毒杂交瘤细胞亚克隆上增加产量

通过利用ClonePix系统，产量较低的亲本克隆被重新筛选从而获得高产、稳定的亚克隆。在这个案例中，经过Protein G柱纯化后测定了总产量。两个新的亚克隆IgG产量有巨大提升(17-25 mg/L)，而亲本克隆的历史产量仅~1mg/L。

资源

- 下载应用文章：
ClonePix结合CloneSelect Imager技术加强开发病毒特异性的杂交瘤细胞
- 观看网络讲座：
The application of the ClonePix and CloneSelect technologies for hybridoma discovery. Jason Goldstein PhD, AbiPointe Biotechnology Webinar.

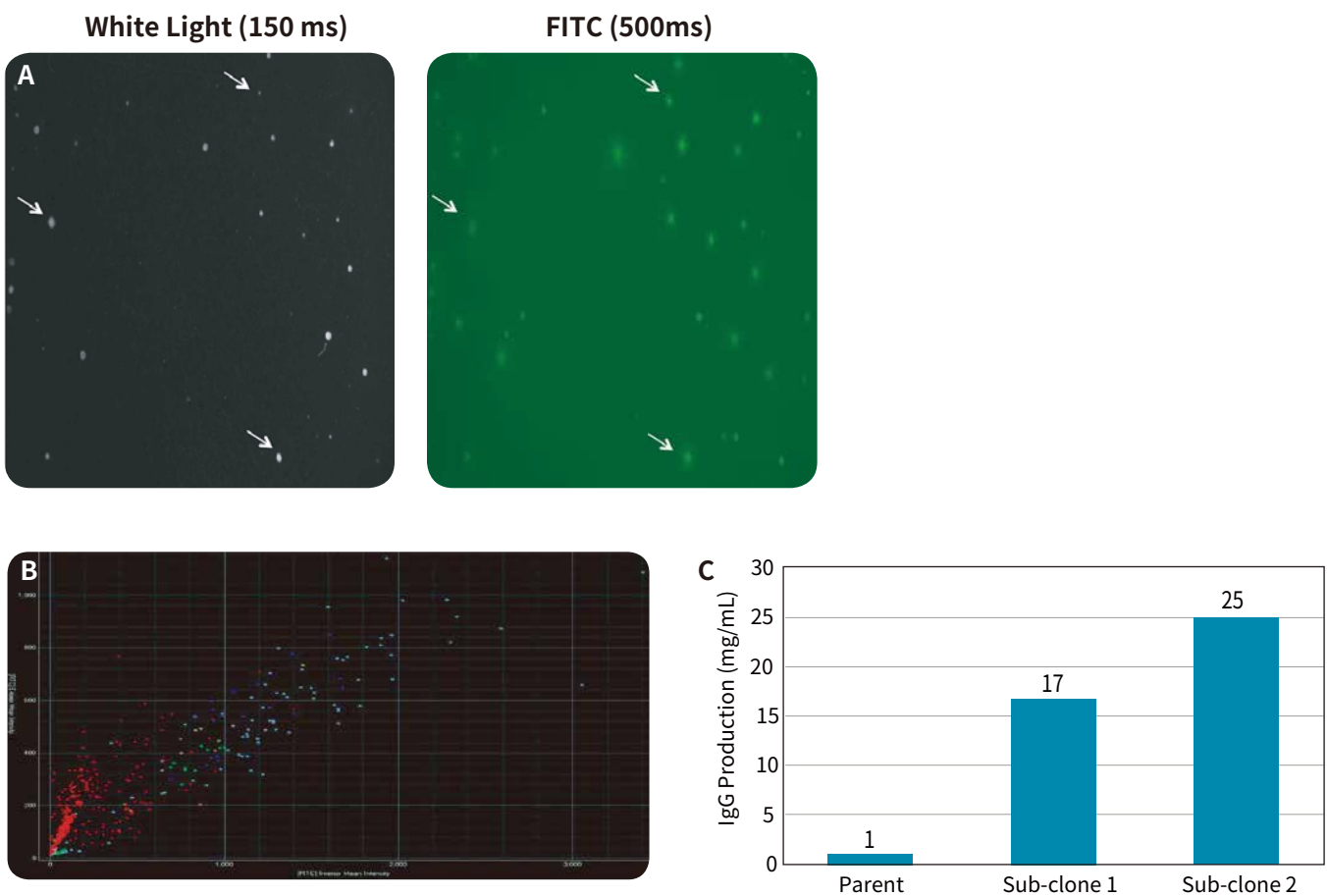


图15: 利用ClonePix系统对亲本杂交瘤细胞亚克隆获得了更高的IgG产量。其中一个亚克隆的结果。(A)亚克隆后FITC阳性克隆的比例相比亲本克隆(参见图12A、B)显著提升。生长第7天通过100 U/ml的CloneDetect检测IgG表达。(B)散点图显示外部平均荧光强度和内部平均荧光强度线性相关，斜率偏向Y轴，表明均一性更好且上象限的克隆为FITC阳性的克隆。(C) ClonePix亚克隆显著增加了抗体产量。

高通量噬菌体展示库筛选

噬菌体展示技术的发展革新了抗体药物发现流程。这一方法常用于筛选高度特异性的治疗性抗体候选用于开发抗肿瘤或抗炎症的治疗方法。

一个典型的噬菌体展示库包含109-1011个序列，这使得利用传统筛选技术发现正确候选物非常困难且耗时。自动化QPix 400系列微生物克隆挑取系统可以在每小时挑取3000个克

隆，基于用户自定义的参数如圆度、轴比、尺寸、克隆间距以及荧光强度筛选克隆。

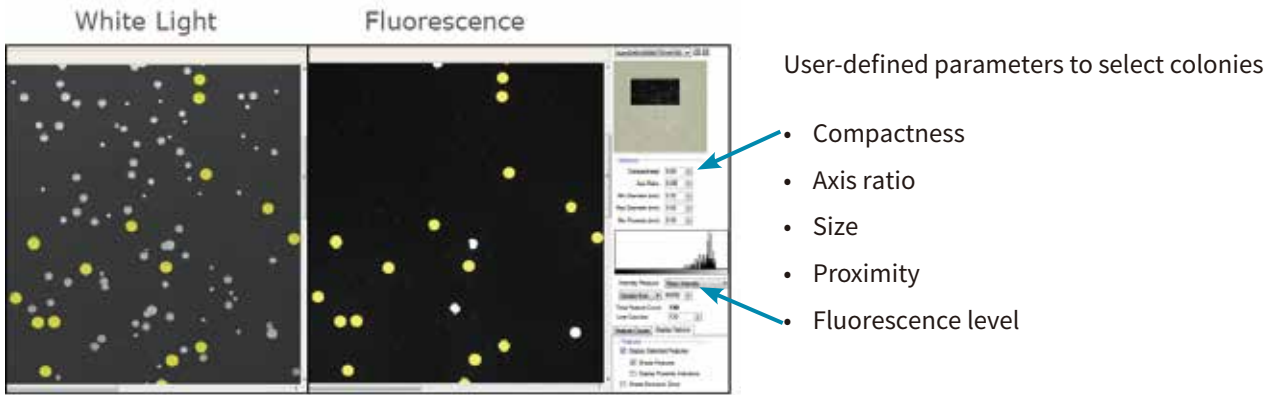


图16: QPix 400系列微生物克隆筛选系统能够同步检测克隆并在挑取前定量检测和筛选荧光标记物。通过用户自定义的参数筛选克隆，如圆度、轴比、尺寸、克隆间距和荧光强度。

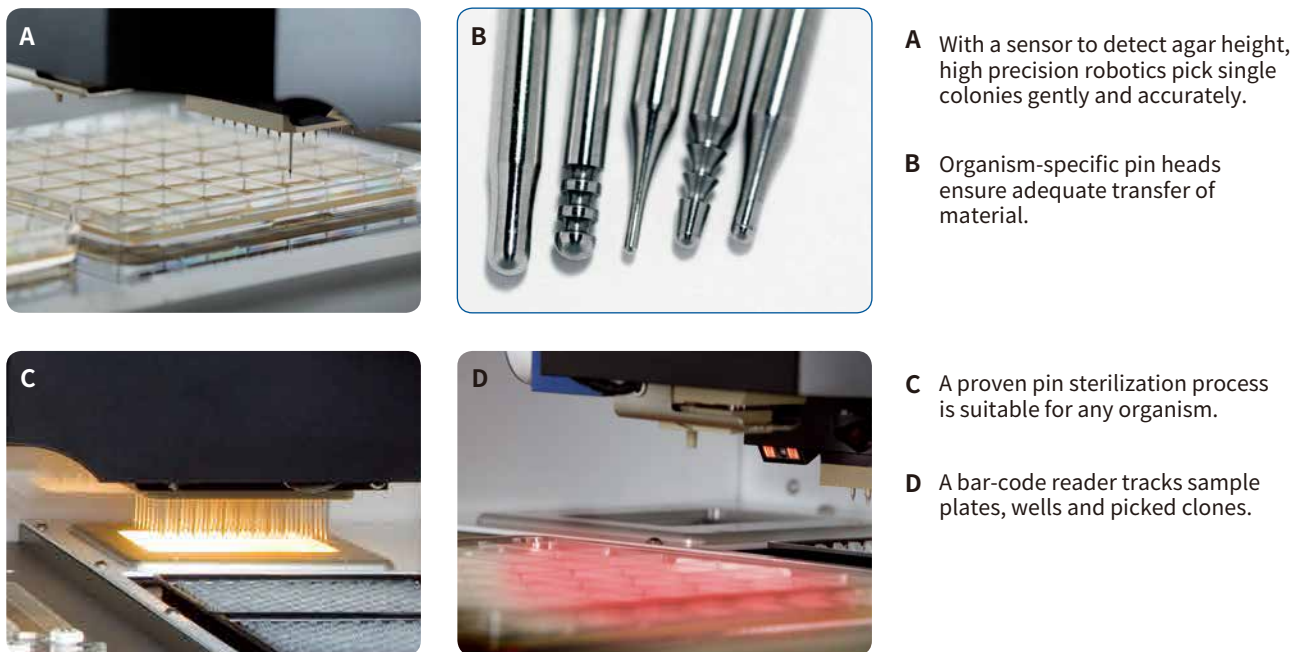


图17: QPix 460微生物克隆筛选系统典型的工作流程。

细胞内定位研究

搞清楚药物抗体如何与抗原连接后内化入细胞，对于肿瘤抗体药物研发具有至关重要的作用。MetaXpress软件的信号转导模块(Transfluor Module)可以准确的量化内化囊泡结构。信号转导模块联合使用用户自定义模块，可以计算共定位程度，可以量化随时间变化积累在细胞内囊泡中的荧光强度变化。

利用FLIPR系统和FLIPR Calcium 6试剂盒功能性验证CHO-K1和CHO-M1克隆

用PE偶联的抗M1抗体评估新传代和旧传代的CHO-M1细胞上G-蛋白偶联受体的表达水平。预期旧传代细胞上的M1表达水平显著低于新传代的细胞。亲本CHO-K1细胞作为阴性对照纳入研究。

配体激活GPCR后，受体构象变化激活胞内的G蛋白。活化的G蛋白能够诱导一系列胞内信使，包括钙离子。

利用FLIPR Tetra系统评估不同组别细胞的功能活性。FLIPR Calcium 6试剂盒用于评估胞浆内钙流的变化，40 nm的carbachol用于激活GPCR。基于历史的激动剂浓度响应曲线，经验判断40 nm carbachol是个 EC_{80} 的浓度。

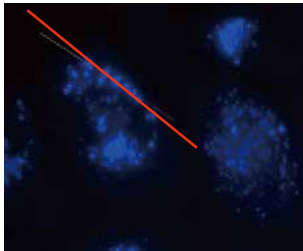
因为每个组的细胞接种在不同的384孔板上(除了混在一起的中荧光组和低荧光组)，基线荧光强度的变化根据背景荧光强度做均一化处理。

结果表明GPCR的表达水平和功能活性呈正相关。CHO-K1阴性对照无钙流信号，进一步证明ClonePix系统可以区分出表达和不表达M1的细胞克隆。

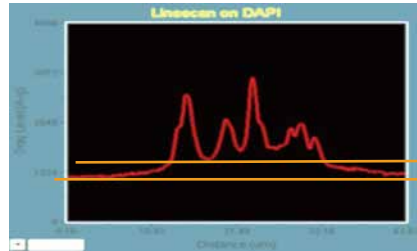
ClonePix系统和CloneSelect Imager系统被用于高通量地筛选、挑取和生长评估数百个杂交瘤细胞亚克隆(亲本克隆的历史抗体产量低于1mg/L)。

这个工作流程高效自动化地筛选、拯救和稳定了一株高产杂交瘤细胞株，其生产高度特异性的抗体靶向病毒的抗原。

囊泡荧光强度剖面：背景荧光高



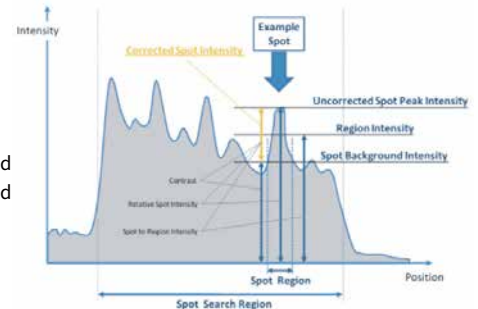
蓝色溶酶体指示剂 (pH敏感的溶酶体染料)



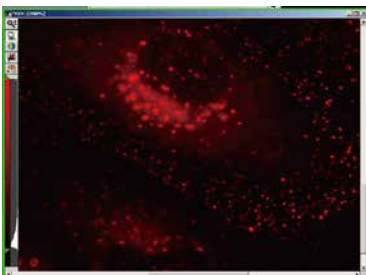
图中红线为作图中红线处样品的荧光强度

Local Background
Background

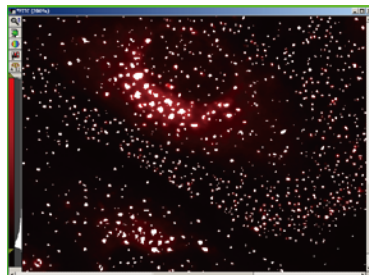
囊泡：可以计算哪些参数



HUVEC细胞转染BacMam，表达EEA1-RFP红色荧光



Image



Image+Mask

应用MX软件信号转导模块的自适应背景扣除功能可计算得到：

1. 囊泡总荧光强度
2. 囊泡平均荧光强度
3. 囊泡面积

图18 计算抗M1抗体内化进入CHO-M1细胞。信号转导模块可以准确的分割和量化内化的抗体。感谢J.Andreev提供数据。

资源

- 观看网络讲座：
Application of Molecular Devices HCA tools for antibody drug discovery at Regeneron. Julian Andreev, PhD, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- 观看网络讲座：
Automated patch clamp in drug discovery. Daniel Jannsen, PhD, Ablynx Pharmaceuticals.
- 观看网络讲座：
Identification and selection of GPCR cell lines with ClonePix 2 System. Barbara Robertson, BMS and Alison Glaser, Molecular Devices.
- 下载应用文章：
ClonePix技术快速筛选和开发高表达GPCR的哺乳细胞系

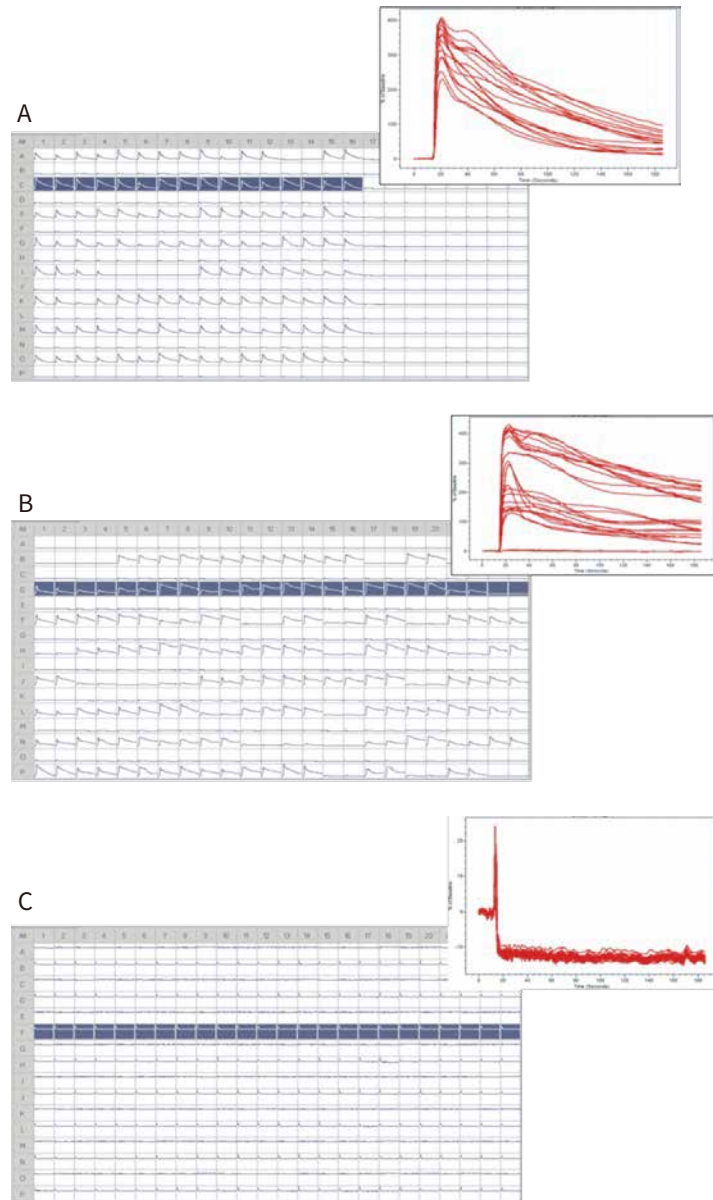


图19: 用FLIPR Tetra系统验证ClonePix系统的克隆筛选。 FLIPR Tetra系统可开展高通量、基于细胞的功能实验，是药物发现的首选，通过钙离子敏感的荧光染料(FIIPR Calcium 6试剂盒)评估胞内钙流的变化。(A) 高荧光的CHO-M1组，carbachol激活产生了相对于背景强度四倍增幅的荧光信号。(B) 在中荧光和低荧光CHO-M1组，carbachol分别激活产生了四倍和两倍的荧光信号增幅。(C) 在CHO-K1阴性对照组，carbachol没有引起荧光信号变化。

质控用于放大培养

监测细胞生长速度并验证单克隆性，从而为放大生产规模做好准备。

更短时间内获得一致的结果

当开发细胞株用于生产治疗性抗体时，从质量和监管角度确保细胞株源于单个细胞（即单克隆性）是至关重要的。

传统克隆方法，如有限稀释法和FACS，利用统计学分析确定单克隆性的置信区间。CloneSelect Imager系统，利用非侵入的白光成像，在单细胞分选后基于客观的图像分析验证单克隆性。

此外，CloneSelect Imager系统使得快速、定量的检测细胞汇合度以及生成生长曲线变得非常简单，从而使生长过程更快更高效。

- 免标记白光成像活细胞
- 生理相关的免标记细胞检测适用于贴壁细胞和悬浮细胞
- 一致、客观地测定细胞生长速率
- 90秒快速检测一块96孔板
- 灵活整合用于高通量操作

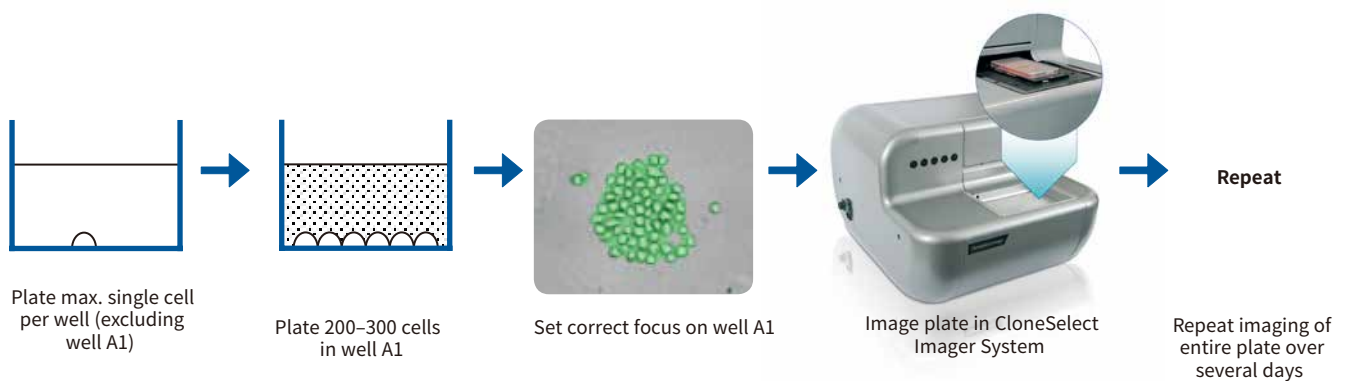


图20: CloneSelect Imager验证单克隆性和评估细胞生长的典型工作流程。接种细胞至孔板，A1孔设定正确的聚焦值，然后在14天内成像孔板。每个孔的生长过程都能够被追溯至起点，从而为单克隆性提供证据。

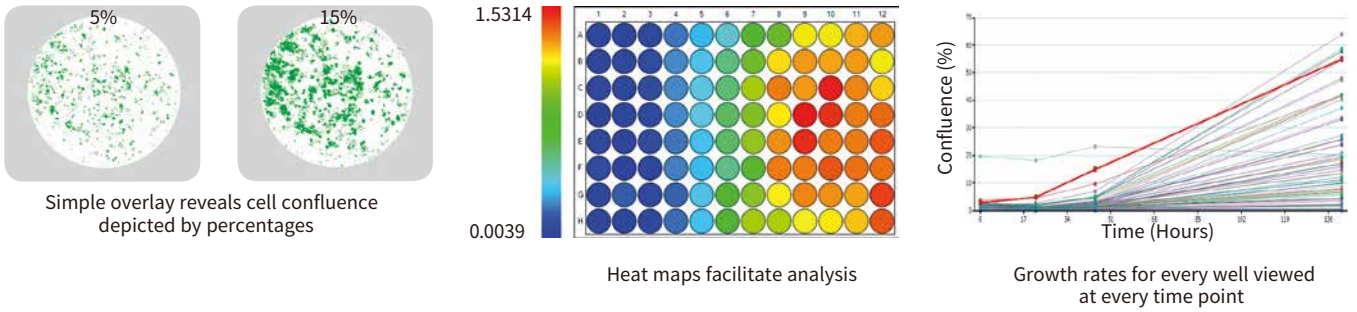


图21: 快速的图像生成和清晰的数据分析。CloneSelect Imager能够客观地测定每个孔的细胞汇合度, 从而替代耗时、主观的目视检测。热图可视化地展示细胞汇合度, 同时可浏览和追溯每块板每个孔的细胞生长速度。

单克隆性验证

接种后, CloneSelect Imager系统可在任意时间点对全部孔成像。Loci of Growth的分析功能可以筛选并浏览仅含有一个克隆的孔。向每个孔接种一个细胞然后在任意时间点成像。

- 关注含有一个细胞团的孔, 通过浏览图像时间序列确认单克隆性。
- 追溯每个孔的图像时间序列确认克隆起源。

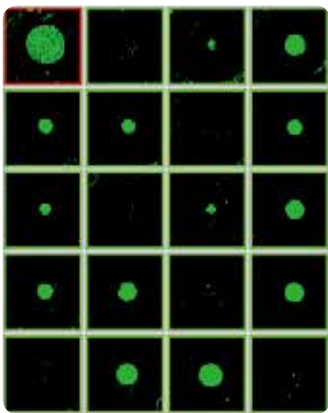
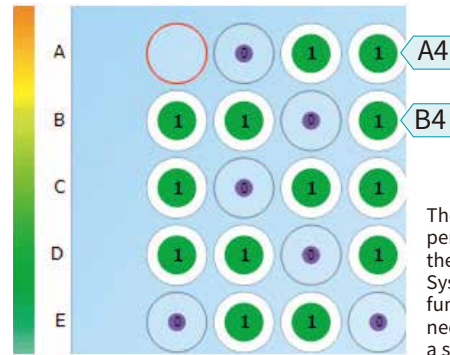
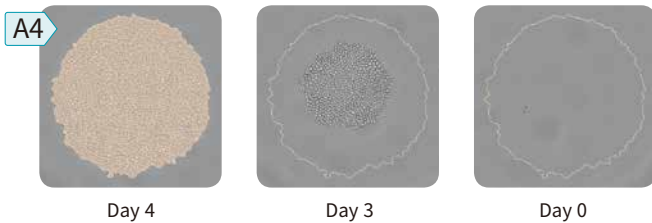


Plate thumbnails — the green overlay highlights where colonies have been identified.



Two cells on Day 0 – not monoclonal



One cell on Day 0 – monoclonal

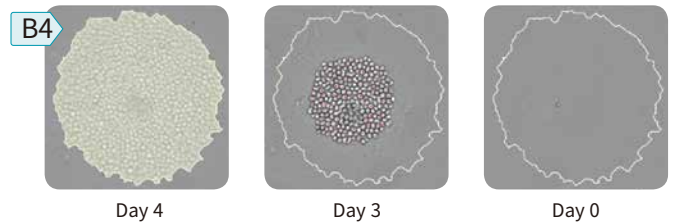


图22: 验证单克隆性——追溯克隆的起源。追溯每个孔的生长过程至起点, 从而为单克隆性提供证据。

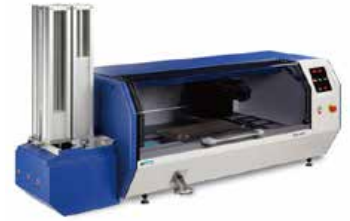
抗体开发解决方案



ImageXpress Micro
共聚焦高内涵成像分析系统



SpectraMax i3x
多功能酶标仪



QPix 400
系列微生物克隆挑选系统

SpectraMax MiniMax 300
成像系统



SpectraMax Paradigm
多功能酶标仪



FLIPR® Tetra
高通量实时荧光检测分析系统



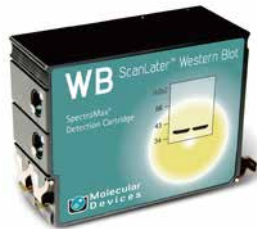
ClonePix™ 2
细胞克隆筛选系统



CloneSelect™ Imager
细胞生长分析系统



FLIPR
钙流检测试剂盒



ScanLater Western Blot
卡盒



**CloneMatrix 和
CloneDetect 试剂**



CloneMedia 试剂

欲了解更多关于Molecular Devices用户产品使用心得，请点击
客户案例



扫一扫关注我们
的官方微信