

## 人FcRn结合试剂盒（TR-FRET）

### 【产品名称】

人FcRn结合试剂盒（TR-FRET）

### 【规格】

100 Tests & 500 Tests

### 【货号】

FRT-01

### 【用途】

该试剂盒用于促进抗体候选药物的半衰期评估，以及FcRn抑制剂的高通量筛选。它也可以作为一种通用的检测工具来鉴定抗体药物与FcRn结合的能力。仅供研究使用(RUO)。

### 【背景】

FcRn是一种异源二聚体，是由FCGRT (Fc fragment of IgG receptor and transporter) 基因编码的 $\alpha$ 重链与胞外 $\beta$ 2-微球蛋白 ( $\beta$ 2m) 轻链非共价结合构成的异二聚体。普遍认为，IgG与Fc受体(FcRn)的相互作用在体内调节IgG稳态中起着关键作用。FcRn与IgG的Fc结构域的CH2-CH3部分的相互作用依赖于pH，在酸性(pH 6)下发生高亲和力结合，当pH升高到中性(pH 7.4)时结合活性减弱或无结合。FcRn负责延长血清中IgG和血清白蛋白的半衰期，并负责跨越内皮和上皮屏障的运输，增加IgG和血清白蛋白的总体生物利用度。FcRn与IgG之间的结合亲和力通常被用来表征抗体药物的代谢水平。

人FcRn结合试剂盒（TR-FRET）采用TR-FRET（时间分辨荧光共振能量转移）技术，利用竞争法在（免洗）均相体系中测量人FcRn与抗体候选药物或FcRn抑制剂之间的相互作用，通过钬螯合物标记的FcRn（供体）和FA标记的人IgG1抗体（受体）在均相体系中结合，对抗体候选药物的半衰期进行评估，以及在0.5-1小时内高通量筛选FcRn抑制剂。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FcRn与镧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：

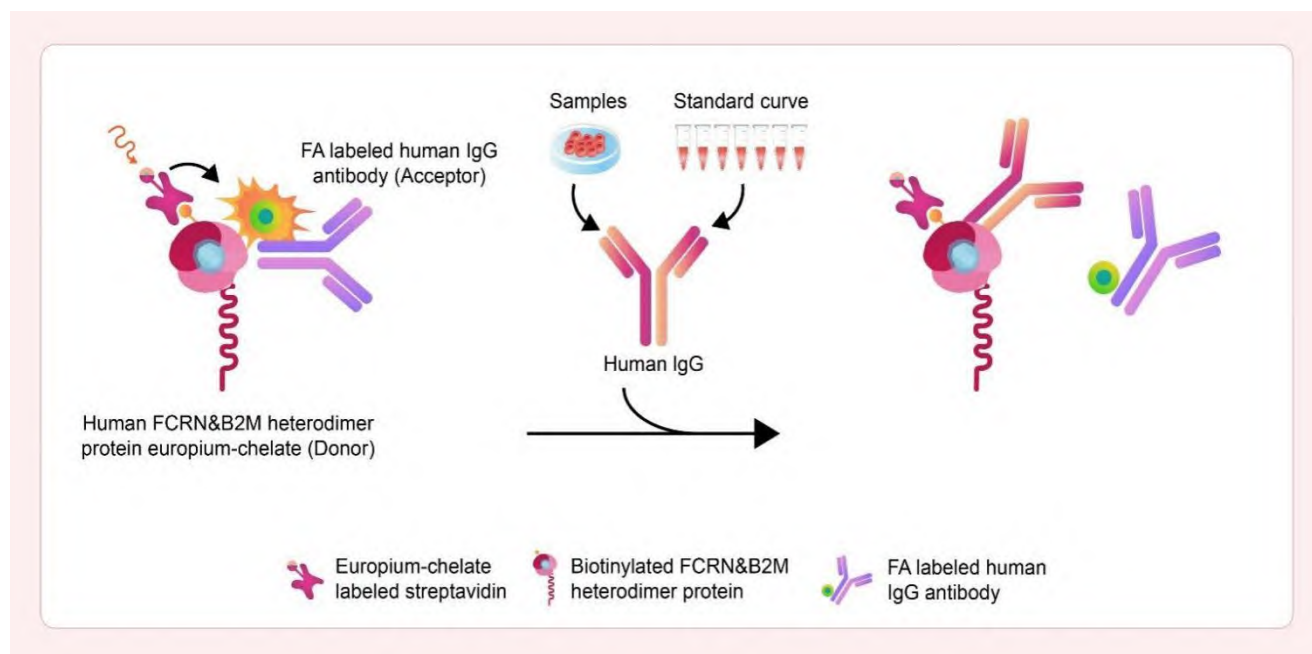
- 1) 先将样本与Donor混合，室温孵育0.5小时；
- 2) 再加入FA标记Human IgG1（Acceptor），室温孵育0.5小时；
- 3) 使用酶标仪TR-FRET模块读取665 nm和620 nm的荧光信号。

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FcRn结合的组分，镧螯合物偶联的人FcRn（Donor）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620 nm的信号，该信号被能量受体接收，发出665 nm的信号。

当检测样本中含有可与镧螯合物偶联的人FcRn（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<br>(100Tests) | 规格<br>(500Tests) | 物理状态 | 存储条件      |           |
|-----------|--------------------------------------------------------|------------------|------------------|------|-----------|-----------|
|           |                                                        |                  |                  |      | 未开启       | 已开启       |
| FRT01-C01 | Human FCRN&B2M Heterodimer<br>Protein Europium-chelate | 100 tests        | 500 tests        | 干粉   | 2-8°C, 避光 | -70°C, 避光 |
| FRT01-C02 | FA labeled human IgG antibody                          | 100 tests        | 500 tests        | 干粉   | 2-8°C, 避光 | -70°C, 避光 |
| FRT01-C03 | Human IgG standard                                     | 200 µg           | 1 mg             | 干粉   | 2-8°C     | -70°C     |
| FRT01-C04 | Sample Dilution Buffer                                 | 10 mL            | 10 mL            | 液体   | 2-8°C     | 2-8°C     |
| FRT01-C05 | Detection Buffer                                       | 10 mL            | 10 mL            | 液体   | 2-8°C     | 2-8°C     |

## 【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：试剂盒开封后各组份按照表1存储条件保存，有效期自开封之日起为30天。

注：不要使用过期试剂。

## 【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
7. 用于冻干组分重构用的去离子水或蒸馏水

## 【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分存储溶液，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℃保存，建议冻融次数不要超过2次。

注：Human FCRN&B2M Heterodimer 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         | 总量            | 重构水体积         |                 |
| FRT01-C01 | Human FCRN&B2M Heterodimer Protein Europium-chelate | 100 tests     | 60 $\mu$ L 水  | 500 tests     | 300 $\mu$ L 水 | /               |
| FRT01-C02 | FA labeled human IgG antibody                       | 100 tests     | 60 $\mu$ L 水  | 500 tests     | 300 $\mu$ L 水 | /               |
| FRT01-C03 | Human IgG standard                                  | 200 $\mu$ g   | 100 $\mu$ L 水 | 1 mg          | 500 $\mu$ L 水 | 2000 $\mu$ g/mL |

## 【检测流程】

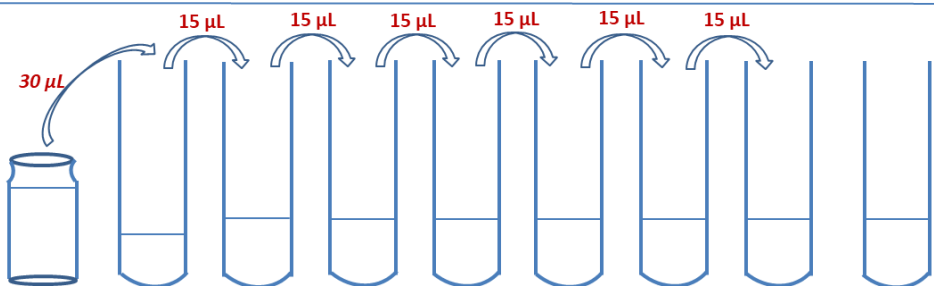
### 1. 加样

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 (FRT01-C03)作为参考品，请按照图 2 用 Sample Dilution Buffer 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  $\mu$ L 稀释处理后的标品或样本。

图 2 Human IgG standard 参考品工作液的制备

| Tubes/<br>Solution<br>Code | Human IgG<br>Stock Solution                                                          | Std 7              | Std 6             | Std 5              | Std 4                | Std 3             | Std 2              | Std 1              | Std 0 (Blank)   |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|----------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| Operating                  |  |                    |                   |                    |                      |                   |                    |                    |                 |
| Solution<br>Conc.          | 2000<br>$\mu$ g/mL                                                                   | 1000<br>$\mu$ g/mL | 250<br>$\mu$ g/mL | 62.5<br>$\mu$ g/mL | 15.625<br>$\mu$ g/mL | 3.9<br>$\mu$ g/mL | 0.98<br>$\mu$ g/mL | 0.24<br>$\mu$ g/mL | 0<br>$\mu$ g/mL |
| Dilution<br>Buffer Vol.    |                                                                                      | 30 $\mu$ L         | 45 $\mu$ L        | 45 $\mu$ L         | 45 $\mu$ L           | 45 $\mu$ L        | 45 $\mu$ L         | 45 $\mu$ L         | 45 $\mu$ L      |

### 2. 加 Donor

使用 Detection Buffer 将 Human FCRN&B2M Heterodimer Protein Europium-chelate 存储液进行 10 倍稀释 (Detection Buffer: 存储液=9:1), 配制为 Donor 工作液, 该工作液现用现配。每孔加入 5  $\mu$ 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

使用 Detection Buffer 将 FA labeled human IgG antibody 存储液进行 10 倍稀释 (Detection Buffer: 存储液=9:1), 配制为 Acceptor 工作液, 该工作液现用现配, 避光保存。每孔加入 5  $\mu$ 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                                                                                      |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A</b> | 10 $\mu$ L Std7<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | 10 $\mu$ L Std7<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | 10 $\mu$ L Sample1<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                    | 10 $\mu$ L Sample1<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                    |
| <b>B</b> | 10 $\mu$ L Std6<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | 10 $\mu$ L Std6<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | 10 $\mu$ L Sample2<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                    | 10 $\mu$ L Sample2<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                    |
| <b>C</b> | 10 $\mu$ L Std5<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | 10 $\mu$ L Std5<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | 10 $\mu$ L Sample3<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                    | 10 $\mu$ L Sample3<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                    |
| <b>D</b> | 10 $\mu$ L Std4<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | 10 $\mu$ L Std4<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | 10 $\mu$ L Sample Dilution Buffer<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Detection Buffer | 10 $\mu$ L Sample Dilution Buffer<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Detection Buffer |
| <b>E</b> | 10 $\mu$ L Std3<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | 10 $\mu$ L Std3<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | ...                                                                                    | ...                                                                                    |
| <b>F</b> | 10 $\mu$ L Std2<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | 10 $\mu$ L Std2<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | ...                                                                                    | ...                                                                                    |
| <b>G</b> | 10 $\mu$ L Std1<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | 10 $\mu$ L Std1<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液                   | ...                                                                                    | ...                                                                                    |
| <b>H</b> | 10 $\mu$ L Sample Dilution Buffer<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液 | 10 $\mu$ L Sample Dilution Buffer<br>5 $\mu$ L Donor 工作液<br>5 $\mu$ L Acceptor 工作液 | ...                                                                                    | ...                                                                                    |

图 3. 微孔板设计参考

|   | 1     | 2     | 3                | 4                | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|---|-------|-------|------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | Std 7 | Std 7 | Sample1          | Sample1          | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| B | Std 6 | Std 6 | Sample2          | Sample2          | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| C | Std 5 | Std 5 | Sample3          | Sample3          | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| D | Std 4 | Std 4 | Negative control | Negative control | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| E | Std 3 | Std 3 | ...              | ...              | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| F | Std 2 | Std 2 | ...              | ...              | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| G | Std 1 | Std 1 | ...              | ...              | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| H | Blank | Blank | ...              | ...              | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |

#### 4. 读数

用酶标仪 TR-FRET 模块读取 665 nm/620 nm 信号。

#### 5. 计算 Ratio

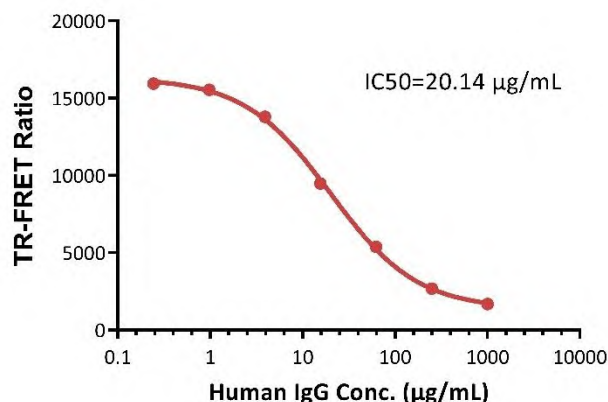
参考公式  $\text{Ratio} = \frac{\text{Signal 665 nm}}{\text{Signal 620 nm}} \times 10^4$  计算 Ratio。

#### 【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℃ 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】

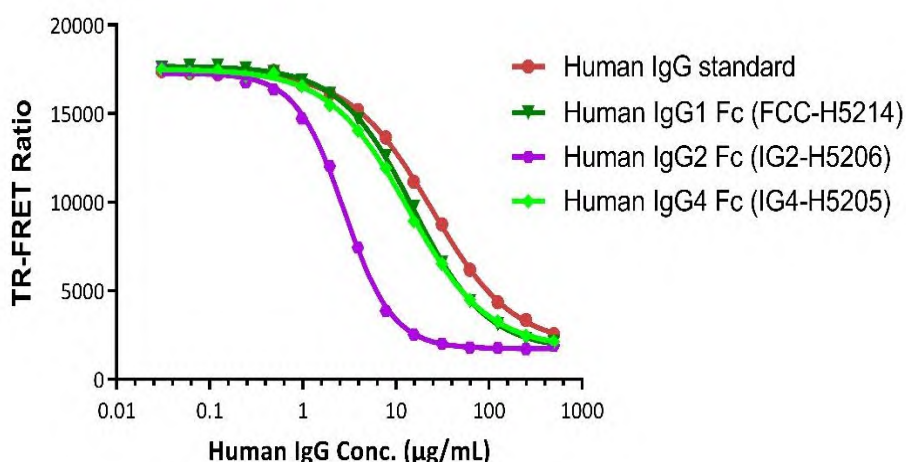
每次实验，每块酶标板都需要设置标准曲线，具体 Ratio 值可能因不同实验室、实验员或设备而不同，不同型号酶标仪不同增益下检测荧光信号具体数值不同，具体应根据设备调整参数，如果信号过强，可以调低仪器的增益，建议参阅酶标仪用户手册中的说明。以下示例数据来源于 BMG Labtech Clariostar Plus 酶标仪，结果仅供参考。



| Human IgG standard Conc. | Signal 665 nm | Signal 620 nm | Ratio |
|--------------------------|---------------|---------------|-------|
| 1000 μg/mL               | 3488          | 20864         | 1672  |
| 250 μg/mL                | 5713          | 21352         | 2676  |
| 62.5 μg/mL               | 10745         | 19997         | 5373  |
| 15.625 μg/mL             | 17787         | 18770         | 9476  |
| 3.9 μg/mL                | 25657         | 18594         | 13799 |
| 0.98 μg/mL               | 28226         | 18167         | 15537 |
| 0.24 μg/mL               | 28672         | 17991         | 15937 |
| 0 μg/mL                  | 29559         | 18091         | 16339 |

## 【检测不同抗体亚型 Fc 蛋白】

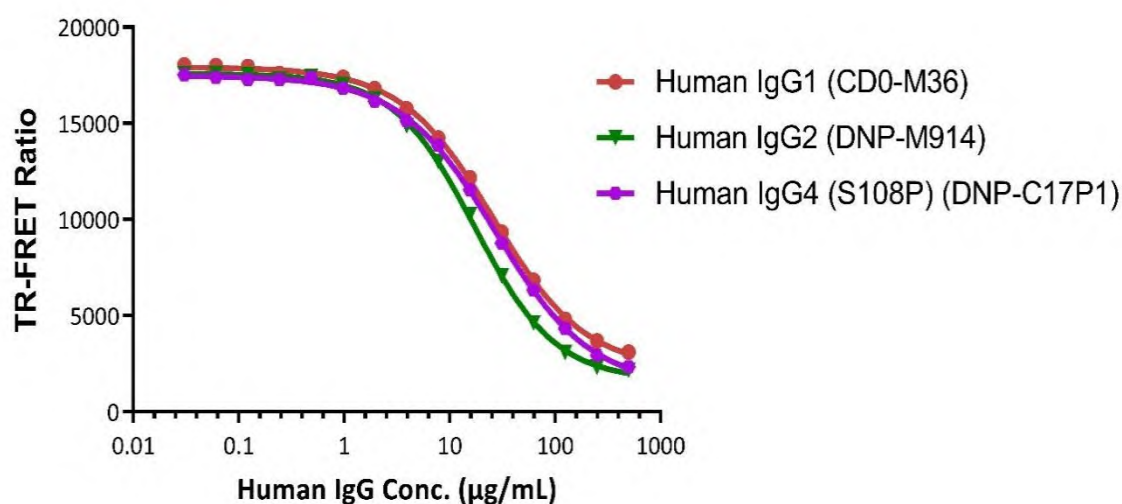
使用本试剂盒分别检测了 Human IgG1 Fc、Human IgG2 Fc、Human IgG4 Fc 与 FcRn 的结合活性，得到了预期的 IC<sub>50</sub> 值。



| Human IgG Fc proteins                        | Molecular Weight | IC50 (μg/mL)-TR-FRET | IC50 (nM)-TR-FRET |
|----------------------------------------------|------------------|----------------------|-------------------|
| Human IgG standard                           | 150 KDa          | 25.01 μg/mL          | 166.73 nM         |
| Human IgG1 Fc, Tag Free (Cat. No. FCC-H5214) | 26.1 KDa         | 15.31 μg/mL          | 598.59 nM         |
| Human IgG2 Fc, Tag Free (Cat. No. IG2-H5206) | 25.72 KDa        | 2.794 μg/mL          | 108.63 nM         |
| Human IgG4 Fc, Tag Free (Cat. No. IG4-H5205) | 25.8 KDa         | 13.57 μg/mL          | 525.97 nM         |

## 【检测不同抗体亚型】

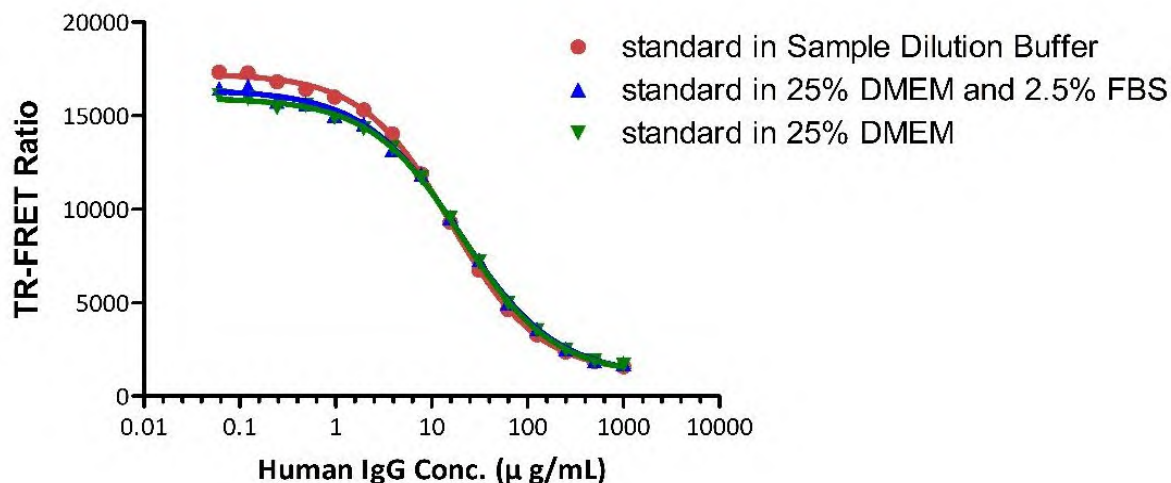
使用本试剂盒分别检测了 Human IgG1、Human IgG2、Human IgG4 与 FcRn 的结合活性，得到了预期的 IC50 值。



| Antibody                        | Molecular Weight | IC50 (μg/mL)-TR-FRET | IC50 (nM)-TR-FRET |
|---------------------------------|------------------|----------------------|-------------------|
| Human IgG1 (Cat. No. CD0-M36)   | 150 KDa          | 26.03 μg/mL          | 173.53 nM         |
| Human IgG2 (Cat. No. DNP-M914)  | 150 KDa          | 17.32 μg/mL          | 115.47 nM         |
| Human IgG4 (Cat. No. DNP-C17P1) | 150 KDa          | 26.95 μg/mL          | 179.67 nM         |

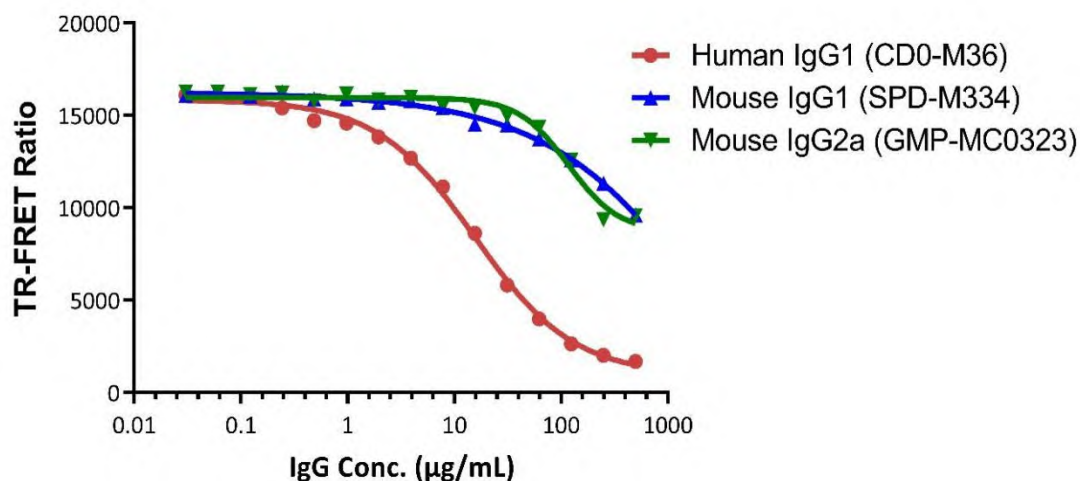
## 【基质效应】

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



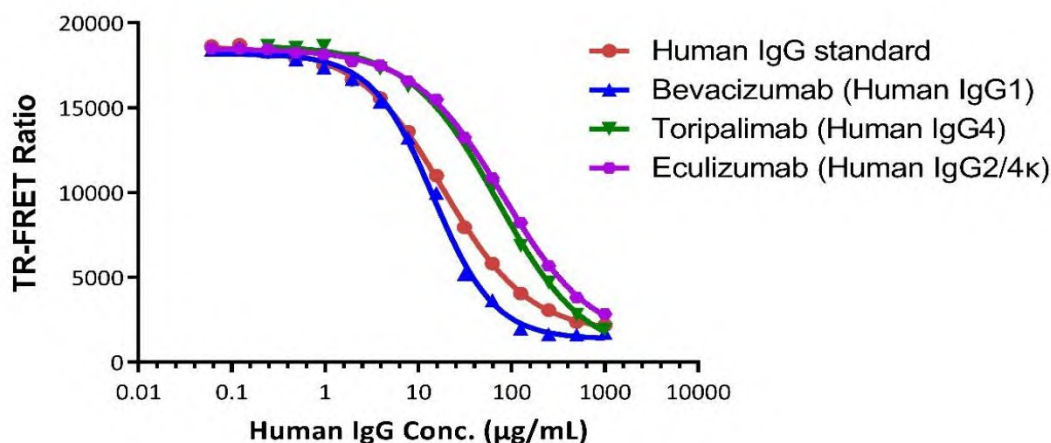
## 【种属特异性】

使用本试剂盒分别检测 Human IgG1(FRT01-C03)与 Mouse IgG1、Mouse IgG2a, Human IgG1(FRT01-C03)具有良好的浓度依赖性, 而随着 Mouse IgG1 和 Mouse IgG2a 浓度增加, FRET 信号几乎保持恒定。因此本试剂盒与 Mouse IgG1 和 Mouse IgG2a 种属不兼容。



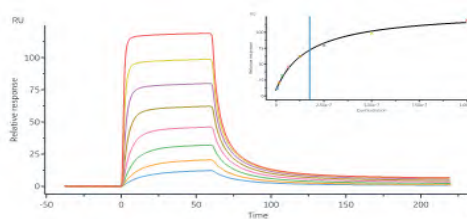
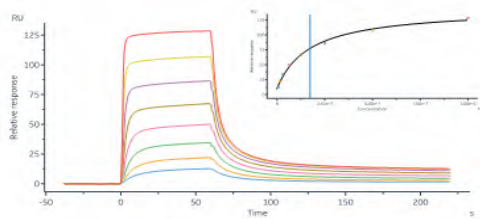
## 【FDA 批准的抗体药物半衰期评价的应用】

目前临床使用的单克隆抗体的半衰期通常与抗体的 Fc 段对 FcRn 亲和力相关。使用本试剂盒检测了 3 种经 FDA 批准的与 FcRn 结合具有不同亲和力的抗体药物，其 IC<sub>50</sub> 检测结果与 SPR 的亲和力常数以及已公布的实际体内半衰期一致。在同一实验中，IC<sub>50</sub> 越低，IgG 抗体与 FcRn 的结合亲和力越强，抗体药物的半衰期越长。贝伐珠单抗和特瑞普利单抗与 FcRn 具有一致的结合亲和力，半衰期约为 20 天。依库珠单抗（Eculizumab）的 Fc 被改造设计，其铰链区为 Human IgG2 的铰链区，CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> 区为 Human IgG4 的 CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> 区，与 FcRn 的结合相对较弱，导致半衰期相对较短，约为 11 天。



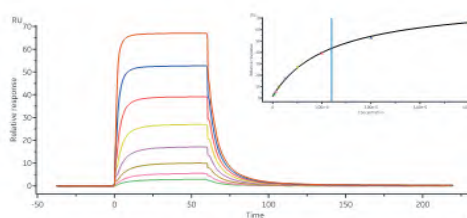
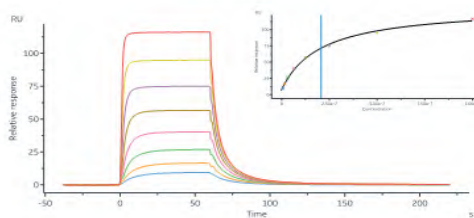
FRT01-C03

Bevacizumab



Toripalimab

Eculizumab



| Antibody                 | Molecular Weight | IC50 (μg/mL)-TR-FRET | IC50 (nM)-TR-FRET | KD (M)-SPR | Half-life                                                               |
|--------------------------|------------------|----------------------|-------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Human IgG standard       | 150 kDa          | 25.01 μg/mL          | 124.4 nM          | 1.73E-07 M | NA                                                                      |
| Bevacizumab (Human IgG1) | 149 kDa          | 19.7 μg/mL           | 97.1 nM           | 1.76E-07 M | 20 days (11 to 50 days)                                                 |
| Toripalimab (Human IgG4) | 150 kDa          | 52.82 μg/mL          | 430.9 nM          | 8.29E-07 M | 10 ± 1.5 days after the first dose and<br>18 ± 9.4 days at steady state |
| Eculizumab               | 148 kDa          | 94.95 μg/mL          | 549.9 nM          | 1.20E-06 M | 11 to 18 days (270 to 414 hours)                                        |

## 【高通量筛选 FcRn 抑制剂的应用】

本试剂盒可用于检测 FcRn 抑制剂的检测，结果表明，Efgartigimod 药物（艾加莫德）及其生物类似物人 IgG1 Fc (C103S, M135Y, S137T, T139E, H316K, N317F), His Tag (Cat.No. IG1-H52H8) 在 TR-FRET 竞争实验中表现出良好的抑制活性。

