

高内涵成像技术在单抗结合检测中的应用

优点:

- 无需冲洗的检测方法提高效率，减小浪费
- 应用范围广，可用于贴壁细胞，悬浮细胞及免疫磁珠
- 可用任何波长的荧光标记
- 高敏感度可检测低丰度抗原

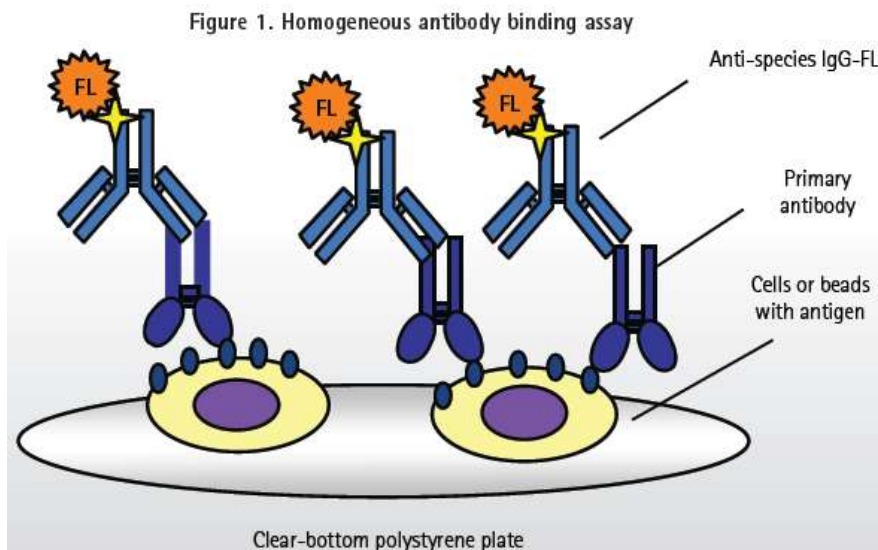
单抗结合检测方法的发展大大提高了细胞及免疫磁珠的高通量，高内涵分析效率。这种不用冲洗，基于荧光微孔分析技术（fluorometric microvolume assay technology, FMAT）的方法可以快速的针对更少量的细胞进行筛选，而且在传统样本检测中由于多次洗板造成的细胞损失也完全可以避免。

抗体的发现在诊断疾病，研发疫苗和治疗疾病的过程中起到重要作用。研究者们利用杂交瘤细胞或者形成克隆来筛选高表达克隆株，检测细胞表面的抗体结合效率，观测抗体或配体在细胞内的内化。在传统的 FMAT 检测方法的已有优点之上，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。

检测原理

抗体被富集在磁珠上并用带荧光的二抗进行标记。荧光成像技术可以检测被磁珠捕获的抗体数量。利用类似的方法同样可以检测细胞表面结合的配体以及配体和抗体的内化。

在单抗结合检测过程中（图 1），应将贴壁细胞，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。



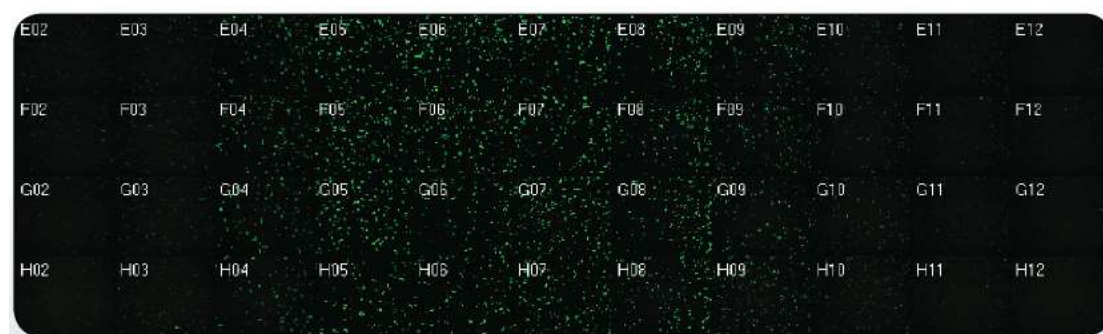
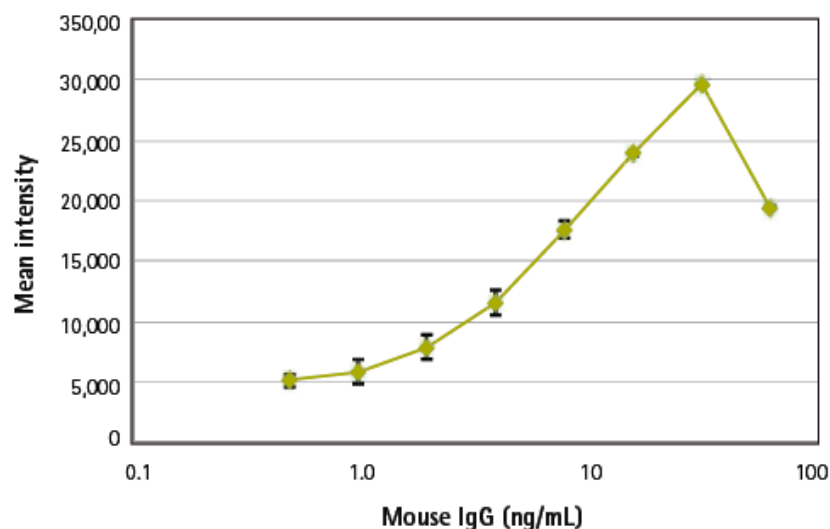
所有的检测试剂加到微孔板后都无需冲洗。细胞或抗体包被的免疫磁珠被固定在孔板底部表面，即使孔板底部有高背景荧光，阳性信号也可被识别并分析。

线性和检测范围

在第一个实验中，我们将不同浓度的一抗滴定使之与 7 微米的磁珠结合。加入被分析物，用二抗标记并利用 ImageXpress Micro 高内涵分析系统成像。传统的 FMAT 检测方法只能利用红色 (Cy5) 通道进行检测，而 ImageXpress Micro 系统可以捕捉到多种波长图像，所以任何二抗标签都可以用来标记及检测。在这个滴定实验中，二抗是用 DyLight 488 标记的。

MetaXpress® 高内涵图像采集和分析软件中应用 Count Nuclei 模块对图像进行分析，所得出的最低检测阈值 (LLD) 为 0.5ng/ml (30pg/well)，线性响应大概在 1-31ng/ml。此次一抗滴定实验的曲线显示出了“前带现象 (prozone)”，以及与单抗结合检测相关的“钩状现象 (hook effect)”。在曲线顶峰的信号衰减是由于未结合的一抗在介质中与二抗结合，使之未能与细胞和磁珠结合所致 (图 2)。

Figure 2. Primary antibody titration curve



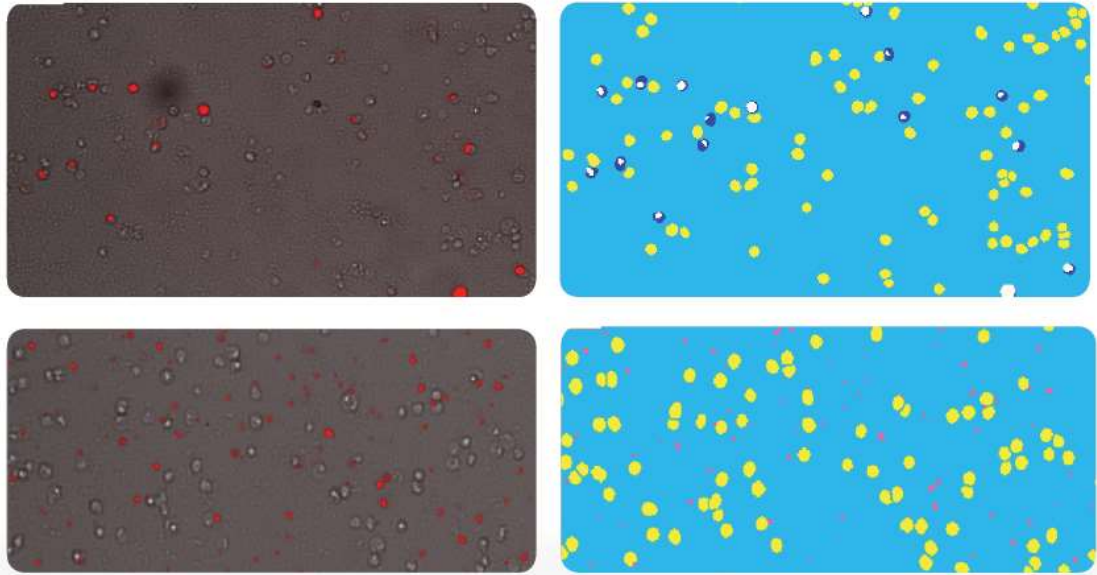
免疫磁珠的一抗结合曲线见上图。12.7 微米包被羊抗小鼠抗体的磁珠被结合到不同浓度的小鼠 IgG 抗体上，并加到微孔板中，在孔板中与标记 AlexaFluor488 的二抗室温下共孵育 1-2 个小时，实验设四个复孔及同型抗体对照孔。图像为 10X PlanFluor 物镜拍摄。孔板的缩略图 (下) 清晰的显示出抗体结合的浓度梯度。分析结果：LLD 为 0.5 ng/mL (30 pg/well)，在 1-31ng/mL 之间呈线性关系。

多波长分析更准确的测定细胞响应

除了荧光图像外, ImageXpress Micro 系统还可以捕捉到透射光图像(transmitted light, TL)从而更准确的鉴别细胞。在这个基于细胞的检测例子中, 系统同时捕捉了透射光和荧光图像, 并用 MetaXpress 软件的用户自定义模块对细胞进行分析。

对同一个孔的荧光图像观察显示抗体已经结合到了细胞表面, 但是如果将荧光和透射光图像叠加就可以看到并非每个细胞都和抗体结合在一起(图 3, 左上)。随后的图像分析正确的筛选出了与抗体结合的阳性细胞(图 3, 右上)。另一个孔的 Cy5 通道图像显示出高荧光信号, 意味着抗体的有效结合。然而, 通过透射光和荧光的叠加分析可以看出此孔中的细胞并未与荧光有效结合(图 3, 左下)。图像分析确定了这些高荧光信号是由人为因素而非细胞本身引起的, 所以这些细胞被标记为未连接到抗体(图 3, 右下)。

Figure 3. More accurate image analysis using transmitted light

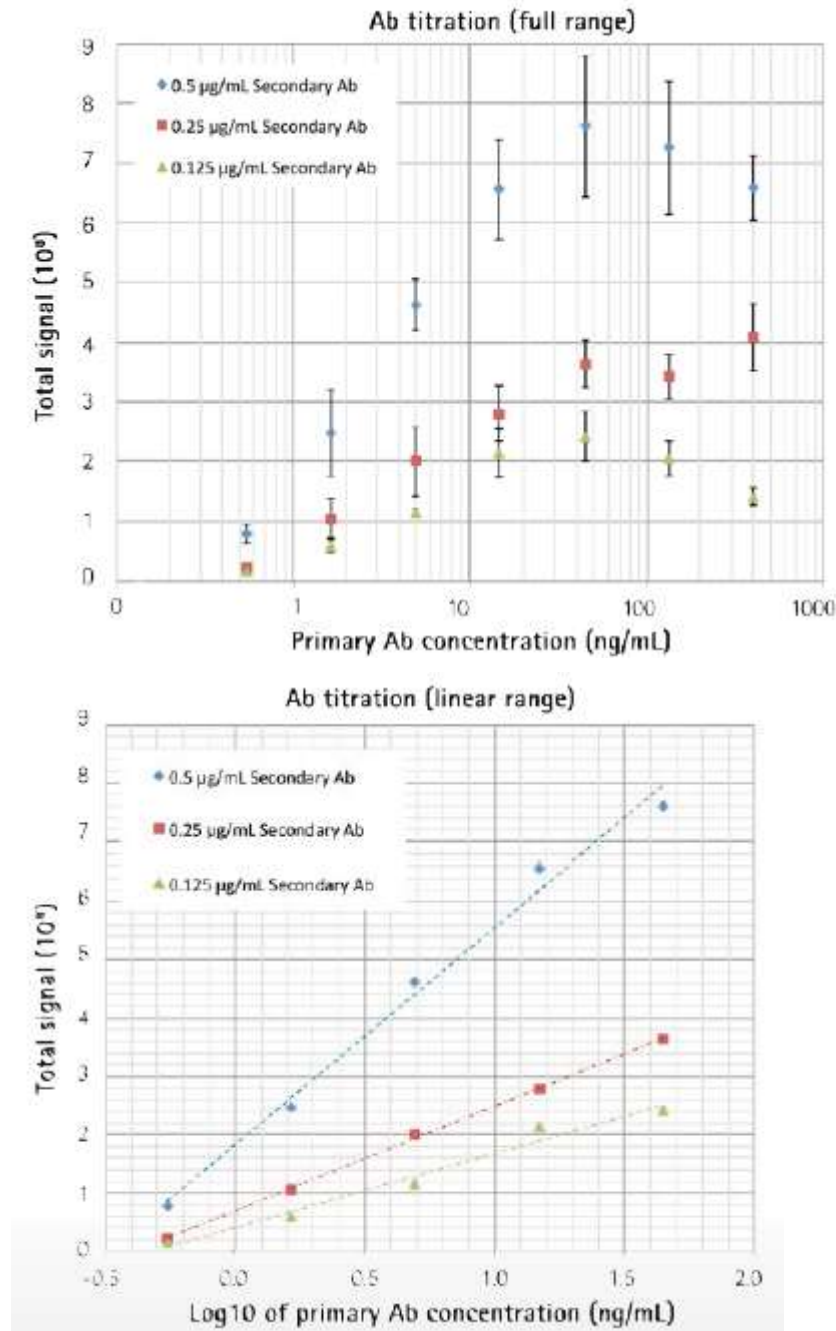


上: Cy5 (红色)和透射光(半透明)图像叠加后显示出所有抗体结合的阳性和阴性细胞(左)。分析图中将抗体结合的阴性细胞显示为黄色, 阳性细胞(Cy5 通道)显示为蓝色, 重叠的部分为白色(右)。

下: Cy5 (红色)和透射光(半透明)图像叠加后显示出没有与细胞重叠的杂质荧光(左)。分析图中将抗体结合的阴性细胞显示为黄色, Cy5 通道阳性但与细胞无关的杂质显示为粉色(右)。

检测实验可以很容易的通过优化二抗浓度来确定条件。在这个例子中, 我们用三种不同浓度的二抗来结合宽浓度范围的一抗。就如之前的磁珠检测结果一样, 实验显示出了很好的“钩状现象(hook effect)”(图 4, 上)。当二抗浓度为 $0.25\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的最低检测阈值为 $0.5\text{ng}/\text{ml}$, 这一数值与标准的 FMAT 方法一样。三种浓度的二抗在滴定范围内都显示出了良好的线性(图 4, 下)。

Figure 4. Optimizing detection reagents for best sensitivity



上：三种不同浓度二抗的一抗滴定实验（显示于X轴）。

下：结果表明，分析物（一抗）在五倍稀释梯度下呈线性关系，其LLD为0.5ng/mL

基于图像的单抗检测分析更具灵活性

与传统的 FMAT 检测方法相比，应用 ImageXpress Micro 系统和 MetaXpress 软件的单抗结合高内涵成像分析方法可以提供更多的信息。本系统可以在消除通常人为误差的基础上更快速的得到准确的细胞响应，从而得到更精确的结果。另外，科学家们可以检测配体与细胞表面的结合并进一步在任意波长检测二抗标签，在一个平板上检测不同细胞以及在不影响灵敏度的情况下将检测扩展到 1536 孔板。