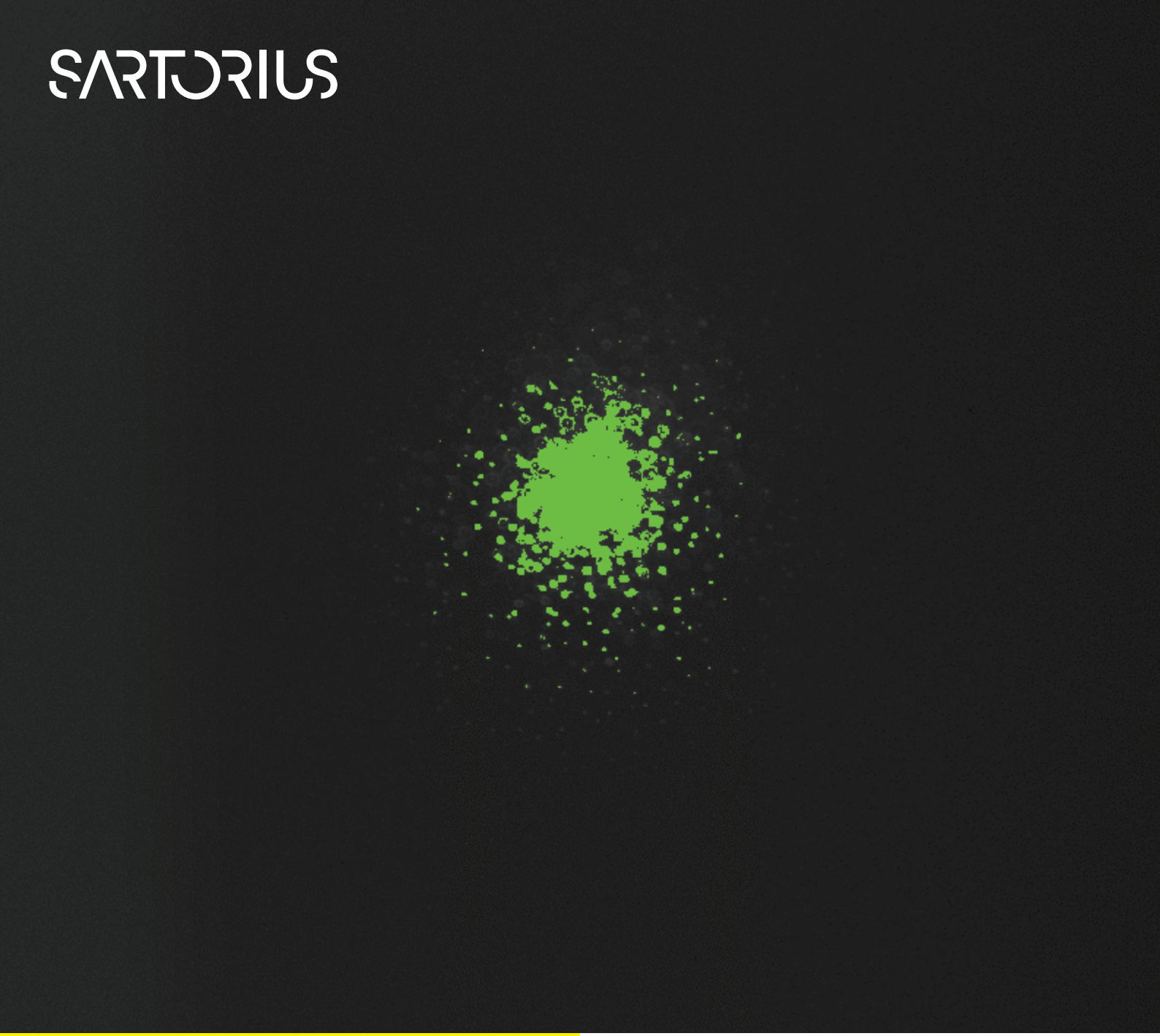
SARTORIUS



基于成像的全自动细胞筛选和分离

CellCelector 抗体发现

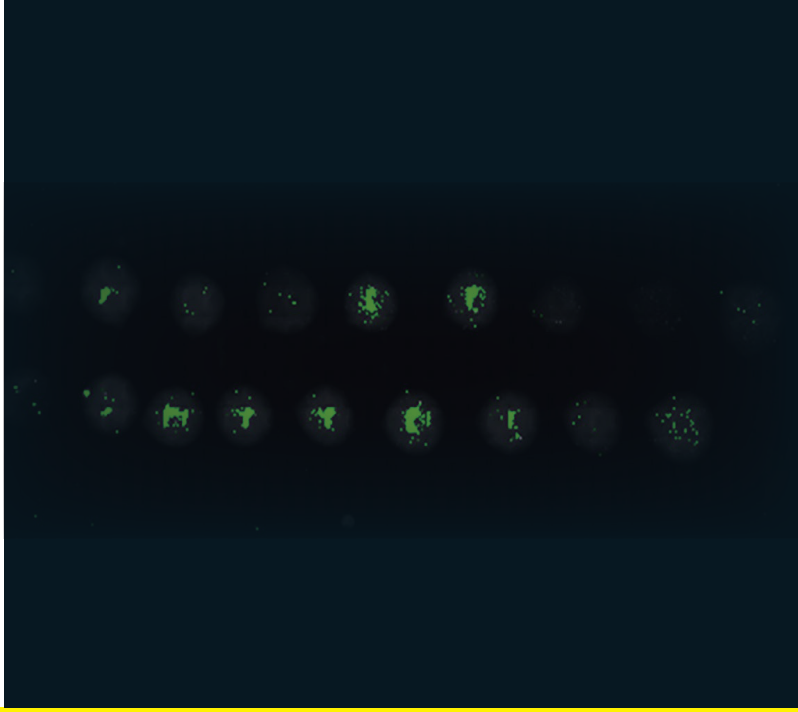
自动化药物发现工作流程，以确定具有最高生产力的最佳生产克隆

- 基于图像验证的单克隆性证明
- 用于生产力检测的 5 通道荧光
- 纳米孔阵列技术，能够高通量评估和验证大量克隆，从而筛选产量最高的克隆进行转移
- 从甲基纤维素和基质胶等半固体培养基中转移高活性杂交瘤 ®

抗体发现

抗体是理想的治疗性生物大分子，因为它们能与各种靶点结合，具有高亲和力和特异性。杂交瘤和噬菌体展示技术的创新使药物研发人员能够利用抗体的天然多样性，广泛使用单克隆抗体（mAbs）治疗癌症、慢性炎症和传染病。虽然单 B 细胞筛选技术已经有了显著发展，并成为获取抗原特异性 mAb 序列的主要来源，但使用半固体培养基进行杂交瘤筛选仍然是一项具有挑战的任务。

本应用指南将重点介绍抗体发现工作流程中两种单 B 细胞筛选方法，以及 CellCelector Flex 如何帮助简化流程。



CellCelector Flex
在抗体发现方面的优势

- 纳米孔技术可在 8 小时内，在单个孔板中筛选多达 500 万个 B 细胞或杂交瘤
- 单个 B 细胞的抗原特异性识别和分离
- 使用孔板包被、微球或报告细胞捕获目标抗体
- 单次运行可多重筛选多达 14 种抗原
- 同时进行多种细胞类型的高通量相互作用研究

CellCelector
B 细胞筛选工作流程

将 CellCelector Flex 与纳米孔阵列技术相结合，可实现高通量细胞分离、成像和分泌分析工作流程，从而在数小时内处理数百万个 B 细胞。

可从数千个潜在候选细胞中筛选出目标特异性分泌细胞，然后转移到 PCR 管中进行进一步的下游分析。

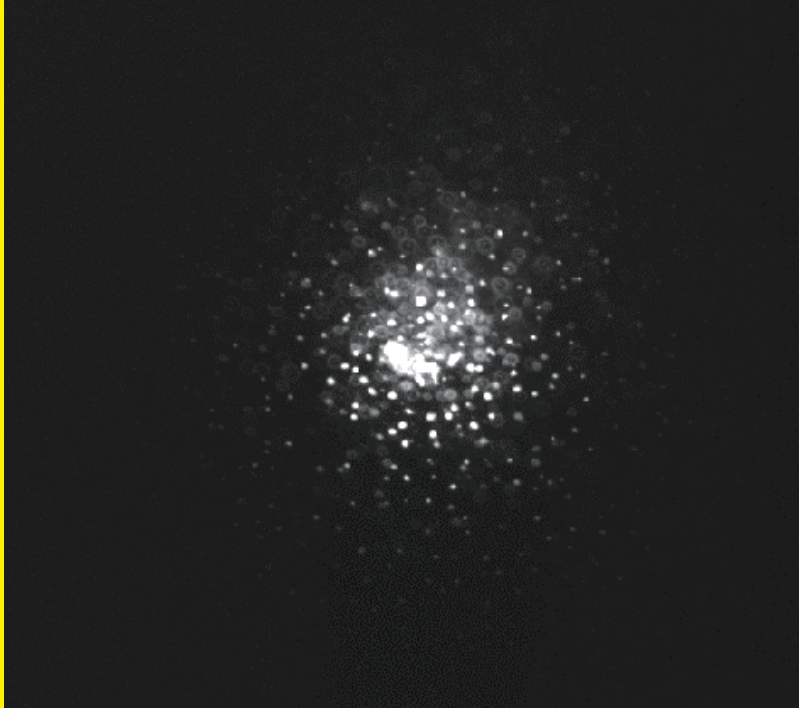


图 1. 抗体发现工作流程

注：从小鼠脾脏、淋巴结或脊髓液中收获 B 细胞，并使用磁珠富集。接种纳米孔板时，每个大孔添加 20,000~50,000 个 B 细胞（如果单克隆性不重要，则可使用更多细胞）。可以使用不同类型和不同大小的微球，或染料标记的抗原表达报告细胞。应向每个大孔中加入染料偶联的二抗（15 µg/mL），随后在 37 °C 下培养 1-4 小时进行检测。然后在 CellCelector 上识别最佳分泌细胞，并对其进行排序，然后将前 96 个苗头化合物转移到 PCR 管中进行下游分析。

CellCelector 在 B 细胞筛选中的优势

纳米孔技术
纳米孔板的每个大孔底部都有多达数十万个纳米孔。尽管是局部分离，但细胞被相同的培养基覆盖，因此可以共享生长因子，在共培养环境下更容易生长至克隆（图 2）。

有关纳米孔技术的更多信息，请参见“CellCelector Flex 毛细管、挑头及耗材手册 ”。

单细胞分泌分析
对纳米孔板中的单个细胞进行单细胞分泌分析，能够快速识别理想的分泌细胞。CellCelector B 细胞工作流程支持多种细胞分析策略，包括使用抗原包被孔板、加入微球或抗原表达报告细胞的分析策略（图 3）。

多重筛选
支持明场、相差以及蓝色、绿色、红色、远红外和近红外荧光通道成像以分泌物分析。

图 2. 普通孔（A 和 B）中细胞生长示意图与纳米孔板（C 和 D）中细胞生长示意图的对比。

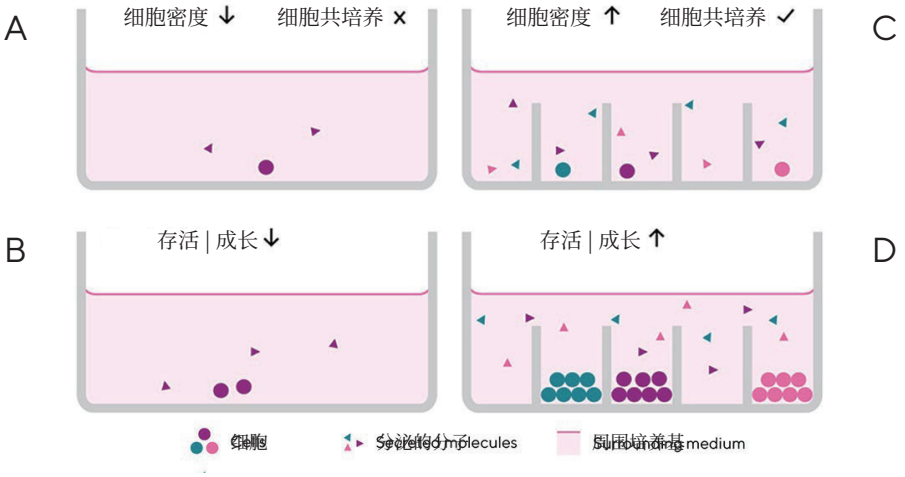
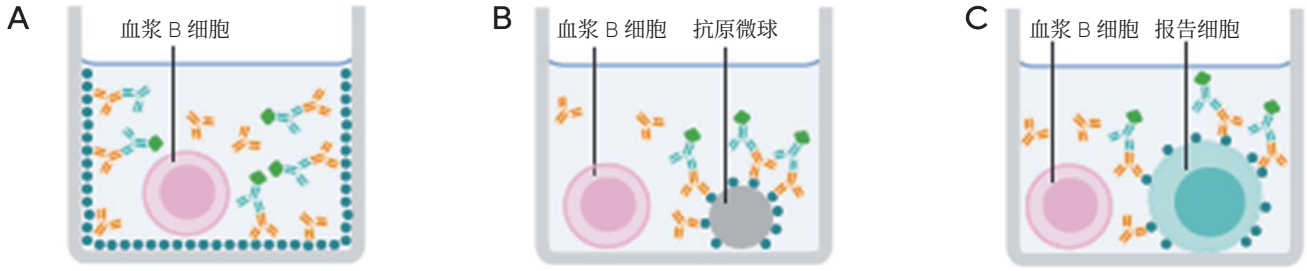


图 3. 三种主要细胞分析的示意图。（A）孔板内包被抗原分析，（B）基于捕获微球的抗原特异性分析和（C）抗原表达报告细胞分析。



孔板内包被抗原分析　　基于捕获微球的抗原特异性分析　　抗原表达报告细胞分析

微球和报告细胞的单 B 细胞筛选方案

B 细胞筛选纳米孔板

CellCelector 6 孔 H100-100 360K 纳米孔板每个大孔包含 60,000 个纳米孔，具有无细胞毒性和低黏附性的特点，有助于防止细胞附着，不受细胞的粘附性性或悬浮条件优化的影响，可用于所有类型的细胞。如有必要，还可以用 BSA 阻断表面，以提高细胞排斥性能并避免非特异性蛋白质吸收。

所需材料

- H100-100 360K 纳米孔板（产品货号 CC0080）
- CellCelector 50 µm 玻璃毛细管（产品货号 CC0007）
- 抗原包被微球（仅用于抗原微球分析）
- 荧光标记二抗
- 配有微孔板适配器的离心机
- 无水乙醇
- 2% BSA（可选）

单 B 细胞筛选

步骤 1：纳米孔预湿与排气泡

1. 将移液器吸头靠在孔壁上，靠近底部，向每个孔中加入 3 mL 无水乙醇
2. 立即以 700 ×g 转速离心 2 分钟，去除纳米孔中形成的残留微气泡。
3. 移除 1 mL 乙醇，留下 2 mL
4. 加入 3 mL 的 1×PBS，然后移除 3 mL
5. 再用 PBS 重复清洗 3-4 次

步骤 2：纳米孔预备

1. （可选）用 2% BSA 冲洗孔板 3-5 次，每次孔内留 2 mL。在室温（RT）下用 BSA 培养（阻断）1 小时
2. 参照上述操作步骤，用补充培养基清洗 3 次。留下 2 mL。

步骤 3：细胞样本准备和接种

1. 按照下方表 1 中的说明，每个孔制备 1.0 mL 细胞悬浮液
2. 每个孔加入 1.0 mL 制备好的细胞悬浮液，呈 “Z” 字形滴入孔中
3. （可选）让细胞在 RT 条件下沉淀 5-10 分钟
4. 以 300 ×g 离心 5 分钟
5. 使用 CellCelector 或标准细胞显微镜（可选）观察接种孔
6. 将孔板在 37 °C、5% CO_2 条件下培养 1-3 小时（最佳培养时间和温度取决于细胞来源和分析需求）

表 1. 用于抗原包被微球和报告细胞分析的 B 细胞分析参数。

获取和富集血浆 B 细胞 /mL	
▪ 每个孔 20,000-50,000。如果单克隆性不重要，则可使用更多细胞 ▪ 新鲜的 B 细胞比冷冻的 B 细胞能提供更高的检测信号，冷冻的 B 细胞也可能有很大比例的死细胞，从而降低苗头化合物率	
抗原包被微球分析：	**报告细胞分析：**
▪ 可使用不同类型和尺寸的微球。避免使用 <1 µm 的微球。调整微球覆盖的数量，而不是只覆盖大部分纳米孔底部，以保证更早检测到目的细胞 ▪ 对于较大的微球（≥5 µm），每孔使用浓度为 1.5M-2M（每个纳米孔平均至少 20 个微球）	▪ 每孔使用 300,000-500,000 个抗原表达报告细胞，并用细胞追踪染料预先标记
染料偶联二抗	
▪ 加入孔前浓度应为 15 µg/mL ▪ 由于需要将 1 mL 细胞悬液与混合二抗加入存在于孔中的 2 mL 培养基中，最终浓度为 5 µg/mL	

孔板内包被抗原的 B 细胞分泌分析方案

步骤 1：纳米孔预湿与排气泡

1. 水平放置纳米孔板并打开盖子
2. 在每个待接种孔中分装 3 mL PBS
3. 在室温（RT）下，以离心机和转子允许的最高转速将孔板离心 5 分钟。离心后，孔底应透明且无任何图案。如果不是这种情况，请重复离心
4. 移除 1 mL PBS，留下 2 mL

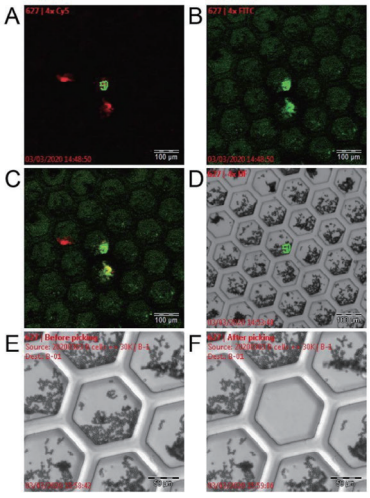
步骤 2-4 的替代方案

- 通过将移液器吸头靠在孔壁上，靠近底部，向每个待接种孔中注入 3 mL 无水乙醇，预湿纳米孔。乙醇通过毛细作用慢慢扩散，直至覆盖整个表面
- 离心前，确保转子适当平衡，以 700 ×g 转速离心孔板 2 分钟，去除纳米孔中形成的残留微气泡
- 移除 1 mL 乙醇，留下 2 mL
- 加入 3 mL 的 1×PBS，然后移除 3 mL
- 用 PBS 重复清洗 3-4 次

步骤 2：细胞样本准备和接种

1. 加入 1.0 mL 的 50 至 100 µg/mL 抗原，培养过夜
2. 用 2% BSA 冲洗孔板 3-5 次，每次孔内留 2 mL。在 RT 下用 BSA 培养（阻断）1 小时
3. 用培养基清洗 3 次，留下 2 mL 培养基
4. 为每个待接种孔制备 1.0 mL 单细胞悬浮液，混合均匀：
   a) 新鲜培养基中的细胞不超过 50,000 个 /mL。如果单克隆性不重要，则可使用更多细胞
   b) 5 µg/mL 的荧光二抗
5. 以 "Z" 字形向每个孔中加入 1.0 mL 制备好的细胞悬浮液
6. （可选）让细胞在 RT 条件下沉淀 5-10 分钟
7. 以 300×g 转速离心 5 分钟
8. 使用 CellCelector 观察已接种孔
9. 将孔板在 37 °C 下培养 1 小时或 2 小时（最佳培养时间取决于细胞类型）
10. 以 10× 物镜扫描 CellCelector 上的孔板以发现阳性细胞（显对应颜色荧光），并从阳性孔中挑取目的细胞

图 4. 孔板内包被抗原的 B 细胞分泌分析示例。



注：获得 200 万个 CD138+ 抗体分泌细胞（ASC），并将 60,000 个细胞接种至 6 孔 H100 型纳米孔板的一个大孔中，以实现每个纳米孔一个细胞的平均占有率。使用 EGFR 做为抗原。将抗人 IgG Fc 特异性捕获微球和抗人 IgG 偶联 AF647，生物素化 EGFR 和 AF488 偶联链霉亲和素的混合物与细胞一起培养。在明场和荧光中扫描了总共 52,000 个纳米孔，以识别含有分泌抗体（AF647+）并与 EGFR（AF488+）结合呈阳性的 B 细胞的纳米孔。

将图像居中，绿色轮廓自动分配至待挑取的孔和 B 细胞。（A）荧光特异性 647 nm 发射图像（RED）；观察到相邻的两个孔含有 ASC。（B）荧光特异性 488 nm 发射图像（GREEN）；观察到相邻的一个孔含有 EGFR 特异的 ASC。（C）647 和 488 nm 通道的图像叠加；（D）明场图像，用于挑取 EGFR+ASC。从纳米孔挑取 EGFR+ASC 之前（E）和之后（F）的明场图像。明场图像显示纳米孔内的所有内容物都已挑取。

Matacho 等人，（2022），《抗体治疗学》，第 5 卷，第 1 期，2022 年 1 月，第 11-17 页

CellCelector 在杂交瘤筛选中的优势

杂交瘤分泌分析

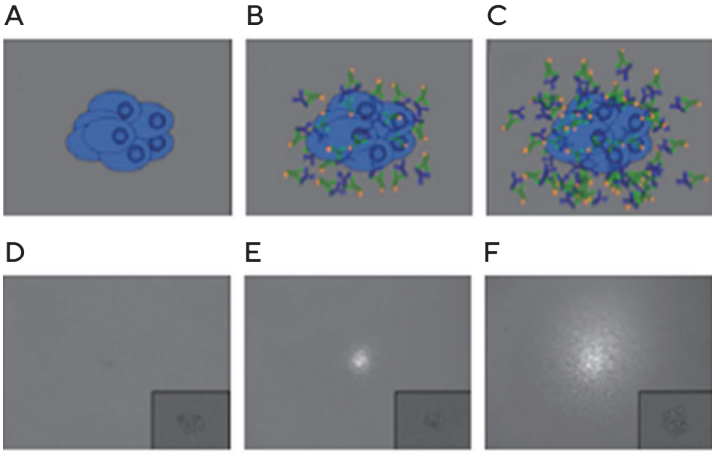
分泌的抗体通过荧光标记的二抗显现，在产生杂交瘤的周围形成光晕。CellCelector 软件通过比较细胞集落的大小和光晕的直径来计算抗体产生水平，从而根据多个孔板的抗体产生情况对杂交瘤进行排序（图 5）。

图 6 展示了在半固体培养基上生长的稳定转染的 CHO 细胞系分泌蛋白的数据示例。

微球和试剂

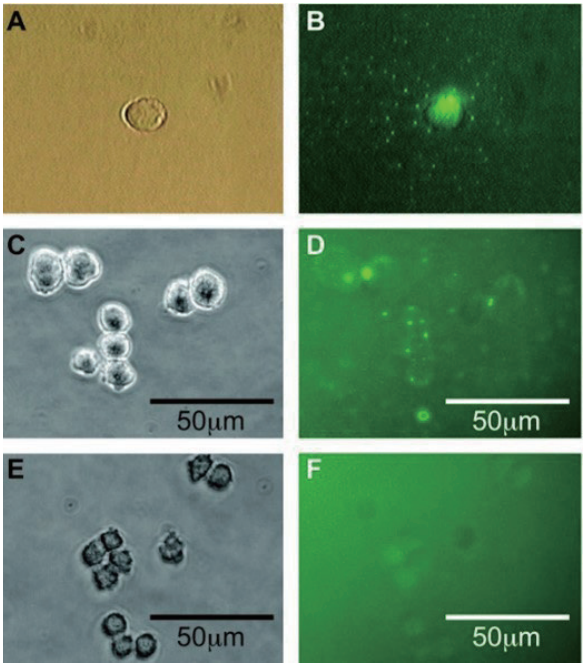
赛多利斯 iQue Qbeads® 系列试剂提供捕获不同特定蛋白的微球类型，以便对细胞因子、粘附分子、酶、生长因子进行多重定量分析。iQue Qbeads® 可以可靠地进行 CellCelector 单细胞分泌分析。

图 5. 杂交瘤分泌分析



注：A-C：化学视图；D - F：明场和荧光成像。不产生抗体的集落（A 和 D）；产生中等量抗体的集落（B 和 E）；产生大量抗体的集落（C 和 F）。

图 6. 在半固体培养基中通过荧光标记检测稳定转染的 CHO 分泌的 IGF-E5



注：A、C 和 E：透射光图像。B、D 和 F：半固体培养基中存在的抗 His Tag/FITC 抗体在 510 nm 处发出绿色荧光；由抗 His Tag/FITC 与带有 His Tag 部分的分泌 IGF-E5 反应形成的荧光点。A 和 B：单个细胞曝光时间较长，显示荧光点云。C 和 D：阳性 CHO-IGF-E5 集落：信号较弱，但足以检测到高产细胞。E 和 F：阴性对照；分泌无关产物的 CHO 细胞不与抗 His Tag 抗体发生反应。

Caron 等人，（2009），在半固体培养基中进行荧光标记，以筛选分泌高水平重组蛋白的哺乳动物细胞。

销售与服务联系方式

更多联系信息，请访问

www.sartorius.com.cn

赛多利斯（上海）贸易有限公司
邮箱 leadscn@sartorius.com
服务热线 400 920 9889 | 800 820 9889

上海
上海市浦东新区盛荣路 388
弄百佳通产业园 3 号楼
7 - 11 层，200120
电话 +86 21 6066 6100

北京
北京市顺义区安祥街 12 号
环普国际科创园 4 号楼
6 层，101318
电话 +86 10 8042 6300

广州
广州市越秀区水荫路 117 号
1105 单元，510075
电话 +86 20 3761 7284

苏州
苏州市虎丘区科技城锦峰路
158 号 101park-28 幢 201，
215163
电话 +86 512 6616 0490

成都
成都市上东大街 246 号新良
大厦 2618 室，610012
电话 +86 28 8666 6877

西安
西安市和平路 118 号和平银
座 1107 室，710001
电话 +86 29 8751 2305

技术规格如有变更，恕不另行通知。
赛多利斯保留最终解释权和修改权。

版本 10 | 2023

关注赛多利斯实验室

登入赛多利斯云助手