FGF21-Fc 融合蛋白体外活性试验的建立和优化

徐金华[1,2]，赵文鹏[3]，赵丽丽[1,2]，曹 宇[1,2]，彭 伟[1]，刘 忠[4*]
（1. 山东新时代药业有限公司，山东临沂 273400；2. 哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室，山东临沂 273400；
3. 沈阳药科大学，辽宁沈阳 110016；4. 鲁南制药集团股份有限公司，山东临沂 276000）

摘要：成纤维细胞生长因子 -21（FGF21）-Fc 融合蛋白体外活性试验的建立分为蛋白水平的结合活性试验和细胞水平的生物学活性试验 2 种。该研究建立了均相时间分辨荧光（HTRF）法用于检测 FGF21-Fc 融合蛋白与 β-Klotho 配体蛋白的结合活性；并自主构建了报告基因细胞，当 FGF21-Fc 融合蛋白与 β-Klotho 的结合，激活其 FGF 受体和诱导胞内信号转导所必需的共同受体，可通过检测萤光素酶活性，间接定量测定生物学活性。在建立过程中，分别对结合活性试验中样品和配体的浓度、供体和配体的稀释比例以及孵育时间进行优化，并进行了方法学验证，证明该 HTRF 技术具有良好的重复性和特异性，可用于 FGF21-Fc 融合蛋白和 β-Klotho 的结合活性检测。随后，对生物学活性试验中胎牛血清的浓度、报告基因细胞的密度、试验板的类型以及细胞种板形式进行优化，并进行了方法学验证，证明该报告基因法具有良好的重复性和特异性，可用于 FGF21-Fc 融合蛋白的生物学活性检测。本研究建立了 FGF21-Fc 融合蛋白的质控方法，为有同样活性检测难点的药物提供了一种分析技术参考，填补了国内外空白。

关键词：成纤维细胞生长因子 -21；均相时间分辨荧光；结合活性；报告基因法；生物学活性
中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2023）04-0545-09
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.04.010

Establishment and Optimization of FGF21-Fc Fusion Protein Activity Assay *in vitro*

XU Jinhua[1,2], ZHAO Wenpeng[3], ZHAO Lili[1,2], CAO Yu[1,2], PENG Wei[1], LIU Zhong[4*]
(*1. Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400; 2. State Engineering Lab. of High Expression of Mammalian Cells, Linyi 273400; 3. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 4. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000*)

ABSTRACT: The establishment of the fibroblast growth factor 21 (FGF21)-Fc fusion protein *in vitro* activity test can be divided into binding assay at the protein level and biological assay at the cell level. This study established a homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) method to detect the binding activity of FGF21-Fc fusion protein and β-Klotho ligand protein. And the reporter gene cells were constructed independently to test biological activity. When the FGF21-Fc fusion protein binded with β-Klotho, the FGF receptor and the intracellular signal transduction were activated to further affect luciferase activity, which could be used to monitor and quantitatively measure biological activity indirectly. During the establishment process of the binding assay, the sample and ligand concentrations, dilution ratios of donor and acceptor, and incubation time were optimized comprehensively. And methodological verification was carried out to prove that the HTRF technology had good repeatability and specificity and this method could be used to detect the binding activity of FGF21-Fc fusion protein and β-Klotho. Later, the fetal bovine serum concentration, density of report gene cells, plate type, and cells in the plate form in bioactivity assay were optimized. And methodological verification was carried out to prove that the reporter gene method had good repeatability and specificity and this method could be used to test the biological activity of FGF21-Fc fusion protein. In this study, a quality control method for FGF21-Fc fusion protein was established, which provided a reference for analysis technology of drugs with the same activity detection difficulties, filling the gap at home and abroad.

Key Words: fibroblast growth factor 21; homogeneous time-resolved fluorescence; binding activity; reporter gene method; biological activity

成纤维细胞生长因子-21（fibroblast growth factor 21，FGF21）是具有调节内分泌功能的细胞因子，主要表达于肝脏[1—2]。FGF21信号通路是治疗非酒精性脂肪肝、肥胖、2型糖尿病和高脂血症等病症的潜在优良靶点。FGF21的N和C末端都与其生物活性密切相关[3]。在发挥作用时，辅助因子β-Klotho首先与FGF21 C端直接结合，引起FGF21构象变化，再结合成纤维细胞生长因子受体（FGFR），进一步激活FGFR及其他下游相关信号分子，发挥其生物效应[4]。

体外表达的野生型FGF21修饰减少、结构不稳定、相关活性减弱，因此对野生型FGF21进行修饰或改造是研究热点之一。IgG型免疫球蛋白的Fc具有许多功能，如延长半衰期、成二聚体利于与受体结合等[5—6]。由于结构同源性，Fc融合蛋白表现出的体外药物代谢动力学特性与同类型的人源IgG相当。因此，考虑对人源FGF21 C端进行改造，将其与IgG1 Fc通过一段柔性短肽（L）连接，构建融合蛋白FGF21-L-Fc，使其既具有FGF21的疗效，又有Fc的特性。但由于融合蛋白比野生型FGF21多了一段Fc结构，增加了空间位阻，始终无法建立基于酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）的结合活性检测方法。

均相时间分辨荧光（homogeneous time-resolved fluorescence，HTRF）法结合了荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer，FRET）和时间分辨荧光（time resolved fluorescence，TRF）2种技术的特点。选择合适的供体和受体分别标记待测药物和作用蛋白，当生物分子相互作用时，供体和受体相互靠近，在外来激发光的作用下，供体释放能量，通过FRET效应，激发受体发射荧光[7—8]，采用TRF技术可实时检测FRET效应，因此HTRF法可用于检测结合活性。

本研究利用HTRF技术，建立并优化了FGF21-Fc融合蛋白和β-Klotho配体的结合活性检测方法，并自主构建了可表达萤光素酶的报告细胞，当β-Klotho配体与FGF21-Fc融合蛋白结合，可激活FGFR和其他诱导胞内信号转导所必需的共同受体，进而影响萤光素酶活性，通过检测最终的化学发光就可以间接监测、定量分析FGF21的活性。本试验建立了FGF21-Fc融合蛋白的质控方法，为有同样活性检测难点的药物提供了一种分析技术参考，填补了国内外空白。

1　仪器与试药

Synergy Neo2型多功能酶标仪（德国Biotek公司）；Pico17型高速台式离心机、BB15型二氧化碳培养箱（美国Thermo Fisher公司）；Bright-Glo型萤光素酶检测系统（美国Promega公司）；384孔板［格瑞纳生物科技（上海）有限公司］。

注射用重组人FGF21-Fc融合蛋白［F526，批号F526201803K002，（－80±10）℃保存］、不同批次的F526原液和F526粗纯品［为注射用重组人FGF21-Fc融合蛋白的中间产品，对照用，（－80±10）℃保存］和CD20单克隆抗体［批号201612e001，（5±3）℃保存］均由山东新时代药业有限公司自主生产；磷酸盐缓冲液（PBS，0.01 mol/L，pH 7.4，北京索莱宝科技有限公司）；牛血清白蛋白（BSA，国药集团化学试剂有限公司）；Tween-20（德国Merck公司）；杜氏磷酸盐缓冲液（DPBS）、细胞消化液、DMEM培养基、胎牛血清（FBS）、1640培养液、StemPro® Accutase®细胞解离试剂、与受体XL665偶连的抗Fc抗体（PAb anti-human IgG-XL665，XLR）、与Tb偶连的抗his标签的抗体（Mab Anti 6 HIS-Tb Cryptate Gold，ER）均购自法国Cisbio公司；人源β-Klotho（批号MNO3917041）和鼠源β-Klotho（批号IJB4517101）均购自德国R&D公司。

HEK293细胞株购自金斯瑞生物科技股份有限公司。

2　方法与结果

2.1　HTRF法检测F526的结合活性

2.1.1　基本原理

本研究采用的FGF21-Fc融合蛋白带有Fc标签，可以和XLR结合。配体蛋白人源β-Klotho带有his

收稿日期：2022-11-14

基金项目：山东省重点研发计划（泰山产业领军人才工程）（2018TSCYCX-30、tscy20200329）

作者简介：徐金华（1987—），女，硕士，从事药物质量表征研究。

通信作者：刘　忠（1975—），男，博士，高级研究员，从事蛋白药物研究与开发。

E-mail：clevertree@163.com

标签，可以和 ER 结合。当 FGF21-FC 融合蛋白与其配体蛋白人源 β-Klotho 或者人源 FGFR 结合时，供体 ER 和受体 XLR 相互靠近、发生 FRET 效应，采用 330 nm 激发光照射时可分别产生 620 nm 的供体发射光和 665 nm 的受体发射光，通过相对荧光信号强度，可计算得到 FGF21-Fc 融合蛋白与其配体蛋白的 EC_{50} 值。

2.1.2 溶液配制

稀释液：PBS，含 0.01% BSA 和 0.05% Tween-20。

贮备液：XLR 和 ER（均为厂家推荐的 5 000 tests）分别加入超纯水 0.25 mL，轻柔混匀，作为贮备液，分装后冻存于 －20 ℃。

工作液：根据试验计算用量，用稀释液分别将 XLR 和 ER 的贮备液稀释 100 倍（试剂推荐用量）。

配体蛋白：用稀释液将配体蛋白人源 β-Klotho 稀释至 16 μg/mL（体系终质量浓度为 2 μg/mL），4 ℃避光保存备用。

F526 样品：用稀释液将 F526（4 mg/mL）4 倍稀释 14 个梯度。

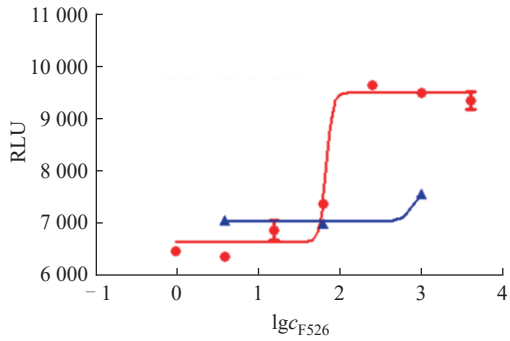
CD20 对照样品：用稀释液将 CD20 单克隆抗体（4 mg/mL）4 倍稀释 14 个梯度。

2.1.3 结合活性检测

设置反应体系为 20 μL，即 F526 样品 5 μL+ 配体蛋白 5 μL+ER 工作液 5 μL+ XLR 工作液 5 μL，置 384 孔板中，每个浓度 2 孔。由于体积较小，加样过程应避免产生气泡和剧烈振荡；覆膜，在室温下静置孵育 1 h，采用酶标仪测量，激发波长为 330 nm，发射波长为 620 和 665 nm。读取吸光度（OD）数据，并根据式①计算相对光单位（RLU）。

$$RLU=OD_{665\ nm}/OD_{620\ nm}\times 10\ 000 \quad ①$$

试验结果如图 1 和表 1 所示，去除上平台和下平台多余的点，梯度起始质量浓度改为 40 μg/mL；线性区的数据点只有 1 个，会导致 EC_{50} 计算不准确。作为对照的 CD20 没有形成梯度，表明该试验具有一定特异性。下一步将稀释倍数由 4 倍降低为 2 倍；此外，窗口（即 RLU 峰谷比）仅为 1.4，数值较小，也需优化。



●—F256-RS（F526201803K002）；▲—CD20（201612e001）。

图 1 HTRF 法检测 F526 与人源 β-Klotho 的结合活性（*n*=2）

Fig.1 The Binding Activity of F526 and Human β-Klotho Detected by HTRF Method（*n*=2）

表 1 HTRF 法检测 F526 与人源 β-Klotho 的结合活性数据（*n*=2）

Tab.1 The Binding Activity Data of F526 and Human β-Klotho Detected by HTRF Method（*n*=2）

参数	F526-RS（F526201803K002）	CD20（201612e001）
RLU谷值	6 647	7 032
RLU峰值	9 491	7 742
lgEC_{50}	1.83	2.91
斜率	10.83	5.76
EC_{50}/（ng·mL^{-1}）	67.28	803.2

2.2 结合活性检测条件的优化

2.2.1 人源 β-Klotho 浓度

F526 起始质量浓度为 40 μg/mL（体系终质量浓度 10 μg/mL），2 倍稀释 12 个梯度；人源 β-Klotho 稀释至质量浓度为 32 μg/mL（体系终质量浓度为 8 μg/mL）；其他条件同“**2.1.3**”项，检测 F526 和配体结合活性。当人源 β-Klotho 质量浓度为 32 μg/mL（体系终质量浓度为 8 μg/mL）时，结果如图 2 所示，峰谷比为 1.73（谷值为 5 915，峰值为 10 229），试验结果窗口略有提高，增加了本试验方法的可行性和可优化性。由此可见，大幅增加人源 β-Klotho 浓度对该法的检测结果有改进作用。但为了节省试剂成本，也为了观察中间浓度的拓展空间，下一步选用质量浓度为 24 μg/mL（体系终质量浓度为 6 μg/mL）的人源 β-Klotho 进行其他条件的优化。

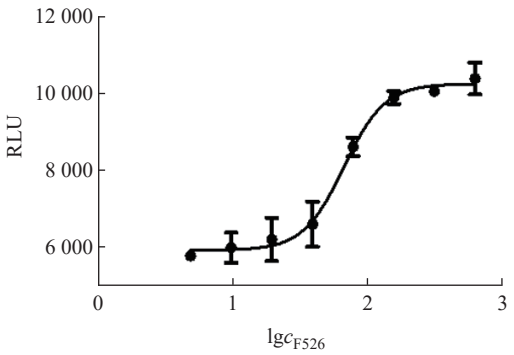


图 2　HTRF 法检测 F526 与人源 β-Klotho 的结合活性（*n*=2）

Fig.2　The Binding Activity of F526 and Human β-Klotho Detected by HTRF Method (*n*=2)

2.2.2 XLR 和 ER 稀释比例

将人源 β-Klotho 和鼠源 β-Klotho 分别稀释至质量浓度为 24 μg/mL（体系终质量浓度为 6 μg/mL），目的是先使配体蛋白浓度保持绝对过量，再进一步优化。照表 2 所示的方案，用稀释液稀释 XLR 和 ER，并增加孵育时间点的检测，其他条件同“**2.1.3**”项，结果如图 3、表 3 所示。

表 2　XLR 和 ER 稀释方案①～④

Tab.2　Dilution Protocols ① – ④ for XLR and ER

方案	β-Klotho（6 μg/mL）	XLR 稀释倍数	ER 稀释倍数
①	人源	20	100
②	人源	100	20
③	人源	20	20
④	鼠源	20	20

结果显示，孵育 30 min 时 R^2 较小，孵育 60 min 及以后的 R^2 均 >0.95，说明在前 60 min，分子间发生的结合不完全，导致检测结果不稳定，因此以孵育 60 min 以后的结果作为判断依据。孵育 60 min 以后，方案①和方案③的结果相差不大，说明 ER 的质量浓度对增大窗口影响不大；而方案③的窗口比方案②更高，说明 XLR 的浓度对窗口的改进具有关键影响。

为进一步探索 XLR 和 ER 稀释比例的优化空间，分别将人源 β-Klotho 稀释至 6 和 2 μg/mL，用稀释液照表 4 所示方案的比例稀释 XLR 和 ER，其他条件同“**2.1.3**”项。

表 3　不同 XLR 和 ER 稀释比例和孵育时间下的结合活性结果

Tab.3　Results of Binding Activity under Different XLR and ER Ratios and Incubation Time

结合时间/min	参数	方案①	方案②	方案③	方案④
30	RLU 谷值	5 475	3 314	4 477	4 961
	RLU 峰值	10 800	4 274	10 329	11 332
	EC_{50}/(ng·mL^{-1})	172.4	36.7	248.0	168.1
	R^2	0.944 7	0.895 0	0.972 6	0.985 8
	窗口	1.97	1.29	2.31	2.28
60	RLU 谷值	4 143	2 593	3 638	3 702
	RLU 峰值	9 567	3 543	8 841	11 835
	EC_{50}/(ng·mL^{-1})	232.2	54.2	259.3	239.7
	R^2	0.991 7	0.974 7	0.994 1	0.989 2
	窗口	2.31	1.37	2.43	3.20
100	RLU 谷值	3 995	2 378	3 583	3 499
	RLU 峰值	9 720	3 562	8 986	11 406
	EC_{50}/(ng·mL^{-1})	231.7	38.3	224.9	251.5
	R^2	0.978 9	0.961 0	0.994 5	0.989 9
	窗口	2.43	1.50	2.51	3.26
150	RLU 谷值	3 734	2 128	3 257	3 267
	RLU 峰值	8 884	3 334	8 784	10 287
	EC_{50}/(ng·mL^{-1})	212.4	41.8	234.1	263.8
	R^2	0.986 4	0.976 5	0.993 1	0.989 2
	窗口	2.38	1.57	2.70	3.15

表 4　XLR 和 ER 稀释方案⑤～⑩

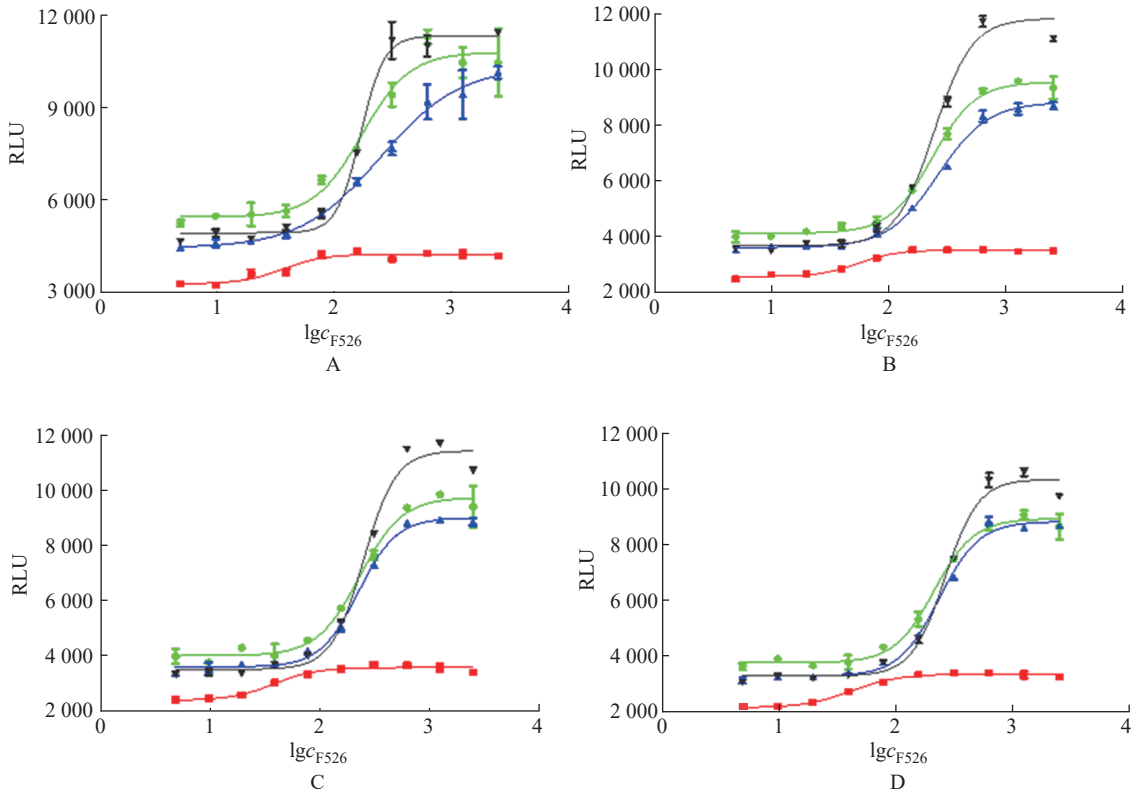
Tab.4　Dilution Protocols ⑤ – ⑩ for XLR and ER

方案	β-klotho/(μg·mL^{-1})	XLR 稀释倍数	ER 稀释倍数
⑤	6	20	20
⑥	6	50	50
⑦	6	20	50
⑧	2	20	20
⑨	2	20	50
⑩	2	50	50

由于方案⑤到方案⑩是在 2 个不同的 384 孔板上做的，所以为了数据之间具有可比性，采用 RLU 的实测值与最小值的比值（RRLU）作为纵坐标进行数据处理；本次试验也增加了孵育时间点的检测，结果如图 4、表 5 所示。

结果显示，孵育时间较长时检测窗口较大，而所得的 EC_{50} 值在同一数量级，差异不大，说明本方法的重复性较好。

结果显示，当 XLR 稀释 20 倍、ER 由 20 倍降低为 50 倍稀释时，结果几乎没有影响，说明 ER 可以降低为 50 倍稀释；而当 ER 稀释 50 倍、XLR 由 20 倍降低为 50 倍稀释时，结果相差较大，检测窗



A—孵育 30 min；B—孵育 60 min；C—孵育 100 min；D—孵育 150 min。

■—方案①；■—方案②；▲—方案③；▼—方案④。

图 3 不同 XLR 和 ER 稀释比例（方案①～④）和孵育时间下的结合活性结果（*n*=2）

Fig.3 Results of Binding Activity under Different XLR and ER Ratios (Schemes ① – ④) and Incubation Time (*n*=2)

表 5 不同 XLR 和 ER 稀释比例（方案⑤～⑩）和孵育时间下的结合活性结果

Tab.5 Results of Binding Activity under Different XLR and ER Ratios (Schemes ⑤ – ⑩) and Incubation Time

孵育时间/min	参数	方案⑤	方案⑥	方案⑦	方案⑧	方案⑨	方案⑩
100	RRLU 谷值	0.961	1.016	0.997	0.992	1.009	0.967
	RRLU 峰值	1.895	1.530	2.036	2.027	2.050	1.556
	EC_{50}/(ng·mL^{-1})	193.0	101.4	237.7	242.9	267.4	222.3
	R^2	0.990 8	0.964 7	0.989 3	0.977 9	0.990 5	0.956 7
	窗口	1.97	1.51	2.04	2.04	2.03	1.61
140	RRLU 谷值	1.019	1.008	1.021	1.048	1.053	1.054
	RRLU 峰值	2.102	1.630	2.168	2.196	2.208	1.630
	EC_{50}/(ng·mL^{-1})	263.8	106.8	255.1	239.2	236.4	119.5
	R^2	0.982 4	0.985 8	0.993 8	0.985 8	0.994 0	0.969 0
	窗口	2.06	1.62	2.12	2.10	2.10	1.55

口变窄、R^2 降低，说明 XLR 应保持 20 倍稀释。比较方案⑤和方案⑧，人源 β-Klotho 终质量浓度由 6 μg/mL 降低为 2 μg/mL 时所得的结果无差异。

综上所述，最终反应条件确定为方案⑨，即 XLR 稀释 20 倍，ER 稀释 50 倍，人源 β-Klotho 终质量浓度为 2 μg/mL。

2.3 检测方法的特异性评价

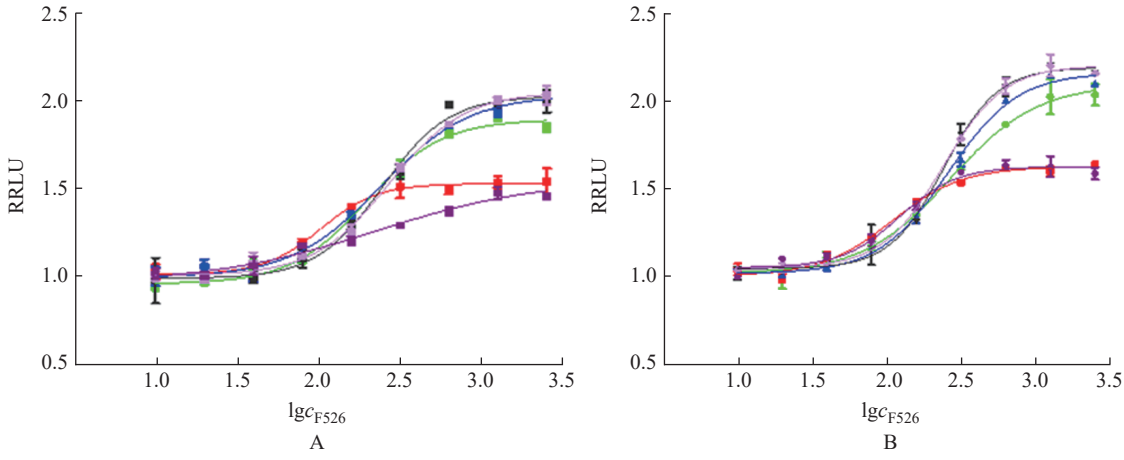
F526 的 Fc 端为 IgG2 亚型，因此选择 IgG2 蛋白作为同型对照，并进行同法处理。试验结果（图 5A）表明，人源 β-Klotho 与 IgG2 之间不存在结合；图 5B 中名称为“F526201803I003 洗涤 2”的样品为 F526 粗纯品，目标组分的含量相对较低，故而

其结合窗口小于原液样品。用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液将 F526 的 pH 调至 10.0±0.2，在光照条件下［(4 500±500) lx，2 ～ 8 ℃］放置 10 d，经分子排阻色谱法（SEC-HPLC）检测，单体纯度可降低至 85%，表明经碱处理破坏后，其结合窗口明显降低。综上所述，本方法的特异性良好。

2.4　生物学活性试验

2.4.1　构建报告基因细胞和检测原理

以 HEK293 细胞株为宿主细胞，构建过表达 β-Klotho、与 Elk1 结合的 GAL4 DNA 结合域（GAL4 DNA-binding domain fused to Elk1，GAL4DB-Elk1）和 5×UAS 萤光素酶（5×UAS-firefly luciferase，

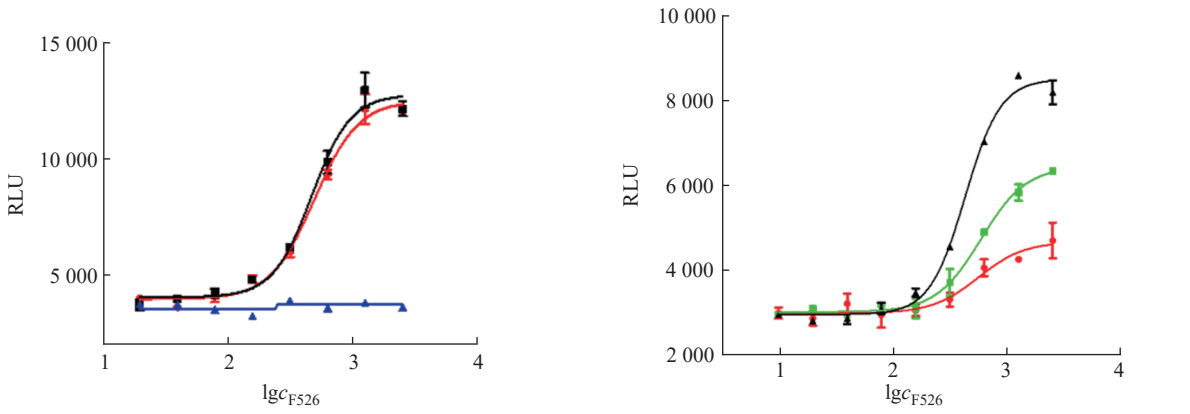


A—孵育 100 min；B—孵育 140 min。

■—方案⑤；■—方案⑥；■—方案⑦；■—方案⑧；■—方案⑨；■—方案⑩。

图 4　不同 XLR 和 ER 稀释比例（方案⑤～⑩）和孵育时间下的结合活性结果（*n*=2）

Fig.4　Results of Binding Activity under Different XLR and ER Ratios (Schemes ⑤ – ⑩) and Incubation Time (*n*=2)



●—F256原液20180102；■—F256-RS (F526201803K002)；▲—IgG2。

●—F256-RS (F526201803K002)+1 mol/L 氢氧化钠溶液；■—F256201803I003洗涤2；▲—F256-RS (F526201803K002)。

A—FGF21-Fc 融合蛋白和 IgG2 与人源 β-Klotho (2 μg/mL) 的结合能力（孵育 120 min）；

B—FGF21-Fc 融合蛋白的粗纯品和碱破坏样品与人源 β-Klotho (2 μg/mL) 的结合能力（孵育 160 min）。

图 5　HTRF 试验的特异性（*n*=2）

Fig.5　Specificity of HTRF Assay (*n*=2)

5×UAS-Luc）目的基因的稳定细胞株。5×UAS-Luc 为含有 5 个串联 Gal4 的萤光素酶报告分子。β-Klotho 是 FGF21 激活 FGFR 和诱导胞内信号转导所必需的共同受体，与 FGF21 结合后可进一步使细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinases，Erk）和细胞转录因子（ETS-like protein，ELK）磷酸化。萤光素酶活性受磷酸化 Erk/ELK1 水平的调节，可用于间接监测和定量测定 FGF21 活性。

2.4.2 生物学活性检测方法

取对数生长期的报告细胞，用试验缓冲液（不含 FBS 的 1640 培养基或者含 FBS 的 1640 培养基）5 mL 重悬细胞并计数，调整细胞密度；取 96 孔板，每孔加入细胞悬浮液 50 μL 和待测样品 50 μL。边缘孔加入 DPBS 100 μL，以防止边缘效应。把培养板置（37±2）℃、（5±1）% CO_2 培养箱中培养 6 h，然后每孔加入萤光素酶定量检测试剂 60 μL，室温避光孵育 5 min，在室温下采用酶标仪检测发光强度，读取相对发光强度，按式②结算比活。

$$比活 = (EC_{50,\ 供试品}/EC_{50,\ 标准品}) \times 100 \qquad ②$$

2.5 生物学活性检测方法的优化

2.5.1 细胞密度

取 3 个批次细胞，照“**2.4.2**”项下方法操作，分别采用含 0、1.0%、4.5%和 9.0% FBS 的 1640 培养基 5 mL 作为试验缓冲液重悬细胞并计数。将细胞密度分别调整为每 1 mL 2×10^5、4×10^5 个细胞。采用不同批次细胞分别验证试验缓冲液中不同的 FBS 含量，以及不同的细胞密度对生物学活性检测平台的影响，结果如图 6 所示。

结果显示，不同批次的细胞均表现为：试验缓冲液中不含 FBS 时 RRLU 值较大，且相比每 1 mL 2×10^5 个细胞，细胞密度为每 1 mL 4×10^5 个细胞时 RRLU 值更高。

因此选择不含 FBS 的 1640 培养基，细胞接种密度为每 1 mL 4×10^5 个细胞进行后续试验。

2.5.2 报告基因细胞的密度

应用 384 孔板，试验缓冲液为不含 FBS 的 1640 培养基，分别考察不同的细胞密度对生物学活性检测平台的影响以及评估连续读板间的差异程度。

因为培养基中不含 FBS，所以提前 12 h 饥饿接种，使细胞贴壁培养。将细胞密度调整为每 1 mL 1×10^5、2×10^5 个细胞，加至 384 孔板中，每孔 50 μL，培养过夜。弃去板中的培养液，每孔加入待测样品 50 μL，其中待测样品分别为 F256（起始质量浓度为 2 mg/mL）以及活性只有 F526 1/3 的样品（F256-0.33，起始质量浓度为 0.67 mg/mL），孵育 6 h 后，对试验板连续读数 8 次，验证体系的稳定性。

结果如表 6 所示，细胞密度为每 1 mL 2×10^5 个细胞时，2 种待测样品的比活值与理论值基本无差异；细胞密度为每 1 mL 1×10^5 个细胞时，2 种待测样品的比活值与理论值差异较大。由此初步确定，细胞种板密度为每 1 mL 2×10^5 个细胞，且提前一夜接种使细胞贴壁时，选用高通量的 384 孔板是可行的。

表 6 比活值测定结果 [1)]/%

Tab.6 Determination Results of Specific Activity/%

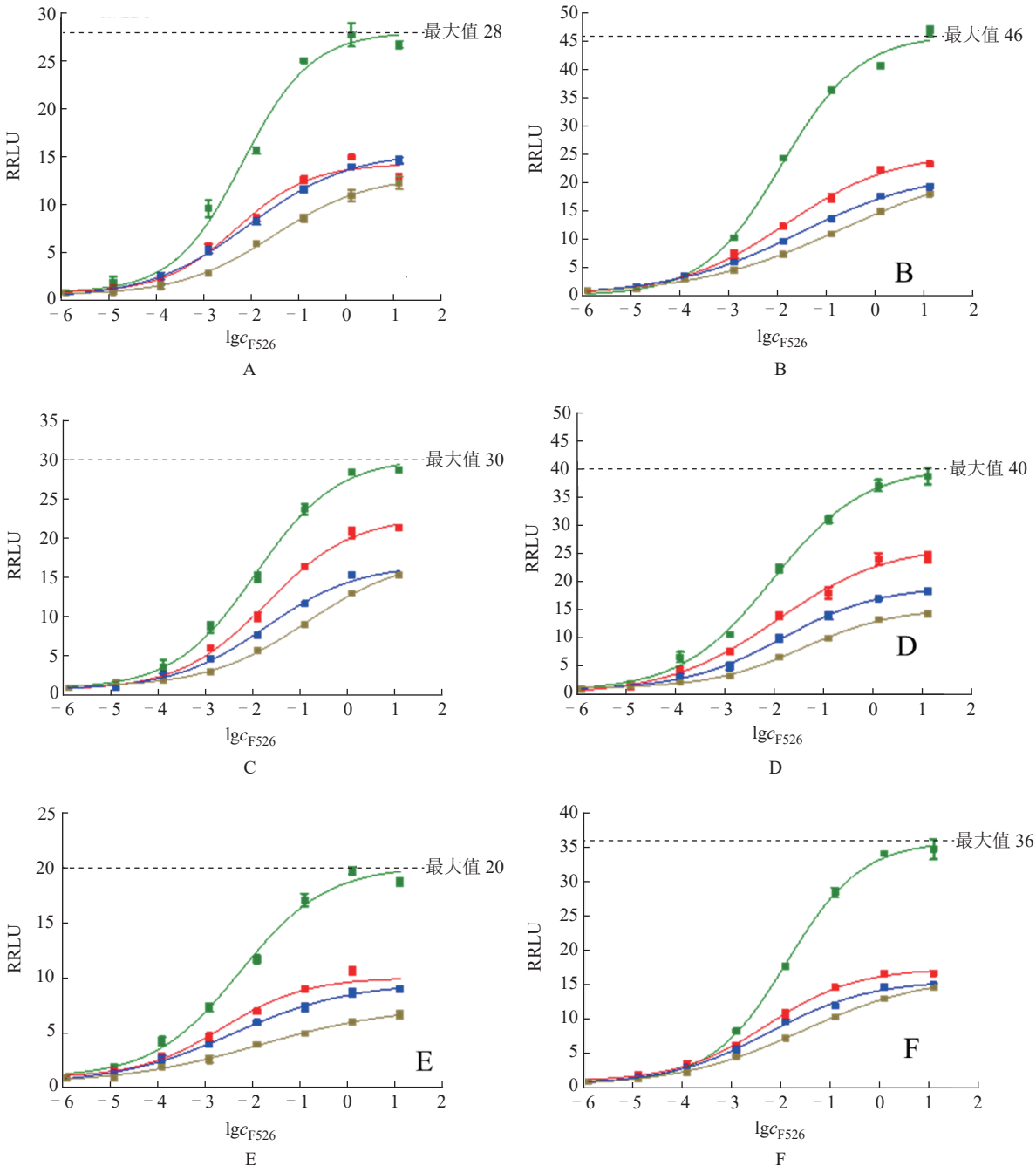
检测次数	细胞密度	
	每1 mL 2×10^5个细胞	每1 mL 1×10^5个细胞
1	28	50
2	30	64
3	31	76
4	32	91
5	33	120
6	34	149
7	37	176
8	38	189

注：[1)] 采用 384 孔板，缓冲液均为不含 FBS 的 1640 培养基，理论比活值均为 33%。

综上所述，本研究初步确定了试验板类型、试验缓冲液成分、细胞密度以及细胞种板方式，使曲线的上平台、下平台，以及 EC_{50} 上下检测点均符合“S”型曲线标准。

2.6 样品检测

应用 384 孔板，试验缓冲液为不含 FBS 的 1640 培养基，将细胞密度调整为每 1 mL 2×10^5 个细胞，待测样品（注射用重组人 FGF21-Fc 融合蛋白）的起始质量浓度为 2 mg/mL，之后 2 个浓度点为 3 倍稀释，之后 8 个浓度点为 4 倍稀释，共计 11



A—批次 1，每 1 mL 2×10^5 个细胞；B—批次 1，每 1 mL 4×10^5 个细胞；C—批次 2，每 1 mL 2×10^5 个细胞；D—批次 2，每 1 mL 4×10^5 个细胞；E—批次 3，每 1 mL 2×10^5 个细胞；F—批次 3，每 1 mL 4×10^5 个细胞。

■— 不含FBS；■— 1% FBS；■— 4.5% FBS；■— 9% FBS。

图 6　96 孔板中 FBS 的浓度和细胞密度的影响（*n*=2）

Fig.6　Effects of FBS Concentration and Cell Density in 96-Well Plates (*n*=2)

个浓度点，4 复孔。试验重复 3 次，每次 2 个复孔，检测结果如图 7 所示。

综上所述，选用高通量的 384 孔板，以细胞接种密度为每 1 mL 2×10^5 个细胞，且提前 12 h 接

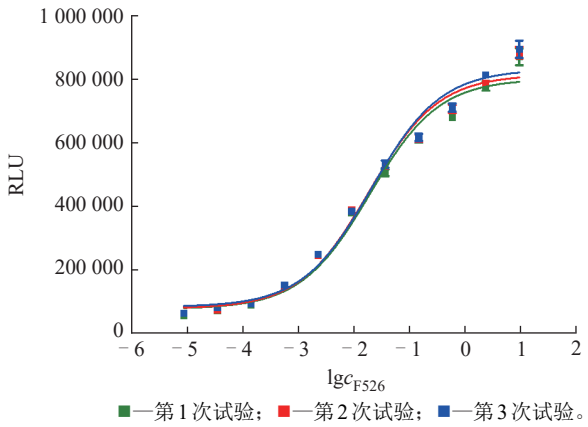


图 7 F526 的生物学活性检测结果（*n*=2）

Fig.7 Biological Activity Assay Results of F526 (*n*=2)

种到试验板中使细胞贴壁时，方法的稳定性和重现性良好。3 次重复试验测得 F526 的 EC_{50} 值分别为 0.019 73、0.019 13 和 0.021 13 mg/mL，基本无差异。

3 讨论

针对 F526，本研究自主开发了 2 种靶点活性检测方法，填补了国内外空白。结果显示，HTRF 技术可以检测 FGF21-Fc 融合蛋白与其配体人源 β-Klotho 的结合活性，且该试验具有良好的重复性和特异性。然而，该方法的检测窗口仅接近 3 倍，需进一步探索优化试剂，以拓宽窗口和改善重复性。通过自主构建的 FGF21 报告细胞株，建立了基于报告基因法的 FGF21-Fc 融合蛋白生物学活性检测方法。验证试验表明，该方法稳定性和重复性良好。值得注意的是，在 2 种方法用于放行检测之前，须照 ChP 2020 四部通则 9101 分析方法验证指导原则进行全面的方法学验证。

参考文献：

[1] NISHIMURA T, NAKATAKE Y, KONISHI M, *et al*. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1492**(1): 203-206.

[2] KHARITONENKOV A, SHIYANOVA T L, KOESTER A, *et al*. FGF-21 as a novel metabolic regulator [J]. *J Clin Invest*, 2005, **115**(6): 1627-1635.

[3] YIE J, HECHT R, PATEL J, STEVENS J, *et al*. FGF21 N- and C-termini play different roles in receptor interaction and activation [J]. *FEBS Lett*, 2009, **583**(1): 19-24.

[4] ADAMS A C, CHENG C C, COSKUN T, *et al*. FGF21 requires β-klotho to act *in vivo* [J]. *PLoS ONE*, 2012, **7**(11): e49977.

[5] PETKOVA S B, AKILESH S, SPROULE T J, *et al*. Enhanced halflife of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease [J]. *Int Immunol*, 2006, **18**(18): 1759-1769.

[6] JONES T D, HANLON M, SMITH B J, *et al*. The development of a modified human IFN-*α*2b linked to the Fc portion of human IgGl as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2004, **24**(9): 560-572.

[7] DEGORCE F, CARD A, SOH S, *et al*. HTRF: a technology tailored for drug discovery-a review of theoretical aspects and recent applications [J]. *Curr Chem Genomics*, 2009, **3**: 22-32.

[8] HONG L, QUINN C M, JIA Y. Evaluating the utility of the HTRF transcreener ADP asay technology: a comparison with the standard HTRF assay technology [J]. *Anal Biochem*, 2009, **391**(1): 31-38.