

简介

Anti-Human IgG(H+L), AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)是专为抗体内化研究开发的一种工具试剂。Anti-Human IgG(H+L), AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)通过将能特异识别人IgG的纳米抗体与pH敏感型Deep Red630荧光探针偶联, 提供一种将pH敏感型Deep Red630探针与目的检测抗体特异性偶联的标记试剂。整个标记过程不破坏抗体结构, 耗时短, 操作简单, 可标记所有具有人IgG片段的抗体或者融合蛋白。同时, Anti-Human IgG(H+L), AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)十分稳定, 还可与BSA、胎牛血清及其他稳定蛋白兼容, 不会与常用实验体系中的物质有任何交叉影响。Anti-Human IgG(H+L), AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)是一种高效的抗体内化检测工具, 可有效作为ADC候选抗体成药前评估工具。

特性

偶联物	pH敏感型染料Deep Red630 (激发: 640nm, 发射: 655nm)
特异性	特异性结合人IgG 片段(H+L), 不与鼠、兔、山羊IgG等交叉反应
浓度	0.5mg/ml
分子量	15kDa
保存液	10mM PBS (pH 7.4), 50% Glycerol
储存条件	-20 °C(避免反复冻融), 注意避光保存
保质期	在妥善储存的情况下, 至少可保持稳定12个月
推荐使用比例*	抗体内化测试: 2ug试剂/每10ug待测试抗体

*在具体实验中使用比例可根据实验需求进行调整, 试剂与抗体使用时推荐的摩尔比为2:1。

背景知识

Deep Red630具有一种最适激发和发射分别为640/655nm的pH敏感荧光型荧光探针, 其荧光发射强度随着酸度的增加而增加。这种增加在pH 4.5-9范围内尤其显著, 这在内吞囊泡中最常见。Deep Red630在细胞外环境中(中性, pH约7.2-7.4)基本无荧光; 然而, 在内化后在内体的酸性环境中发出明亮的荧光信号。

纳米抗体(VHH)是来源于骆驼科免疫球蛋白重链可变区的单结构域抗体。与其他形式的抗体片段相比, VHH的体积极小(<15KDa), 这显著增加了VHH的通透性以及结合一些特殊表位的能力。因此VHH被认为对研究、诊断和治疗具有重要价值。

Anti-Human IgG(H+L), AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)

产品货号：023-101-014



实验流程一览

1. 所需材料

- Nano-pH-sensitive probe: Anti-Human IgG(H+L), AlpSdAbs® VHH(Deep Red630) (Mw≈15kDa);
- 目标测试一抗(例: Sacituzumab, Mw≈150kDa);
- 细胞培养基;
- 96孔细胞培养板;
- 仪器: 细胞成像、流式细胞仪和荧光平板阅读器或者其它具有相应激发和发射光谱的仪器

2. 细胞准备

检测前确定目标靶细胞状态良好, 细胞充分稀释混匀后在 96 孔细胞培养板中以5000-10000细胞/孔/100μL 进行铺板。

*不同细胞及实验体系可适当调整细胞用量。

2.2 接种完成后将细胞培养板放回培养箱, 在合适的培养条件下培养12-24h, 调整细胞至最佳测试状态。

*以贴壁细胞为例, 不同细胞生长速度差异大, 建议铺板密度50%左右最适合后续检测。

3. 抗体标记Nano-pH-sensitive probe准备

3.1 配制 2x 工作液: 在 100ul 培养基中加入 1.5ug 目标测试一抗(例: sacituzumab), 再加入 0.3ug Anti-Human IgG, AlpSdAbs® VHH(Deep Red630), 随后加入培养基将整个反应体系补充 200ul, 并用 100ul 枪头吹洗 5 次混合均匀。

*此时配制好的 2x 的工作液中一抗浓度为 50nM, Nano-pH-sensitive probe 浓度为 100nM。(每个一抗分子可被标记上 2 分子 Nano-pH-sensitive probe);

*可根据实验需求调整一抗和相应 Nano-pH-sensitive probe 浓度, 建议一抗浓度范围为 10-50 nM;

*常用培养基以及抗体的 buffer 不会影响 Nano-pH-sensitive probe 与一抗结合。

3.2 将 2x 工作液 37 °C 放置 20 min, 得到抗体标记复合物;

3.3 将 100 μL 抗体标记物溶液缓慢加入到步骤 2 中准备好的细胞中;

*此时最终工作液中一抗浓度为 25nM, Nano-pH-sensitive probe 浓度为 50nM。

3.4 将 96 孔板放回培养箱, 在合适的培养条件下培养 8-24 h。

*不同靶点及细胞检测培养时间由于内化效率不同有一定差异, 用户在正式实验前可设置梯度时间进行最适条件摸索。

*用户可根据实验需求及实际情况设计必要复孔, 提高实验结果可信度。

4. 检测

4.1 观察细胞生长情况，检测细胞内荧光变化：

检测内化时荧光信号可通过多种仪器实现，包括细胞成像、流式细胞仪和荧光平板阅读器。我们建议在这些仪器上使用647或Cy®5通道设置。

*不同仪器可能有不同的检测环境和准备时间，荧光信号出现时间一般在3-4h后，观察起始时间可根据仪器具体调整。

5. 优化建议

- 在抗体使用时，较高的浓度可能会导致聚集。如果发生聚集现象，需要降低抗体浓度。
- 通过仅用Anti-Human IgG(H+L), AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)或者与无关阴性IgG配合处理的对照来确定背景。虽然Anti-Human IgG(H+L), AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)在中性pH下几乎无荧光，但细胞仍可通过非特异性机制进行内吞，因此，可能会观察到一些背景。非特异性过程较为缓慢，孵育时间的增加也会对背景信号产生影响。
- 虽然增加Anti-Human IgG(H+L), AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)与一抗的摩尔比可以增加信号强度，但同时它也可能增加背景信号，因此所使用的浓度需要进行优化。
- 建议Anti-Human IgG(H+L), AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)浓度范围在为5-50 nM使用，超过推荐量的Anti-Human IgG(H+L), AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)可能会增加背景。

6. 产品保证

公司保证产品符合AlpVHHs的质检标准和一般销售条款，如果您有任何疑问，请联系我们。

网址: <http://alpvhhs.cn>

邮箱: service@alpvhhs.com

Nano-pH-sensitive probe related products

Code Number	Product Description	Applications	Size
023-101-012	Anti-Human IgG, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)	Internalization Test	100µg
023-101-014	Anti-Human IgG, AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)	Internalization Test	100µg
023-102-012	Anti-Human IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600 ×8)	Internalization Test	100µg
023-102-014	Anti-Human IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(Deep Red630 ×8)	Internalization Test	100µg
001-101-012	Anti-Mouse IgG, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)	Internalization Test	100µg
001-101-014	Anti-Mouse IgG, AlpSdAbs® VHH(Deep Red630)	Internalization Test	100µg

Nano-secondary antibody-Drug conjugates related products

Code Number	Product Description	Applications	Size
023-101-101	Anti-Human IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcMMAE ×4)	Internalization Test	100µg
023-101-111	Anti-Human IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcMMAE ×8)	Internalization Test	100µg
023-102-101	Anti-Human IgG Fab, AlpSdAbs® VHH(VcMMAE ×4)	Internalization Test	100µg
023-102-111	Anti-Human IgG Fab, AlpSdAbs® VHH(VcMMAE ×8)	Internalization Test	100µg
023-101-102	Anti-Human IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcMMAF ×4)	Internalization Test	100µg
023-101-112	Anti-Human IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcMMAF ×8)	Internalization Test	100µg
023-102-102	Anti-Human IgG Fab, AlpSdAbs® VHH(VcMMAF ×4)	Internalization Test	100µg
023-102-112	Anti-Human IgG Fab, AlpSdAbs® VHH(VcMMAF ×8)	Internalization Test	100µg
023-101-103	Anti-Human IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(GGFG-DXD ×4)	Internalization Test	100µg
023-101-113	Anti-Human IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(GGFG-DXD ×8)	Internalization Test	100µg
023-102-103	Anti-Human IgG Fab, AlpSdAbs® VHH(GGFG-DXD ×4)	Internalization Test	100µg
023-102-113	Anti-Human IgG Fab, AlpSdAbs® VHH(GGFG-DXD ×8)	Internalization Test	100µg
023-101-104	Anti-Human IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcPBD ×4)	Internalization Test	100µg
023-101-114	Anti-Human IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcPBD ×8)	Internalization Test	100µg
023-102-104	Anti-Human IgG Fab, AlpSdAbs® VHH(VcPBD ×4)	Internalization Test	100µg
023-102-114	Anti-Human IgG Fab, AlpSdAbs® VHH(VcPBD ×8)	Internalization Test	100µg
001-101-101	Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcMMAE ×4)	Internalization Test	100µg
001-101-111	Anti-Mouse IgG, AlpSdAbs® VHH(VcMMAE ×8)	Internalization Test	100µg
001-101-102	Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcMMAF ×4)	Internalization Test	100µg
001-101-112	Anti-Mouse IgG, AlpSdAbs® VHH(VcMMAF ×8)	Internalization Test	100µg

Code Number	Product Description	Applications	Size
001-101-103	Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(GGFG-DXD ×4)	Internalization Test	100μg
001-101-113	Anti-Mouse IgG, AlpSdAbs® VHH(GGFG-DXD ×8)	Internalization Test	100μg
001-101-104	Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcPBD ×4)	Internalization Test	100μg
001-101-114	Anti-Mouse IgG, AlpSdAbs® VHH(VcPBD ×8)	Internalization Test	100μg