

简介

Anti-Human IgG, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)是专为抗体内化研究开发的一种工具试剂。Anti-Human IgG, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)通过将能特异识别人IgG的纳米抗体与pH敏感型pH-Red 600荧光探针偶联, 提供一种将pH敏感型pH-Red 600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, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)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, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)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pH- Red 600(激发: 576nm, 发射: 597nm)
特异性	特异性结合人IgG 片段, 不与鼠、兔、山羊IgG等交叉反应
浓度	1mg/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

pH-Red 600具有一种最适激发和发射分别为576/597nm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。pH-Red 600在在细胞外环境中(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, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)

产品货号：023-101-012



实验流程一览

1. 所需材料

- Nano-pH-sensitive probe: Anti-Human IgG, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600) ($M_w \approx 15\text{KD}$);
- 目标测试一抗(例: Sacituzumab, $M_w \approx 150\text{kD}$);
- 细胞培养基;
- 96孔细胞培养板;
- 仪器: incucyte或者其它具有相应激发和发射光谱的仪器;

2. 细胞准备

2.1 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/100 μL 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(pH-Red 600), 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两分子 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incucyte或者其它具有相应激发和发射光谱的仪器。

*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, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)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, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)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, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)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, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)浓度范围在为5-50 nM使用，超过推荐量的Anti-Human IgG, AlpSdAbs® VHH(pH-Red 600)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