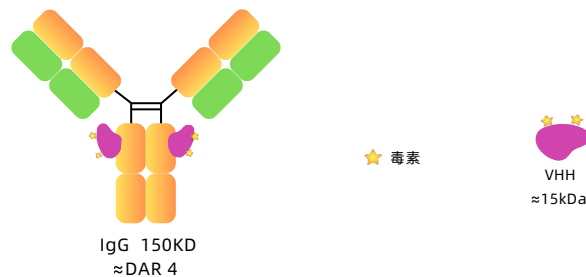


简介

Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcExatecan ×4)是专为鼠源抗体内化研究开发的一种毒素偶联工具试剂。Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcExatecan ×4)通过将能特异识别小鼠IgG的纳米抗体与毒素Exatecan偶联, 提供一种将毒素Exatecan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, 可标记所有具有鼠IgG Fc片段的抗体或者融合蛋白。同时, Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcExatecan ×4)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-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcExatecan ×4)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	Exatecan
连接子	mc-VC-PABC
特异性	特异性结合鼠IgG Fc片段, 不与人、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)
储存条件	-20 °C(避免反复冻融)
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

依喜替康 (Exatecan, DX-8951) 是一种水溶性的非前药六环喜树碱衍生物。依喜替康在体内外均表现出较强的抗肿瘤活性, 并对拓扑异构酶 I 有显著抑制作用, 其抑制作用强于伊立替康的活性代谢产物 SN-38。此外, 它能克服 P-糖蛋白介导的多药耐药, 并且由于它不是前药, 因此减少了患者之间的副作用和疗效差异, 依喜替康比现有喜树碱类似物有更小的毒性。Val-Cit二肽是ADCs中最常用的可裂解连接子, 目前有多达25个分子处于临床阶段, 可能是因为它整体良好的血浆稳定性、释放行为和化学可牵引性。两个已获批的ADC药物 (Adcetris和Polivy) 都使用了相同的连接子mc-VC-PABC, 其中包含马来酰亚胺基间隔子、作为组织蛋白酶底物的标准Val Cit二肽序列和PABC自降解间隔子。

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。

实验流程一览

1. 所需材料

- Nano-secondary antibody-Drug conjugates: Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcMMAE x4) (Mw≈15kDa);
- 目标测试一抗(例：鼠源IgG抗体, Mw≈150kDa);
- 细胞培养基;
- 96孔细胞培养板;
- 仪器：酶标仪;

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3000-5000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6-12h，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。

*步骤2.2为可选步骤，细胞状态良好的情况下，铺板后直接进入步骤3亦可。

3. 抗体标记Nano-secondary antibody-Drug conjugates准备

3.1 配制2x工作液：在100ul 培养基中加入6ug 目标测试一抗(例：鼠源IgG抗体)，再加入1.2ug Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcMMAE x4)，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200nM, Nano-secondary antibody-Drug conjugates浓度为400nM。（每个一抗分子可被标记上2分子Nano-secondary antibody-Drug conjugates）；

*可根据实验需求调整一抗和相应Nano-secondary antibody-Drug conjugates浓度，建议一抗浓度范围为0.1-100 nM；或者在步骤3.1基础上进行梯度稀释，获得不同浓度范围的抗体毒素复合物；

*常用培养基以及抗体的buffer不会影响Nano-secondary antibody-Drug conjugates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100nM, Nano-secondary antibody-Drug conjugates浓度为200nM。

3.4 将96孔板放回培养箱，在合适的培养条件下培养48 -72h。

*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: 观察细胞生长情况, 在检测前吸取细胞培养板中培养基并弃之。

4.2 利用ATP含量测定法(如: CTG)检测细胞增殖与活力, 用以测定抗体内化。具体操作步骤请参考对应试剂盒的说明书。

抗体内化率的计算方式为:

细抗体内化率= $[(Ac-As)/(Ac-Ae)] \times 100\%$;

As: 实验组吸光度(检测抗体+内化检测试剂组);

Ac: 对照组吸光度(同型对照抗体+内化检测试剂组);

Ae: 背景值(只含ATP含量测定法试剂组)

*不同检测方法可能有不同的检测环境和准备试剂, 内化检测一般在48h后, 测试起始时间可实际情况具体调整。

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-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcExatecan ×4)或者与无关阴性IgG配合处理的对照来确定背景。虽然Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcExatecan ×4)本身不会直接被细胞内化, 但细胞仍可通过部分蛋白酶降解试剂或者连接子并产生游离毒素。此外, 被杀死的细胞裂解后的毒素释放(旁观者效应), 也会有部分小分子毒素进入细胞, 这些情况会造成一定的背景杀伤。这种情况较为缓慢, 孵育时间的增加也会对背景信号产生较大影响。
- 虽然增加Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcExatecan ×4)与一抗的摩尔比可以部分增加信号强度, 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-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcExatecan ×4)浓度范围在为0.1-200 nM使用, 超过推荐量的Anti-Mouse IgG Fc, AlpSdAbs® VHH(VcExatecan ×4)可能会增加背景。
- 建议杀伤实验周期为约4天, 整个过程可适时显微镜下观察实验组和对照组细胞生长情况, 判断合适的实验停止时间点。

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