

MonoRab™ Anti-Camelid VHH Affinity Resin
 版本 01

目录号: L00905

I. 简介.....	1
II. 需要自备的设备和试剂.....	1
III. 使用指南.....	2
IV. 试剂兼容性表.....	4
V. 案例.....	4
VI. 问题处理.....	6
IV. 抗骆驼VHH抗体相关产品.....	7

I. 描述

骆驼VHH抗体（也称为单域抗体、sdAb或纳米抗体）是一种长度约为 110 个氨基酸的肽链，是重链抗体的可变区部分（VHH片段）。与完整抗体一样，骆驼VHH抗体能够选择性地结合特定抗原。由于体积小、生产简单、亲和力高等优势，这类抗体在生物技术和治疗、研究领域有着广泛的应用。金斯瑞MonoRab™ Anti-Camelid VHH Affinity Resin (Cat. No. L00905)用于从常用的蛋白质表达系统（如细菌、酵母和哺乳动物细胞）中纯化骆驼VHH单域抗体。细胞裂解物中的VHH单域抗体可以与偶联到填料上的抗骆驼VHH单克隆抗体特异性结合，通过严格的洗涤步骤去除杂质后，以高回收率洗脱目标蛋白。表1列出了金斯瑞 MonoRab™ Anti-Camelid VHH Affinity Resin的主要特性。

表1. Anti-Camelid VHH Affinity Resin的特性

产品成分	含0.02%叠氮化钠，50%TBS的凝胶 (固液比1:1)
基质	4%交联琼脂糖
平均粒径	90 μm
配体	MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Antibody, mAb
结合载量	每毫升沉降的填料大约能够结合2-4 毫克骆驼VHH抗体（取决于不同骆驼VHH的氨基酸序列）
储存条件和稳定性	2-8°C条件下可保存12个月。不要冻存填料。
填料重复使用	2 - 8°C储存时，填料可以至少循环使用 5 次而载量几乎没有损失。重复使用 10 次，载量会有少量下降。
洗脱方法	酸性溶液洗脱（pH 2.5）
试剂兼容性	与常用浓度下的细菌裂解试剂兼容。兼容试剂表请参见表 2 和 3。

II. 需要自备的设备和试剂

- 蒸馏水
- 微量移液器
- 微量离心管
- 漩涡混匀仪
- 加样槽
- 空柱子
- 移液器（5 毫升，10 毫升）
- 细胞裂解缓冲溶液
- 蛋白酶抑制剂

- 缓冲溶液（表 2：Anti-CamelidVHHAffinity Resin使用所需的重要缓冲液）

表 2. 使用 Anti-CamelidVHHAffinity Resin 所需的缓冲溶液

目的	缓冲溶液	配方
平衡和洗涤	Tris缓冲盐溶液, TBS	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4
洗脱	酸性洗脱缓冲溶液	0.1 M glycine HCl, pH 2.5
中和	中和缓冲溶液	1 M Tris-HCl, pH 9.0

III. 使用指导

1. 样品制备

为获得最佳效果，样品制备请遵循以下建议。

- 1) 根据蛋白特性制备样品，优化裂解条件，尽量减少会干扰蛋白与凝胶结合的因素（见表3）。
- 2) 样品不应含有任何不溶性颗粒。将样品在 4° C 下高速离心 10-15 分钟，以去除不溶性物质。
- 3) 为防止纯化过程中蛋白质降解，可在细胞裂解过程中冰制样品/或在样品中加入蛋白酶抑制剂。
- 4) 在细胞裂解过程中，添加Benz-Neburase™, His (金斯瑞, Z03626) 以降低因染色体DNA 或RNA 释放而引起的样品粘性。
- 5) 将裂解液或样品分装并储存于-80° C，避免反复冻融。

2. 填料准备

- 1) 将空柱子固定于支架上，用 TBS 冲洗一次柱子。
- 2) 轻轻倒转填料使其彻底重悬，并立即将适当体积的填料装入柱中。建议使用大口径移液器吸头，以便于填料转移。
- 3) 用3倍柱体积的TBS洗涤填料3次。使缓冲溶液在重力作用下从柱子中流出; 不要让填料变干。

3. 样品结合

Anti-Camelid VHH Affinity Resin 可通过柱层析、分批结合或免疫沉淀 (IP) 等不同方法纯化驼科VHH单域抗体。如果样品体积约为 50 mL，且驼科VHH单域抗体少于 8 mg，则建议使用 2-4 mL 沉淀填料的柱结合形式。对于较大的样品量，建议使用分批结合形式以进行快速有效的纯化。对于具有低蛋白质表达水平的小体积样品，可使用免疫沉淀方法（参见第 III.7 节驼科VHH单域抗体的免疫沉淀）。

3.1 柱层析法

- 1) 将准备好的样品添加到按步骤 2 准备好的 Anti-Camelid VHH Affinity Resin 的柱子上。在柱子底部连接一个缓冲液储存槽，用于接收大体积流穿液。多次收集并重新加载流穿液以获得最大的结合载量。较低的流速可以促进靶蛋白与填料更好的结合。使样品在室温下通过重力作用流通层析柱。
- 2) 用 10 - 20 个柱体积的 TBS 清洗柱子，以减少非特异性结合。
- 3) 让柱子完全排空并进行洗脱程序。（参见第 III.4节 驼科动物VHH单域抗体的洗脱）

3.2 分批结合

- 1) 重悬准备好的填料（如第 III.2 节所述）并将其转移到准备好的样品中。将样品和Anti-Camelid VHH Affinity Resin在室温下旋转孵育至少 30 分钟。
- 2) 孵育后，将样品与填料加载到柱子上以收集填料。保留样品的流穿液以供进一步使用。
- 3) 用 10-20 个柱体积的 TBS 清洗填料，以去除任何非特异性结合的杂质。
- 4) 让柱子完全排空并进行洗脱程序。（参见第 III.4节 驼科VHH单域抗体的洗脱）

备注:

1. 结合时间可凭经验延长。孵育可以在 4° C 下旋转混匀过夜。为防止蛋白质降解，建议在样品中加入蛋白酶抑制剂。
2. 保留流穿液进行 SDS-PAGE 或蛋白质印迹分析，以确定驼科VHH单域抗体的结合效率。

4. 驼科动物VHH单域抗体的洗脱

用 10 个柱体积的酸性洗脱缓冲液 (pH 2.5) 将结合的目标蛋白洗脱到含有 1 个柱体积的 1 M Tris, pH 9.0 的试管中。

备注:

1. **不要将柱料放置在酸性洗脱缓冲液中超过15分钟**；洗脱后立即用中和缓冲液重新平衡柱子。参见表 2， Anti-Camelid VHH Affinity Resin使用相关缓冲溶液。
2. 使用酸性洗脱缓冲液（例如 0.1 M Glycine, pH 2.5）可获得最佳洗脱效率。碱性和中性缓冲液（含有高浓度 NaCl）不适用于Anti-Camelid VHH亲和介质的洗脱。
3. 所有方法均可在常温下进行；特殊样品可能需要更低的温度和更长的孵育时间。
4. 如果VHH单域抗体在洗脱后沉淀，可以尝试更温和的条件洗脱（例如 pH 3 或 pH 3.5 0.1 M 甘氨酸）。

5. 重新平衡

洗脱后，用 5 个柱体积的 TBS 缓冲液清洗填料，以去除残留的洗脱缓冲液，这些缓冲液可能使固定在介质上的抗VHH抗体变性。

6. Anti-Camelid VHH Affinity Resin再生

用 10 mL 洗脱缓冲液洗涤填料，然后用 5 mL TBS 缓冲液平衡柱子。并重复一次。在 2-8° C 下储存时，填料可以至少循环使用 5 次而不会损失结合载量。而且它可以重复使用多达 10 次，同时结合载量只有少量损失。最后一次洗涤后，让 TBS 缓冲液完全排干，再将2个柱体积的 TBS 添加到填料中作为储存液。

7. 驼科VHH单域抗体的免疫沉淀

从少量初始样品（例如 1-2 mL 细胞裂解液）中纯化目标蛋白，可以使用免疫沉淀方法。

7.1 悬浮填料以形成均匀的浆液，转移40-100 μ L至1.5 mL试管中。

注意: 建议使用大口径移液器吸头转移填料浆液。

7.2 向离心管中加入 500 μ L TBS，轻轻混合填料，以 6000 \times g 离心 30 秒，小心去除上清液。再重复此步骤两次。每次洗涤后，在不触碰沉淀填料情况下，小心地尽可能多的移除上清液。

7.3 向洗涤后的填料中加入样品。如果样品体积小于 1 mL，则添加裂解缓冲液或 TBS 使总样品体积达到 1 mL。

7.4 室温条件下，用管式旋转器首尾相连旋转混合至少1小时。

备注: 孵育1小时足以结合大多数样品中的目标蛋白。然而，为了进一步提高收率，可以延长孵育时间，同时根据需要降低孵育温度。

7.5 6,000 \times g 离心 30 秒。小心移除上清液，加入 TBS 洗涤填料3次。在不影响沉淀填料的情况下尽可能多地移除上清液，然后进入洗脱步骤。

7.6 将 20 个填料体积的酸性洗脱缓冲液加入洗涤过的填料中，用大口径移液器吸头轻轻地重新悬浮填料。在室温下孵育 10 分钟，在孵育期间轻柔震荡试管两次，轻轻混匀。孵育后，以 6,000 \times g 离心 30 秒。小心地将含有纯化目标蛋白的上清液转移到含有 2 个填料体积的 1 M Tris, pH 9.0 的新管中。

IV. 试剂兼容性表

表 3. 试剂兼容性表

试剂	最大耐受浓度	备注
EDTA	10 mM	使用浓度高于 10 mM 的螯合剂可能会降低纯化效率，同时降低目标蛋白的回收率。
β-ME	不推荐	还原剂破坏填料上抗体中的二硫键。在纯化过程中避免使用还原剂或只添加低浓度 (<10 mM) 还原剂。当还原剂达到最大耐受浓度时，SDS-PAGE 分析中会出现一条抗体重链 (~50 kDa) 条带。纯化含有较高浓度还原剂的样品时，填料会被破坏而不能重复使用。
DTT	不推荐	
吐温 20	5%	洗涤剂的浓度不应超过5%。
曲拉通 X-100	5%	
SDS	不推荐	SDS 会使填料上偶联的结合抗体变性。
NP-40	8%	更高浓度的 NP-40 预计会降低纯化效率，同时降低目标蛋白的回收率。
盐酸胍	0.3 M	离液试剂可以使目标驼科VHH 单域抗体变性。请勿使用比注明浓度更高的盐酸胍和尿素。
尿素	1 M	
甘油	10%	较高的浓度可能会干扰 驼科VHH 单域抗体的结合。
氯化钠	2 M	在最大测试浓度下(2 M)，抗体和驼科VHH 的结合不受氯化钠的影响。

V. 案例

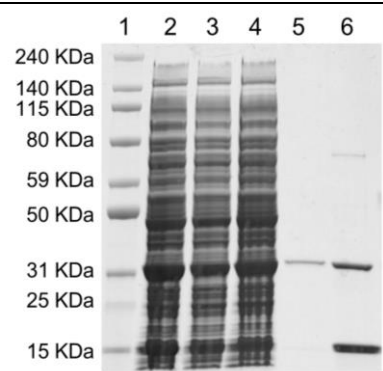
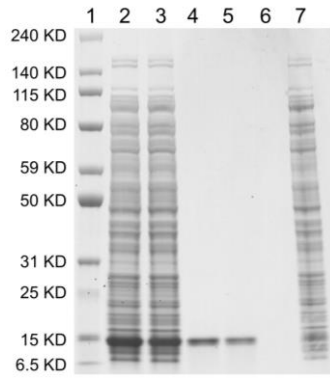
描述	图片	图例
图 1. 从大肠杆菌裂解液中纯化驼科 VHH#1 蛋白		泳道： 1. 蛋白Marker 2. 完整细胞裂解液产物 3. 流穿液 4. 洗涤流穿液（第一次） 5. 洗涤流穿液（最后一次） 6. 洗脱有目的驼科VHH 单域抗体-1 的洗脱液（分子量 = 15 kDa 单体和 30 kDa 二聚体）

图 2. 从大肠杆菌裂解液中纯化骆驼科VHH#2 蛋白



1. 蛋白Marker
2. 流穿液1
3. 流穿液2
4. 洗脱有目的VHH2的洗脱液-1
5. 洗脱有目的VHH2的洗脱液-2
6. 空白洗脱液对照
7. 完整细胞裂解液产物

VI. 问题处理

问题	可能原因	解决方法
在流穿液体中发现大量驼科VHH 单域抗体	结合时间不足	如果使用分批纯化方法，可通过实验增加结合时间；如果使用柱纯化方法，建议上样时使用较低的流速。
	柱子过载	减少加入填料的样品量或增加填料量。
	填料上次纯化后未再生	纯化前再生填料
	试剂兼容性问题	纯化前用TBS透析样品。
洗脱液中极少或不存在驼科VHH 单域抗体。	目标蛋白降解	1、使用新鲜制备的样品。 2、在较低的温度下进行纯化，例如 4°C。 3、在细胞裂解和结合步骤中向样品中加入蛋白酶抑制剂。
	没有目标蛋白表达	在纯化前通过WB检测细胞裂解液，确定是否存在驼科VHH 单域抗体。
	极低的蛋白表达水平	1、使用更大体积的细胞裂解液。 2、优化表达条件，提高蛋白表达水平。
洗脱溶液中有多条蛋白带	蛋白在室温条件下不稳定。	在低温条件下纯化目标蛋白，例如4°C。
	纯化过程中蛋白酶活性引起的蛋白质降解	在细胞裂解液中加入蛋白酶抑制剂。
	非特异性吸附	1. 重新制备细胞裂解液。 2. 增加额外的洗涤步骤。
洗脱液中存在沉淀物	蛋白质容易形成聚合物	在更高的 pH 值下纯化目标蛋白，例如 3 或 3.5。然而，较高的 pH 值会导致较低的洗脱效率和载量下降。
柱内液体流速缓慢	样品中含有不溶性颗粒	在纯化前用0.45 μm滤膜过滤样品。

IV. 抗骆科 VHH抗体相关产品

Product Type	Species Specificity	Unconjugated	Conjugated						
			HRP	Biotin	iFluor 488	iFluor 555	iFluor 647	PE	FITC
Anti-VHH, mAb	Llama, Camel	A01860	A01861	A01995	A01862	A01863	A01994		
Anti-VHH, mAb Cocktail	Llama, Camel, Alpaca	A02014	A02016	A02015	A02021	A02020	A02019	A02018	A02017

受限使用标签许可：本产品可能是 GenScript Corporation 申请的一项或多项专利的主题。购买本产品向买方传递了不可转让的权利，即在买方（无论买方是学术实体还是营利性实体）进行的研究中使用所购买的产品数量和产品组件。买方不应将 (a) 本产品 (b) 其组件或 (c) 使用本产品或其组件制成的材料出售或以其他方式转让给第三方或以其他方式使用本产品或其组件或使用本产品或其组件制成的材料用于任何商业目的。对于商业用途，请通过 product@genscript.com 联系 GenScript。

仅供实验室或进一步生产使用。

GenScript USA Inc.

860 Centennial Ave.,
Piscataway, NJ 08854

Tel: 1-877-436-7274, 1-732-885-9188

Fax: 732-210-0262, 732-885-5878

Email: product@genscript.com

Web: www.genscript.com.