

ZAP Antibody Internalization Kit

ZAP 抗体内化试剂盒

INTRODUCTION

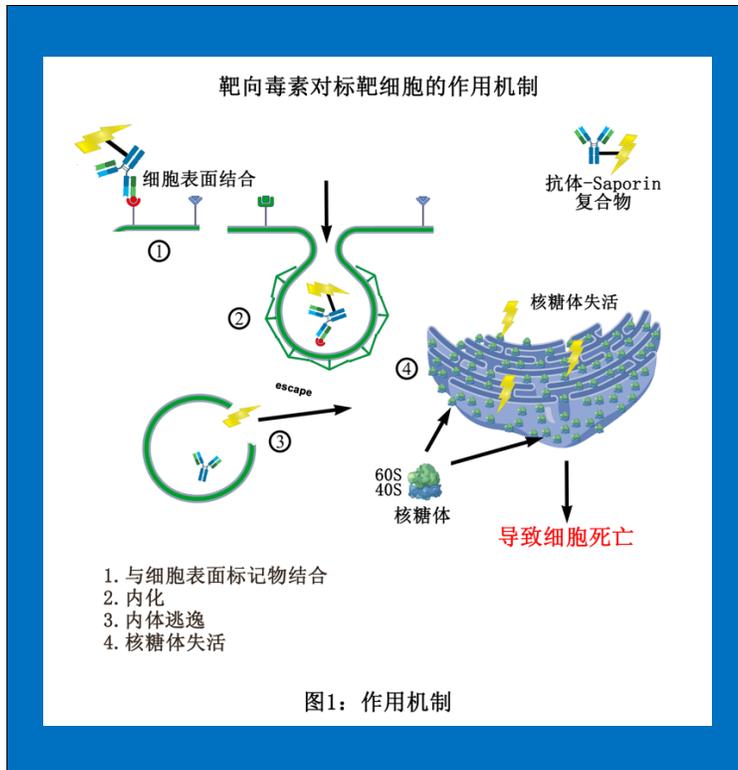
简介

进行大量抗体筛选耗时较长，并且所费不菲。在开发有效靶向共轭物时，如果可以在直接共轭前先进行抗体筛选，将大大提高成本效益。靶向共轭物可以结合有效载荷一起进入特定细胞群，广泛应用于体外和体内的基础研究和药物开发。开发有效并具有特异性的靶向共轭物过程时间较长，花费昂贵。必须确认所生产的分子能够针对所选择的细胞表面标记物（即靶向剂）进行标靶并且基于特异性进行分类。理想的靶向剂特征包括高度特异性和快速内化。靶向剂可以是抗体、肽、蛋白质或任何其他能识别细胞表面标记的分子。抗体通常是最好的靶向剂，选择正确的抗体对结合和输送有效载荷的特异性和性能至关重要。

Advanced Targeting Systems公司生产的ZAP产品由多种二级抗体组成，可快速筛选大量靶向剂，以确定其特异性、功能性结合、内化和半最大效应浓度（EC50）。多种ZAP二级共轭物可供选择，是理想的靶向剂筛选工具。它们利用种属特异性二级抗体，或者链霉亲和素（用于生物素化的靶向剂）构建，并与最有效的植物核糖体失活蛋白Saporin相结合。ZAP共轭物的作用机理详见图1。

使用二级共轭物的好处是，可以省略将每种候选的靶向剂都与有效载荷共轭这一费时且昂贵的步骤。只需在培养条件下将 ZAP 共轭物与靶向剂共同添加到细胞中即可。添加之后，靶向剂将 ZAP 共轭物带入目标细胞内；复合物与标记物结合，Saporin 蛋白在细胞质中释放，导致核糖体失活。没有表达目标细胞表面标记物的细胞不会与 ZAP 靶向剂复合物结合或内化，因此不受影响。Saporin 没有结合链，无法单独进入细胞。

本公司可基于客户选择试剂盒套装的具体使用场景提供推荐方案。此外还提供了预计的测定结果范例作为比较，成功的测定可以提供半最大效应浓度 EC50 值，用于确定该候选靶向剂是否应该进入下一阶段测试。



KIT COMPONENTS

试剂盒套装内容清单

- 说明手册
- 存储视频教程的闪存盘
- ZAP 试剂盒套装（参阅包装清单，确定试剂盒的具体内容）

用户自备：

- 经处理的 96 孔组织培养平底板，带盖
- 能表达目标标记物的细胞
- 细胞培养基
- 微型离心管（1.5毫升）

BACKGROUND AND GENERAL INFORMATION

背景与综述

细胞培养

- 应选择目标标记物（原生或转染）表达水平较高的细胞。使用流式细胞仪进行细胞分选，可以富集含有目标标记物的细胞群。
- 细胞通常在下午较晚时（用药前约 16 小时）开始培养。从此时开始计算，为测定开始的第一天。
- 每孔细胞数由所采用细胞的增殖速率决定。对于96孔培养板，典型情况大约为每孔细胞数为1000-5000个/孔。但特殊情况下，每孔细胞数也可以少至100个/孔或多达10,000个/孔。
- 目标是在进行测定的第五天上午，未处理细胞的汇合度接近 70-80%。

ZAP 产品系列

- Whole-ZAP产品系列通过将种属特异性多克隆抗IgG与Saporin共轭制成。产品中使用的二级抗体是针对所选择生物物种完整IgG的二价IgG。因此由于轻链同源性，与其他免疫球蛋白亚类（IgA、IgM、IgE等）会产生一些交叉反应。
- Fab-ZAP产品系列通过将种属特异性多克隆单价抗IgG附着Saporin制成。抗原针对所选择的生物物种完整IgG。因此由于轻链同源性，与其他免疫球蛋白亚类（IgA、IgM、IgE等）会产生一些交叉反应。使用Fab IgG理论上可以避免二价抗体的加帽现象，以及可能导致的假阳性杀灭。
- FabFc-ZAP产品系列也是使用附着Saporin的种属特异性多克隆单价抗IgG制成。区别在于FabFc抗体只针对种属特异性IgG的Fc部分。即ZAP聚合物不会与其他Ig亚类结合，也不会与通常表达在B细胞的表面Ig结合。

BACKGROUND AND GENERAL INFORMATION

背景与综述

Saporin: 阳性和阴性对照

- Saporin是一种分子量为30000道尔顿的蛋白质，它本身不能进入细胞，也没有结合链。作为一种核糖体失活蛋白（RIP），它需要进入细胞内部，在细胞质中才能活跃并产生效果。
- 在ZAP细胞毒性检测中采用Saporin是基本的对照法。Saporin浓度较高时（ $\geq 1 \mu\text{M}$ ）会导致处理后的细胞因大量内吞作用出现非特异性死亡。因此测定时，使用该浓度的Saporin作为起点，可以确认引起非特异性细胞杀灭的半最大效应浓度EC50。
- 使用不同浓度的Saporin进行测定，不仅能确定半最大效应浓度EC50，而且Saporin浓度较低时（通常小于50nM），测试细胞群也不会出现明显死亡。这种Saporin滴定可提供细胞死亡的基准曲线，用于与实验靶向剂进行比较。
- 建议Saporin稀释曲线的开始浓度应高于测试样品的浓度，但遵循相似的稀释操作流程（即 1:3 或 1:10）。

对照物-SAP

- 检测中使用的最佳对照物选择，要求分子除结合能力外，各方面都与候选靶向剂相似。典型范例包括候选抗体的同型对照。
- 如果以上选择不可行，建议将种属特异性非结合的对照共轭物与 ZAP 产品一起使用。这些产品中使用的抗体来自特定物种的正常血清。
- 对照共轭物用于测定的浓度应与候选靶向剂的浓度相同，以证明非结合型靶向剂在同等浓度下的效果。

ADDITIONAL RESOURCES ON ATSBIO.COM

ATSBIO.COM网站上的其他信息



Protocols
操作规范



Calculators
计算器



Videos
视频



References
参考资料