

Recombinant DT3C Protein

重组DT3C蛋白

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FC501

版本号: Version 1.0

保存: $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 可稳定保存12个月, $\leq -18^{\circ}\text{C}$ 可保存1个月, $2-8^{\circ}\text{C}$ 可保存2周。避免反复冻融, 收货后可分装成小规格保存于 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 。

产品说明

DT3C 是一种重组融合蛋白, 由无受体结合域的白喉毒素片段 (仅保留毒性结构域DT) 与链球蛋白G的3C片段 (负责结合IgG) 共同构建而成。该蛋白能高亲和地结合抗体的Fc区域, 当结合了抗体的DT3C随抗体一同被内吞进入细胞后, 胞内的弗林蛋白酶会将其切割, 释放出毒性DT。DT通过抑制EF2的ADP 核糖基化修饰, 阻断细胞内的蛋白质合成, 最终诱导细胞死亡。而未能进入细胞的游离DT3C则不具备杀伤能力。因此, 根据细胞被杀伤的程度, 即可判断抗体被细胞内化的效率。

本产品由大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达, 包含33-417aa (P00588) & 291-497aa (P19909), N端含6×His标签, 分子量69 kDa, 纯度 $\geq 90\%$ (SDS-PAGE), 浓度为1 mg/ml, 内毒素 $< 1\text{EU}/\mu\text{g}$ 。

使用重组DT3C蛋白的操作十分简便: 只需将DT3C蛋白与目标抗体共同孵育30分钟, 即可形成Ab-DT3C复合物。该复合物无需进一步处理, 可直接加入含完全培养基的细胞中进行孵育。在体外实验中, 其功能类似于抗体药物偶联物 (ADC), 能够通过内化作用将白喉毒素的细胞毒性效应靶向递送至特定细胞中, 从而用于评估抗体的内化效率。

产品规格信息

Component	FC501-01	FC501-02
Recombinant DT3C Protein	100 μg	1 mg

操作步骤

1、细胞准备

- (1) 取处于对数生长期的表达抗原的靶细胞, 消化计数, 用含有20%血清的培养基将细胞重悬至所需细胞密度。
- (2) 在96孔板中接种细胞, 100 μl /孔, 培养箱中培养过夜, 使细胞贴壁。

2、抗体-DT3C偶联物准备

将DT3C与抗体使用无血清基础培养基进行稀释, 并按照一定的比例和浓度进行混合, 混合物在 37°C 培养箱中孵育30 min, 形成偶联物。然后对偶联物进行梯度稀释。

3、细胞与偶联物共培养

- (1) 细胞培养上清吸出50 μl 丢弃。
- (2) 向细胞培养96孔板中依次加入梯度稀释的偶联物混合液, 50 μl /孔。
- (3) 放回培养箱中, 继续培养48-72h。

4、检测步骤

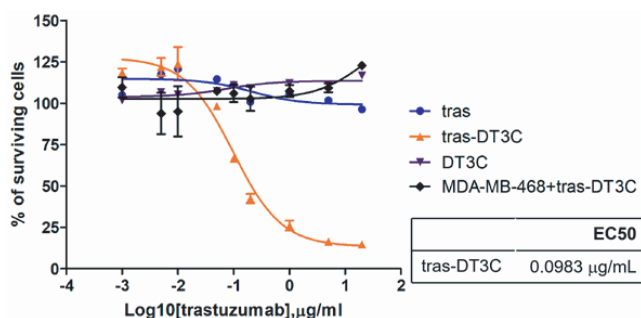
使用发光法细胞活性检测试剂盒进行细胞活性检测, 向每孔中加入100 μl 检测试剂, 10 min后进行酶标仪检测, 读取发光值。



结果展示

【曲妥珠单抗细胞内化实验】

曲妥珠单抗 (trastuzumab, 图中简称 tras) 可特异性识别 Her2 抗原, 本实验利用高表达 Her2 抗原的 SK-BR-3 人乳腺癌细胞进行抗体内化效率检测, 利用 Her2 抗原阴性的 MDA-MB-468 人乳腺癌细胞作为阴性细胞对照。Trastuzumab 与 DT3C 摩尔比为 1:2, 细胞量为 7000 个/孔, 偶联物与细胞共培养 72 h 后进行检测。结果如下。在 Her2 阴性细胞中, 加入抗体-DT3C 偶联物对细胞无明显杀伤, 在 Her2 阳性细胞中单独加入 trastuzumab 或 DT3C, 细胞均未受到明显影响, 只有加入抗体-DT3C 偶联物时, 偶联物借由抗体介导被细胞内吞, 释放了 DT3C 中的毒性分子, 细胞发生明显死亡。细胞杀伤率反应了抗体的内吞效率。



注意事项

1、偶联孵育条件

血清中富含免疫球蛋白 G (IgG), 其影响 DT3C 与目的抗体间的连接。所以在进行 DT3C 与抗体偶联孵育过程中, 需要保证在无血清的基础培养基中进行。形成偶联物后, 可以加入到含有血清和双抗的完全培养基中培养细胞。

2、DT3C 的最适浓度和与抗体搭配的最适比例

一分子的抗体理论上可以结合 2 个 DT3C 分子, 即抗体与 DT3C 的摩尔比为 1:2。然而, 在实际实验中, 内化效率受细胞类型、抗原表达水平、抗体表位及亲和力等多种因素影响, 因此需在早期阶段探索两者的最佳配比。具体方法如下: 固定 DT3C 浓度, 设置抗体浓度梯度, 以确定最佳抗体内化浓度; 按照抗体与 DT3C 不同摩尔比, 筛选最佳 DT3C 浓度。

产品推荐

全式金发光法细胞活性检测试剂盒 *TransDetect*[®] Luminescent Cell Viability Detection Kit, 为单一组分的即用型试剂, 将等体积的试剂直接加入到细胞培养物中混匀, 10 分钟即可进行检测, 简单快速。产品灵敏度高, 线性范围宽, 在 5 个至 10 万个细胞范围内有良好的线性关系。产品产生的“辉光型”发光信号稳定, 半衰期可达 3 个小时, 兼容少量样品检测及大量样品的高通量筛选检测。

产品编号	产品名称	信号半衰期
FC401	发光法细胞活性检测试剂盒 <i>TransDetect</i> [®] Luminescent Cell Viability Detection Kit	>3 小时

本产品仅供研究, 不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202605

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

