

MACS 纳米抗体文库选择

介绍

我们编写了下面的协议(Protocol)，目的是使体外纳米抗体选择的步骤尽可能清晰和广泛适用，但重要的是要认识到任何纳米抗体发现工作都可能具有独特的要求。请将本实验方案视为设计实验的起点，而不是如何进行选择的最终决定。这种方法的变体已成功地分离出几乎所有测试抗原的纳米抗体，但非结构化肽除外。

任何选择实验中的关键挑战不是避免“丢失”活性克隆，而是有效清除数百万个不具有所需活性的纳米抗体。努力去除与二抗、微珠或蛋白质标签结合的纳米抗体是绝对必要的。如果您允许选择过程找到捷径，它就会。考虑到这些因素，大多数抗原的选择将产生亲和力范围为 10 nM 至 1 μ M 的纳米抗体。

附录中列出了“单引号”中的项目的食谱和目录号

抗体库恢复和扩展

1. 将酵母纳米抗体库 (NbLib) 的冷冻等分试样置于 30° C 下解冻，以便可恢复的酵母超过库多样性至少五倍。对于完整的初始文库，总共需要 2.5×10^9 个活细胞。
2. 在 1 L 的“Yglc4.5 - Trp”中回收酵母，以 230 RPM、30° C 摇动过夜。您可能需要在重悬后立即取少量文库细胞样本并铺在 YPD 琼脂上以测量多样性。
3. 扩增至 3 L 培养基，让酵母生长至稳定期。大约 48 小时，OD 通常在 10 到 30 之间。
4. 测量酵母的 OD600 以计算密度 (OD600 为 1 $\approx 1.5 \times 10^7$ 酵母)
5. 在 3500 \times g 下旋转培养物 5 分钟，并重悬于补充有 10% DMSO 的“Yglc4.5 - Trp”中，使最终密度为每毫升 10^{10} 个细胞。等分至 2 mL 冷冻管中，并在 -80° C 的细胞冷冻室中冷冻 (Thermofisher Scientific 目录号 5100-0001)。每个小瓶在回收后应含有足够的活细胞以重建完整的文库。

纳米抗体表达的诱导

纳米抗体的表达受到 **GAL1** 启动子的控制，因此当酵母在含有半乳糖的培养基中生长时，纳米抗体仅在细胞表面产生。

1. 通过稀释 $\geq 10 \times$ 文库多样性来诱导 **NbLib** 的纳米抗体表达 - Trp + 半乳糖培养基，然后在 25°C 、**220 rpm** 条件下摇动 **48** 小时。至少使用 5×10^9 个酵母细胞进行接种，以确保传代过程中不会丢失克隆。

(我们发现最佳表达水平在 48 至 72 小时之间。)

无菌注意事项：在整个选择过程中保持无菌环境至关重要。与标准酵母工作不同，您的酵母细胞将在几周内进行多次传代，从而增加了污染的可能性。我们为每种选择推荐无菌过滤吸头和新鲜灭菌的培养基。在选择过程中，经常用乙醇擦拭您的手、工作台和移液器。也可以使用无菌罩，但通常只要采取合理的护理，常规的实验室工作台就可以了。

纳米抗体表达测试

在进行任何选择之前，最好确认纳米抗体表达已被有效诱导。我们通过如下所述的快速分析流式细胞术检测来检查这一点。

1. 测量诱导 **NbLib** 酵母的细胞密度 ($1 \text{ OD}_{600} \approx 1.5 \times 10^7$ 细胞/mL)
2. 将 $500 \mu\text{l}$ “选择缓冲液” 添加到两个微量离心管中
3. 将约 1×10^6 诱导酵母移入每个微量离心管中，并在 $3500 \times g$ 、 4°C 下离心 1 分钟
4. 吸出上清液并在 $100 \mu\text{l}$ 选择缓冲液中重悬沉淀
5. 向一根试管中添加约 $0.5 \mu\text{g}$ **AlexaFluor647** 或 **AlexaFluor488** 标记的抗 HA 抗体（以检查表达纳米抗体的细胞百分比）和 $1 \mu\text{M}$ 最终浓度的用光谱不同染料标记的蛋白质（以检查您的抗原是否非特异性结合）酵母）。保持另一管不染色作为对照
6. 将两个管在 4°C 下摇动 15 分钟
7. 在 $3500 \times g$ 、 4°C 下离心细胞 1 分钟
8. 吸出上清液并在 $500 \mu\text{L}$ 选择缓冲液中重悬细胞
9. 像以前一样离心细胞并吸出上清液
10. 将细胞重悬于 $100 \mu\text{l}$ 选择缓冲液中，并使用未染色的样品置于在流式细胞仪上评估纳米抗体表达水平

注意：初始文库中表达细胞的最大数量约为 25%。表达细胞的典型数量约为 15-20%。如果表达处于低端（~8-12%），请考虑增加用于纳米抗体选择的细胞数量以进行补偿。

纳米抗体选择

下面的选择过程是识别与目标蛋白结合的克隆的核心。该协议描述了如何使用磁性细胞分选将抗原结合纳米抗体克隆与非结合剂分离，分两个主要步骤：“预清除”或阴性选择步骤，然后是阳性选择步骤。这些通常在同一天连续进行。预清除步骤用于耗尽与二抗、磁珠等物质结合的任何纳米抗体库。正选择步骤分离与抗原结合的克隆。选择后，您可以扩展富集的细胞并重复该过程，直到结合物高度富集。

11. 旋转合适数量的细胞以获得至少 10 倍的文库多样性。对于库（NbLib），您将需要 5×10^9 个单元。在一轮或多轮选择之后，可以基于估计的分集使用较少数量的小区。我们建议始终使用至少 1×10^7 个单元，因为较小的单元数难以操作。在 $3500 \times g$ 、 $4^\circ C$ 下离心 3 分钟
12. 吸出培养基并通过移液器移入 10 mL 冷冻选择缓冲液中重悬酵母
13. 在 $3500 \times g$ 、 $4^\circ C$ 下离心酵母 3 分钟并吸出上清液
14. 在 4.5 mL 选择缓冲液中重悬酵母
15. 通过将 500 μ l 的“Miltenyi 抗荧光团珠”添加到重悬的酵母中，开始预清除，以从初始文库中去除脱靶结合物（如果使用二抗进行选择，请将其也添加到预清除反应中。
~200 nM 通常足以去除二次结合剂）
16. $4^\circ C$ 下缓慢摇动/旋转 40 分钟
17. 孵育结束前大约 20 分钟，将“LD 柱”放置在 Miltenyi MACS 磁体上。将 15 mL 无菌猎鹰放在柱下，并在柱顶部放置 50 mL 猎鹰帽以保持无菌。将 5 mL 的选择缓冲液添加到 LD 列中，使其在下一步之前达到平衡。完全流过大约需要 20 分钟
18. 在 $4^\circ C$ 下以 $3500 \times g$ 离心酵母 3 分钟，并吸出缓冲液和未结合的珠子
19. 通过移液至 5 mL 选择缓冲液中重悬。
20. 将酵母流过平衡的 LD 柱，将流出物收集在新的无菌 15mL 离心管中
21. 用额外的 2 mL 选择缓冲液清洗柱，冲洗掉剩余的细胞
22. 从磁铁上取下 LD 柱并丢弃
23. 在 $4^\circ C$ 下以 $3500 \times g$ 离心流过并吸出上清液

24. 为了重悬酵母，添加 5mL 选择缓冲液，其中含有浓度为 1-1.5 μ M 的荧光团标记抗原（如果使用二抗进行染色 - 在染色酵母之前将二抗与抗原预孵育，并使用摩尔浓度为 2: 3 的二抗抗原）
25. 4° C 缓慢摇动或旋转 1 小时
26. 在 4° C 下以 3500 \times g 离心酵母 3 分钟并吸出上清液
27. 将酵母重悬于 4.5 mL 选择缓冲液和 500 μ l 抗荧光团珠中
28. 4° C 缓慢摇动或旋转 20 分钟
29. 孵育结束前大约 5 分钟，将“LS 柱”放置在 Miltenyi MACS 磁体上。将 15 mL 无菌 falcon 管放在柱下，并在柱顶部放置 50 mL 盖以保持无菌。将柱塞包裹在包装中以便以后使用。将 5 mL 的选择缓冲液添加到 LS 列中，并使其在下一步之前达到平衡。完全流过大约需要 5 分钟
30. 在 4° C 下以 3500 \times g 离心酵母 3 分钟，并吸出缓冲液和未结合的珠子
31. 通过移液至 3 mL 选择缓冲液中重悬酵母并按上述方法离心
32. 吸出上清液并在 3 mL 选择缓冲液中重悬酵母
33. 取出 50 μ l 重悬酵母的“pre-LS”等分试样，留作以后分析。将等份置于冰上。
34. 将酵母流过平衡的 LS 柱，并将流过的液体收集到新的无菌 15 mL 离心管中
35. 用 8 mL 选择缓冲液清洗柱
36. 记录大约流过的体积并取出 50 μ l “流过”等分试样以供以后分析。
37. 从磁体上取下 LS 柱，并将其置于新鲜的无菌 15 mL 离心管上
38. 将 5 mL 选择缓冲液添加到柱中，并立即使用柱塞洗脱细胞
39. 从洗脱的细胞中取出 50 μ l “洗脱”等分试样，留作以后分析。将等份置于冰上。
40. 在 4° C 下以 3500 \times g 旋转洗脱 3 分钟，并吸出缓冲液，注意不要干扰沉淀
41. 将酵母重悬于 14 mL Falcon 培养管中的 3 mL - TRP + 葡萄糖中
42. 30°C 振荡约 24 小时即可恢复。
43. 使用流式细胞术比较来自预 LS 和洗脱等份的酵母数量，并使用该比率来估计文库多样性的减少。

下一步：回收酵母后，您可以在半乳糖培养基中重新诱导以进行另一轮选择，并迭代直至分离出结合剂。最好在每一轮选择中使用不同的荧光团。我们通常执行两次 MACS 选择，然后进行 FACS 分类以分离结合物。

对于 FACS 分选，您可以按照上述方法用抗原染色来制备酵母。如何分类的细节取决于具体项目和所使用的分类设备。一旦您选择的文库具有高比例的活性克隆（通常占细胞总数的 20% 或更多），您就可以继续进行筛选。

为了筛选，在 -TRP 平板上对酵母进行平板分选以获得单克隆。在无菌深孔 96 孔板中培养单个克隆，每孔一个克隆。然后诱导表达并对克隆进行染色以鉴定具有最高活性的克隆。最后，酵母小量制备或菌落 PCR 可用于分离纳米抗体 DNA 以进行分析和重组表达。请注意，并非每个对酵母具有活性的克隆都保留重组形式的活性。绝大多数克隆都会显示两种格式的活性，但也有一些例外。

附录

Yglc4.5 - 色氨酸 (1升)

3.8 克 - Trp 脱落培养基补充剂 (美国生物US Biological)

6.7 克酵母氮基

10.4克柠檬酸钠

7.4 克 一水柠檬酸

10 mL Pen-Strep (10,000 单位/mL 库存)

20克葡萄糖

调节pH至4.5；灭菌过滤器 (或对20% 葡萄糖的库存进行灭菌过滤，并在高压灭菌后添加抗生素)。

- 色氨酸 (+葡萄糖或+半乳糖 - 1升)

3.8 g - 色氨酸脱落培养基补充剂 (美国生物)

6.7 克酵母氮基

10 mL Pen-Strep (10,000 单位/mL 库存)

20 g 葡萄糖或半乳糖 (葡萄糖用于正常生长，半乳糖用于诱导纳米抗体)

调节pH至6；灭菌过滤器 (或对20% 葡萄糖或半乳糖的库存进行灭菌过滤，并在高压灭菌后添加抗生素)。

YPAD (1升)

20 g 细菌蛋白胨

20 g 葡萄糖

10 克酵母提取物

18 毫克腺嘌呤

10 mL Pen-Strep (10,000 单位/mL 保存)

选择缓冲液*

20 mM HEPES pH 7.5

150 mM 氯化钠

0.1% (w/v) 牛血清白蛋白

5 mM 麦芽糖

使用前过滤除菌。

**许多其他缓冲液也同样有效，具体取决于您可能需要修改的蛋白质。例如，对于GPCR，我们通常添加0.1% (w/v) 月桂基麦芽糖新戊二醇清洁剂。*

无需调整pH值。灭菌过滤器或高压灭菌器 (视情况而定)。

MACS 配件目录号

本中文版由北京沫之东生物技术公司翻译、校准、发布，仅供参考。但实际试验操作使用中您应当合理使用本手册并负有完全的责任。
本文可以不受限制的与他人共享。

抗 Cy5/抗 Alexa Fluor 647 微珠	美天旎生物技术公司	Cat# 130-091-395
抗 FITC 微珠	美天旎生物技术公司	Cat # 130-048-701
LD柱	美天旎生物技术公司	Cat # 130-042-901
LS柱	美天旎生物技术公司	Cat # 130-042-401