

纳米抗体库常见问题解答

解冻抗体库

问：我可以只使用文库等份的一半并重新冷冻其余部分以备后用吗？

不可以。您应该解冻并使用整个等分试样，以确保文库多样性不会损失。重新冷冻会降低活力。我们建议尽可能严格地遵循扩展协议。

光密度

问：我的 OD600 测量值没有饱和酵母培养物预期的 10-20 高；有什么不对？

有可能，但也可能没有。生长 48-72 小时后，细胞培养物应在 OD 测量之前稀释至少 50 倍。为了使用大多数分光光度计进行准确测量，稀释后测得的 OD 值应小于 1。培养物应呈不透明，呈灰白色/微黄色，离心时每升培养物应产生约 15 毫升细胞沉淀（见下图）。如果 OD 值似乎较低，但培养物似乎已饱和，则铺板细胞以测试活力将更准确地了解文库质量。也可以使用血细胞计数器在显微镜下计数细胞来验证细胞密度。



2 升饱和酵母培养物 来自 500 ml 饱和和培养物的细胞沉淀

培养基组份

问：制作各种基础培养基所用的具体产品是什么？

色氨酸丢失：美国生物D9531

酵母氨基：Himedia M878

葡萄糖：西格玛G8270

半乳糖：迪夫科 216310

Pen/链球菌：Gibco 15140-122

柠檬酸钠：Ward's Science 470302-530

柠檬酸：MP生物医学150699

问：我可以使用 SDCAA 或其他成分来代替方案中的配方吗？

不会。方案中描述的培养基旨在补充 BJ5465 细胞系中的所有营养缺陷型。如果您选择使用不同的培养基成分，您应该仔细检查以确保包含必要的营养成分。

通道量(Passage volume)

问：应使用多少体积的 -Trp + 半乳糖来诱导初始文库中的表达？

1升适合诱导天然文库。饱和培养物的细胞密度约为 4×10^8 个细胞/毫升。您应该将其传代到诱导培养基中，以使该表达培养物的起始细胞计数在 1×10^7 至 2×10^7 个细胞/ml 之间。例如，您应该在 1 升诱导培养基中添加 25 毫升饱和培养物。需要考虑的两个主要事项是如上所述的起始细胞密度，但也要确保至少 10 倍的文库多样性被传代以进行表达。例如，在上面的示例中，25 ml 培养物包含约 1×10^{10} 个细胞，大约是文库多样性的 20 倍。

平铺细胞

问：我应该在解冻小瓶后立即对细胞进行平板培养以测试活力吗？

是的。应在将解冻的小瓶重新悬浮于 - Trp + 葡萄糖中后立即进行此操作。此时，细胞密度已知（1 L 中为 2×10^7 个细胞/ml）。可以取 1 毫升，进行连续稀释以获得三管 20000、2000 和 200 个细胞。每管可取 100 μ l 进行铺板（平板中含有 2000、200 和 20 个细胞）。

生长的集落数量（48 小时后）可用于确定细胞培养物的平均活力百分比。

我的细胞在短短 24 小时内就产生大量菌落，为什么？

如果菌落出现得更快，则很可能是细菌或野生酵母污染。如果您的液体培养物生长非常快并且没有表现出纳米抗体表达，这也可能表明存在污染。使用无菌技术并使用抗生素以尽量减少污染风险。由于 BJ5464 细胞缺乏 URA3 基因，因此可以通过添加 5' FOA 来清除野生酵母污染。