



dianova

6 Schritte zum richtigen Antikörper



## 2. Schritt: Aus welcher Wirtsspezies soll der Antikörper stammen ?

Erfahrungsgemäß sind Antikörper aus der Ziege oder dem Esel für den Nachweis von Primärantikörpern der meisten Spezies geeignet. Weitere Angaben entnehmen Sie bitte der Tabelle.

Bei indirekten Mehrfachmarkierungen mit unkonjugierten Primärantikörpern sollten alle Sekundärantikörper-Konjugate möglichst aus derselben Wirtsspezies stammen, damit Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper untereinander vermieden werden.

Stark präadsorbierte Antikörper (siehe Schritt 5) aus dem Esel sind zwar spezifischer als die weniger adsorbierten aus anderen Wirtsspezies, können aber aus diesem Grund auch weniger sensitiv sein!

Es stehen folgende Spezies zur Auswahl:

- Esel
- Kaninchen
- Maus
- Ratte
- Rind
- Schaf
- Ziege

### Immunpräzipitation

Sollen Antigen-Antikörper-Komplexe von anderen Komponenten mittels Protein A-Agarose getrennt werden, werden vorzugsweise Kaninchen-Antikörper eingesetzt. Diese binden besser an Protein A als Antikörper aus Ziege oder anderen Spezies. IgG aus Ziege, Schaf und Esel, aber auch aus Kaninchen binden gut an Protein G.

www.dianova.de

#### Produkte: Systematische Suche

#### Sekundärantikörper & Konjugate

Keine Einschränkung  IgG-Form  
 Keine Einschränkung  Aus Spezies  
 Keine Einschränkung  Anti Spezies  
 Keine Einschränkung  Spezifität  
 Keine Einschränkung  Konjugation

- Wählen Sie „Aus Spezies“ im Dropdownmenü.

Keine Einschränkung   
 Keine Einschränkung  
 Esel  
 Kaninchen  
 Maus  
 Ratte  
 Rind  
 Schaf  
 Ziege

Anti-Spezies	Aus-Spezies					
	Esel	Kaninchen	Maus	Ratte	Schaf	Ziege
Meerschweinchen	+					+
Hamster (arm.)						+
Hamster (syr.)		+				+
Huhn	+	+				
Human	+	+	+			+
Hund		+				
Kaninchen	+		+			+
Katze						+
Maus	+	+		+	+	+
Pferd		+				
Ratte	+	+	+			+
Rind						+
Schaf	+	+				
Schwein						+
Ziege	+	+	+			

Die Tabelle zeigt, welche Sekundärantikörper zum Nachweis welcher Primärantikörper geeignet sind.

6 Schritte zum richtigen Antikörper

### 3. Schritt: Gesamtmolekül (H+L), F(ab')<sub>2</sub>- oder Fab-Fragment?

Achtung diese Auswahlmöglichkeit bezieht sich **nicht** auf die **Spezifität** des Sekundärantikörpers, sondern nur auf dessen **Form!**

Ein Immunglobulin besteht aus je zwei identischen leichten („L“ight) bzw. schweren („H“eavy) Polypeptidketten, die ein Y bilden, d.h. spiegelsymmetrisch angeordnet sind. Der untere Bereich des „Y“ wird aus den unteren Bereichen der H-Ketten gebildet und als Fc-Fragment (fragment crystallizable) bezeichnet. Die beiden Arme, die jeweils aus dem oberen Teil der H-Kette und einer L-Kette gebildet werden, heißen Fab-Fragment (antigen binding fragment).

Proteolytische Vorbehandlung mit Papain führt zur Spaltung in zwei monovalente Fab-Fragmente und das Fc-Fragment, während die proteolytische Behandlung mit Pepsin zur Spaltung in ein verkürztes Fc-Fragment und ein bivalentes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment führt.

Es stehen folgende Möglichkeiten zur Auswahl:

**Antiseren** gegen IgG-Gesamtmoleküle (anti-IgG (H+L)) werden vor allem für den Einsatz als Brückenantikörper bei der PAP- und APAAP-Methode empfohlen.

Das **IgG, Gesamtmolekül** ist die am häufigsten verwendete Produktform und für die meisten Anwendungen am besten geeignet.

**F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente** werden verwendet, wenn verhindert werden soll, dass der Sekundärantikörper an Fc-Rezeptoren auf Zelloberflächen bindet, um so eine Hintergrundfärbung zu vermeiden. Sie haben bessere Diffusionseigenschaften, da sie kleiner als Gesamtmoleküle sind und können sie nicht über den Fc-Teil aggregieren. Beide Eigenschaften können für spezielle Anwendungen von Vorteil sein.

**Fab-Fragmente** werden nur für sehr spezielle Anwendungen eingesetzt (s. Kasten).

#### Einsatz von Fab-Fragmenten

**Fab-Fragmente** werden zur Blockierung und Doppelmarkierung von Primärantikörpern aus derselben Spezies oder als Blockierungsreagentien in der Immunhistochemie eingesetzt, bei denen das Zielgewebe und der Primärantikörper aus derselben Spezies stammen.

www.dianova.de

#### Produkte: Systematische Suche

#### Sekundärantikörper & Konjugate

Keine Einschränkung	IgG-Form
Keine Einschränkung	Aus Spezies
Keine Einschränkung	Anti Spezies
Keine Einschränkung	Spezifität
Keine Einschränkung	Konjugation
<input type="button" value="Suchen"/>	

- Wählen Sie die „IgG-Form“ im Dropdownmenü. Diese Angabe bezieht sich auf die „aus Spezies“!

Keine Einschränkung
Keine Einschränkung
Keine Einschränkung
Antiserum
IgG, F(ab)2-Fragment
IgG, Fab-Fragment
IgG, Gesamtmolekül

#### Fc-Rezeptorinteraktion mit Primärantikörpern

Ein **Primärantikörper**, der in der Regel ein Gesamtmolekül ist, kann ebenfalls an Fc-Rezeptoren binden, so dass das Blocken mit Normalserum aus derselben Wirtsspezies wie der Sekundärantikörper stammt, nicht immer erfolgreich ist.

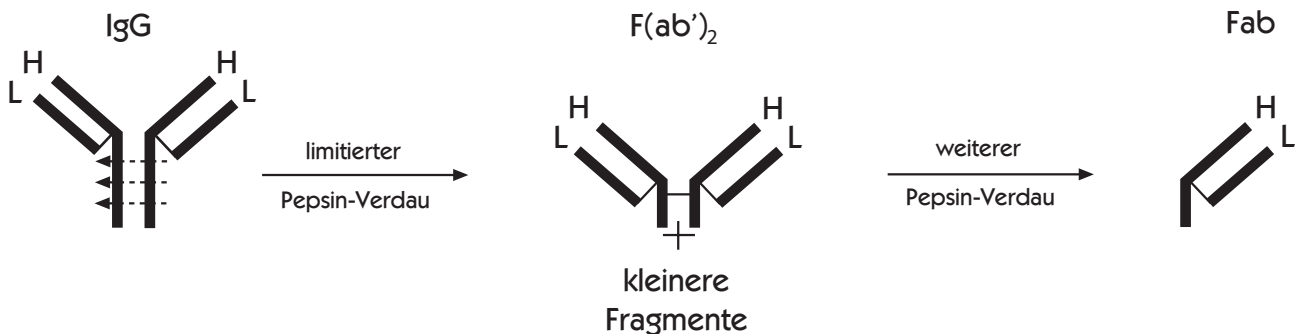


Abbildung: Gesamtmolekül (H+L), F(ab')<sub>2</sub>- oder Fab-Fragment

6 Schritte zum richtigen Antikörper

### 4. Schritt: Welche Spezifität - anti-(H+L), anti-Fc oder anti-F(ab')<sub>2</sub>?

Fünf Immunglobulinklassen lassen sich in Säugern unterscheiden (IgG, IgA, IgM, IgE und IgD). Die Unterschiede zwischen diesen Klassen befinden sich im Bereich der H-Ketten.

Bei Hühnern werden die IgG-ähnlichen Antikörper aus historischen Gründen als IgY bezeichnet.

Darüber hinaus werden IgG und IgA noch in vier bzw. zwei Subklassen eingeteilt, die untereinander geringere Unterschiede in der H-Kette aufweisen als dies zwischen den Hauptklassen der Fall ist.

Unterschiede sowohl zwischen den Haupt- als auch den Subklassen treten ausschließlich im Bereich der H-Ketten auf. Im Bereich der L-Ketten gibt es zwei Varianten ( $\kappa$  und  $\lambda$ ). Dabei überwiegt die  $\kappa$ -L-Kette im Normalserum stark.

Für die meisten Anwendungen im Bereich Western-Blot, Immunhistochemie und Durchflusszytometrie eignen sich Antikörper die gegen IgG (H+L) gerichtet sind.

#### anti-IgG (H+L):

Die Tierspezies (z.B. Ziege), in der das Antiserum gewonnen werden soll („Wirt“), wird mit aufgereinigtem IgG-Gesamtmolekül (H+L) (z.B. aus Maus) immunisiert. Das so gewonnene Antiserum enthält Antikörper, die sowohl gegen die leichte als auch gegen die schwere Kette des IgG-Moleküls gerichtet sind. Dieses Antiserum reagiert sowohl mit den F(ab')<sub>2</sub>-Anteilen als auch mit dem Fc-Anteil des IgG. Anti-IgG reagiert deshalb auch sehr gut mit anderen Immunglobulinklassen (IgM, IgA, IgE), da diese dieselben leichten Ketten ( $\kappa$  und  $\lambda$ ) haben. Anti-IgG (H+L) Antikörper, die nicht präadsorbiert sind (siehe Schritt 6), besitzen ca. 40% - 60% Reaktivität mit leichten Ketten. Bei hoch adsorbierten anti-IgG (H+L) Antikörpern kann diese wesentlich geringer ausfallen. So bindet z.B. Katalog-Nr. 705-XXX-147 nur zu 9% - 30% an leichte Ketten.

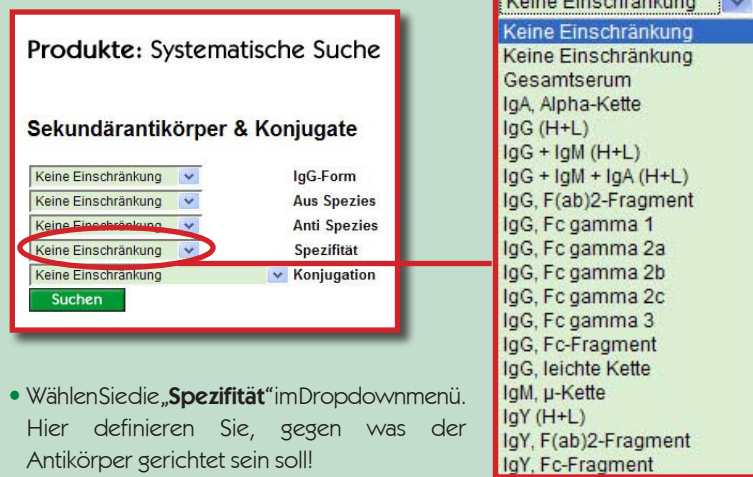
#### anti-IgG + IgM (H+L):

In einer Mischung von anti-IgG + IgM (H+L) variiert die Reaktivität mit leichten Ketten von 30% bis 45%. Die anti-IgM-Gesamtreaktivität (einschließlich gegen leichte Ketten) in der Mischung liegt ca. zwischen 55% - 70%.

#### anti-IgG F(ab')<sub>2</sub>-Fragment:

Diese Antikörper werden durch Immunisierung mit aufgereinigtem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment des Gesamt-IgG gewonnen. Da der Anteil an schwerer Kette des F(ab')<sub>2</sub>-Fragments nur sehr schwach immunogen wirkt, erhält man auf diese Weise Antikörper, die, abhängig vom Grad ihrer Präadsorption (siehe Schritt 6), zu mehr als 60% gegen die leichte Kette gerichtet sind. Anti-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Antikörper werden zusätzlich gegen IgG Fc-Fragment präadsorbiert und reagieren deshalb nur mit dem Fab-Teil des IgG.

www.dianova.de



- Wählen Sie die „Spezifität“ im Dropdownmenü. Hier definieren Sie, gegen was der Antikörper gerichtet sein soll!

**Wichtig:** In der Produktgruppe „Sekundärantikörper und Konjugate“ finden Sie aus Gründen der internen Produktsortierung nur (polyklonale) Antikörper der Firma Jackson ImmunoResearch. Weitere (monoklonale) Antikörper, die ebenfalls als Sekundärantikörper einsetzbar sind, finden Sie in der Produktgruppe:

„Isotyp-spezifische Antikörper & Konjugate“

Mit diesen Immunreagenzien lassen sich alle Ig-Klassen und Subklassen (IgM, IgG1-4, IgA, etc.) gleichmäßig nachweisen. Diese Antikörper sind also optimal geeignet, wenn alle Ig-Klassen unabhängig von der Subklasse nachgewiesen werden sollen oder wenn nicht sicher ist, welcher Klasse der Primärantikörper angehört.

Da das jeweilige Antiserum (z.B. aus der Ziege) überwiegend gegen leichte Ketten des  $\kappa$ -Typs gerichtet ist, ist die Sensitivität von anti-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Antikörpern bei der Erkennung von Primärantikörpern, die leichte Ketten vom  $\lambda$ -Typ tragen, eingeschränkt. Anti-IgG (Fc) oder anti-IgG (H+L) Antikörper können hier eine höhere Sensitivität bieten.

### Fortsetzung: Welche Spezifität - anti-(H+L), anti-Fc oder anti-F(ab')<sub>2</sub>

#### anti-IgG, Fc-Fragment:

Die Immunisierung (z.B. der Ziege) mit aufgereinigtem IgG Fc-Fragment (z.B. aus der Maus) führt zu Antikörpern, die hochspezifisch die schwere Kette des IgG-Moleküls detektieren. Da die Unterschiede der verschiedenen Immunglobulinklassen im Bereich der schweren Kette liegen, lassen sich hier sehr gut IgG, nicht aber IgM, IgA und IgE nachweisen. Diese Fc-Fragment-spezifischen Antikörper werden zusätzlich gegen F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente präadsorbiert. In einigen Fällen wird zudem eine mögliche Kreuzreaktion gegen IgM und IgA (anti-Human) oder nur gegen IgM (anti-Maus, anti-Ratte) durch weitere Präadsorption(en) minimiert. Diese Antikörper (anti-Human, anti-Maus, anti-Ratte) sind durch „Fcγ“ gekennzeichnet. Sie weisen weniger als 1% Restaktivität gegen leichte Ketten oder IgM bzw. IgA auf.

**Vorsicht:** Anti-IgG (Fc) Antikörper reagieren nicht mit allen IgG Subklassen gleich gut wie anti-IgG, F(ab')<sub>2</sub>-Fragment-spezifische Antikörper. Wegen des geringen Prozentsatzes an Antikörpern gegen die seltenen IgG-Subklassen (IgG3 und IgG4) sollten zum Nachweis dieser Subklassen besser anti-IgG (H+L) oder anti-IgG F(ab')<sub>2</sub>-Antiseren verwendet werden.

Für einen Nachweis der Maus IgG-Subklassen mit annähernd gleicher Sensitivität empfehlen wir den Ziege anti-Maus IgG (Subklassen 1, 2a, 2b und 3) Fcγ-Fragment-spezifischen Antikörper (Katalog-Nr. 115-XXX-164), der eine ausgeglichene Reaktivität gegenüber diesen Subklassen besitzt.

#### anti-IgM (μ-Kette), anti-IgM Fc<sub>5μ</sub>:

Zur Herstellung von IgM-spezifischen Antikörpern wird die Wirtsspezies (z.B. Ziege) mit aufgereinigtem IgM (Maus und Ratte) oder Trypsin-verdautem, gereinigtem IgM Fc<sub>5μ</sub> (Human) immunisiert. Nach affinitätschromatographischer Reinigung werden die anti-Maus und anti-Ratte IgM (μ-Kette)-spezifischen Antikörper gegen IgG adsorbiert. Die anti-Human IgM Fc<sub>5μ</sub> werden gegen IgG und IgA adsorbiert. Die anti-IgM-spezifischen Antikörper weisen in der Regel weniger als 1% Restaktivität gegen IgG oder leichte Ketten auf.

### Schritt 5: Welche Konjugation?

Die Wahl der Konjugate hängt von der eingesetzten Methode und der gewünschten Art der Detektion ab (enzymatisch, verstärkt, direkt, etc.). Insbesondere bei den Fluoreszenzfarbstoffen ist darauf zu achten, dass die notwendigen Anregungsquellen und Filter zur Verfügung stehen.

Auf der nächsten Seite finden Sie drei Tabellen mit Basisinformationen, die Ihnen die Auswahl der richtigen Konjugation erleichtern soll.

Für fluoreszenzbasierte Methoden in der Immunhisto- und Zytochemie empfehlen wir Ihnen, generell photostabile Farbstoffe wie Carbocyanine (z. B. Cy2, Cy3) traditionellen Farbstoffen (z. B. FITC, TRITC) vorzuziehen.

www.dianova.de

#### Produkte: Systematische Suche

##### Sekundärantikörper & Konjugate

Keine Einschränkung	IgG-Form
Keine Einschränkung	Aus Spezies
Keine Einschränkung	Anti Spezies
Keine Einschränkung	Spezifität
Keine Einschränkung	Konjugation
<b>Suchen</b>	

Keine Einschränkung

Keine Einschränkung

Alkalische Phosphatase

AMCA (Aminomethyl-Coumarin-Acetat)

APC (Allophycocyanin)

Biotin

Cy2 (Carbocyanin)

Cy3 (Indocarbocyanin)

Cy5 (Indodicarbocyanin)

FITC (Fluorescein)

Gold 12nm

Gold 18nm

Gold 4nm

Gold 6nm

HRPO (Meerrettichperoxidase)

R-Phycerythrin (R-PE)

Rhodamin Red-X

Texas Red

TRITC (Tetramethylrhodamin)

unkonjugiert

- Wählen Sie „Konjugation“ im Dropdownmenü.
- Starten Sie die Suche durch anklicken des **Suchen-Buttons**:

Sie erhalten eine Trefferliste mit allen Produkten die Ihre Kriterien erfüllen. Aus der Liste können Sie sich ein Produkt mit passender Adsorption aussuchen (s. Schritt 6, Seite 8)

### Fortsetzung: Welche Konjugation?

Tabelle 1: Anwendungen und empfohlene Verdünnungen für Antikörper und Konjugate

Konjugat	ELISA	Western Blot	Histo-/Zytochemie	Durchflusszytometrie
Unkonjugiert	10-20 µg/ml			
Cy2 und andere Fluorophore			1:50 – 1:200	1:50 – 1:200
Cy3 und Cy5			1:100 – 1:800	1:100 – 1:800
Phycoerythrin			(1:50 – 1:200)	1:50 – 1:200
APC (Allophycocyanin)				1:50 – 1:200
Peroxidase (HRPO)	1:5.000 – 1:100.000	1:5.000 – 1:100.000 (non-ECL) 1:10.000 – 1:200.000 (ECL)	1:500 – 1: 5.000	
Alkalische Phosphatase	1:5.000 – 1:50.000	1:5.000 – 1:50.000	1:500 – 1:5.000	
Biotin-SP für den Nachweis mit fluorochromiertem Streptavidin			1:200 – 1:1.000	1:200 – 1:1.000
mit Enzym-konjugiertem Streptavidin	1:20.000 – 1:400.000	1:20.000 – 1:400.000	1:500 – 1:5.000	
4 nm Gold			1:20 – 1:200	
6, 12 nm Gold			1:20 – 1:40	
18 nm Gold			1:10 – 1:20	

Tabelle 2: Anregungs- Emissionsmaxima für Fluorochrome

Fluorochrome	Anregung(nm)**	Emission(nm) **	Farbe
AMCA Aminomethylcoumarin-Acetat	350	450	blau
FITC* Fluorescein-Isothiocyanat	492	520	gelb-grün
Cy2 Carbocyanin	492	510	gelb-grün
Cy3 Indocarbocyanin	550	570	rot
TRITC Tetramethyl-Rhodamin	550	570	rot
R-PE Phycoerythrin*	488/565	585	orange-rot
Rhod. Red-X Rhodamin Red-X	570	590	rot
Texas Red Rhodaminderivat	596	620	rot
Cy5 Indodicarbocyanin	650	670	tief-/infrarot
APC Allophycocyanin	650	660	tief-/infrarot

Tabelle 3: Enzyme und Substrate

Enzym	Substrat	Produktfarbe
Alkalische Phosphatase	BCIP/NBT	dunkelblau-violett
	Fast Red	rot (intensivrot)
	Neufuchsin	rosarot (fuchsinrot)
HRPO	DAB	braun
	AEC	rotbraun
	TMB	dunkelblau

### 6. Schritt: Welche (Prä)-Adsorption

Prinzipiell können Antikörper einer bestimmten Spezies mit Serumproteinen vieler anderer Spezies mehr oder weniger stark kreuzreagieren. Deshalb werden Antikörper teilweise gegen Serumproteine einer oder mehrerer Fremdspezies präadsorbiert, wodurch eine Kreuzreaktivität mit Molekülen dieser Spezies weitgehend ausgeschlossen werden kann (Kreuzreaktivität < 1%). Die deutsche Bezeichnung „adsorbiert gegen: ...“ wird im englischen Sprachraum dabei als „minimal crossreactivity“ (minX) bezeichnet.

Dies wird empfohlen, wenn die mögliche Anwesenheit von Immunglobulinen anderer Spezies im Versuchsansatz zu Kreuzreaktionen führen kann.

Falls mehrere Präadsorptionen angeboten werden, sollte berücksichtigt werden, dass Antikörper, die gegen zu **nahe verwandte Spezies** adsorbiert wurden, z.T. eine stark reduzierte Epitoperkennung aufweisen und deshalb einige monoklonale Antikörper nur noch schwach erkennen. Dies gilt insbesondere für anti-Maus IgG (**adsorbiert gegen Ratte**), anti-Ratte IgG (**adsorbiert gegen Maus**) oder anti-(arm.)Hamster IgG (**adsorbiert gegen Maus, Ratte**).

Präadsorbierte Antikörper reagieren möglicherweise mit einigen IgG-Subklassen v. a. IgG2b, IgG2c und IgG3) nicht gut. Dies gilt besonders für die Subklassen, die weitestgehend homolog mit der Spezies sind, gegen die präadsorbiert wurde, d.h. insbesondere bei nahe verwandten Spezies. So sollte beispielsweise anti-Maus IgG, das gegen Ratten-IgG präadsorbiert wurde, nur eingesetzt werden, wenn ein Primärantikörper aus der Maus a) in Rattengewebe, welches Ratten-Immunglobuline enthält oder b) in anderen Geweben neben einem Primärantikörper aus der Ratte nachgewiesen werden soll.

Rinderserumalbumin (BSA) und Trockenmilch aus Rind enthalten meist Verunreinigungen boviner Immunglobuline, welche mit anti-Rind, anti-Ziege, anti-Pferd und anti-Schaf IgG Antikörpern reagieren. Daher kann die Verwendung von BSA

und/oder Trockenmilch zur Blockierung oder Verdünnung dieser Sekundärantikörper die Hintergrundfärbung signifikant erhöhen oder den Antikörpertiter reduzieren. Um dieses Problem zu umgehen, empfiehlt sich die Verwendung von speziell IgG-freiem BSA von Jackson ImmunoResearch (z.B. Katalog-Nr. 001-000-161).

www.dianova.de

**Sekundärantikörper & Konjugate**

IgG, Gesamtmolekül  IgG-Form  
 Ziege  Aus Spezies  
 Kaninchen  Anti Spezies  
 IgG (H+L)  Spezifität  
 HRPO (Meerrettichperoxidase)  Konjugation

**Suchen**

**Beispiel:** Sie wollen ein Protein mit einem Kaninchenserum im Western Blot nachweisen. Als Detektionsreagenz setzen Sie ECL ein. Sie wählen:

- IgG-Form: IgG, Gesamtmolekül
- Aus Spezies: Ziege
- Anti Spezies: Kaninchen
- Konjugation: HRPO

- Die Suche führt zu einer Produktliste, in der Sie die gewünschte Adsorption wählen können und weitere Möglichkeiten haben!

**Suchergebnisse (3 Treffer!)**

Katalog-Nummer	Adsorption gegen Serumproteine	ME	Preis/Euro	Notiz
111-035-003	keine	2,0 ml	129,00	<input type="checkbox"/>
111-035-045	Hu	1,5 ml	152,00	<input type="checkbox"/>
111-035-144	Hu, Ms, Rt	1,5 ml	180,00	<input type="checkbox"/>

- Durch Anklicken der Katalognummer kommen Sie zu einer Seite mit weiteren Produktinformationen.

Fügen Sie das Produkt zu Ihrem Notizzettel hinzu. Sie können weitere Produkte suchen und später eine Liste ausdrucken oder speichern.

**dianova Produktdetails**

Katalog-Nr.	111-035-045
Mengeneinheit	1,5 ml
Preis (Euro)	152,00
IgG-Form	IgG, Gesamtmolekül
Aus Spezies	Ziege
Anti Spezies	Kaninchen
Spezifität	IgG (H+L)
Mono-/Polyklonal	polyklonal
Konjugation	HRPO (Meerrettichperoxidase)
Adsorption gegen Serumproteine	Human
Verdünnung	ELISA 1 : 5.000 - 1 : 100.000, Western Blot (non-ECL) 1 : 5.000 - 1 : 100.000, Western Blot (ECL) 1 : 10.000 - 1 : 200.000, Histo-/Zytochemie 1 : 500 - 1 : 5.000
Format	Lyophilisat, in PBS (pH 7,0), 15 mg/ml BSA (IgG- und Protease-frei)
Zweckbestimmung	nur für Forschungszwecke
Regellieferzeit	1-2 Werktage
Produkteinführung bei dianova	vor 2006

Fenster schließen