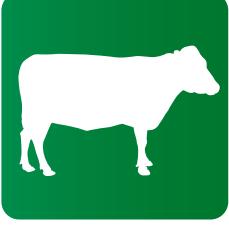
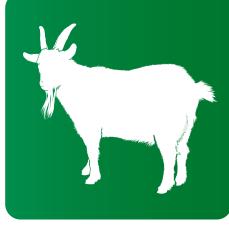
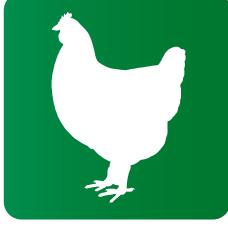
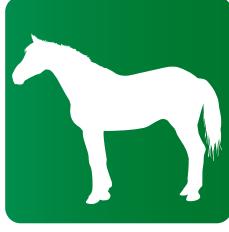
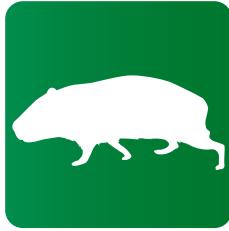
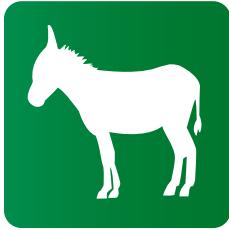
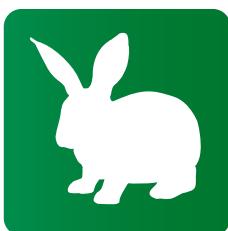


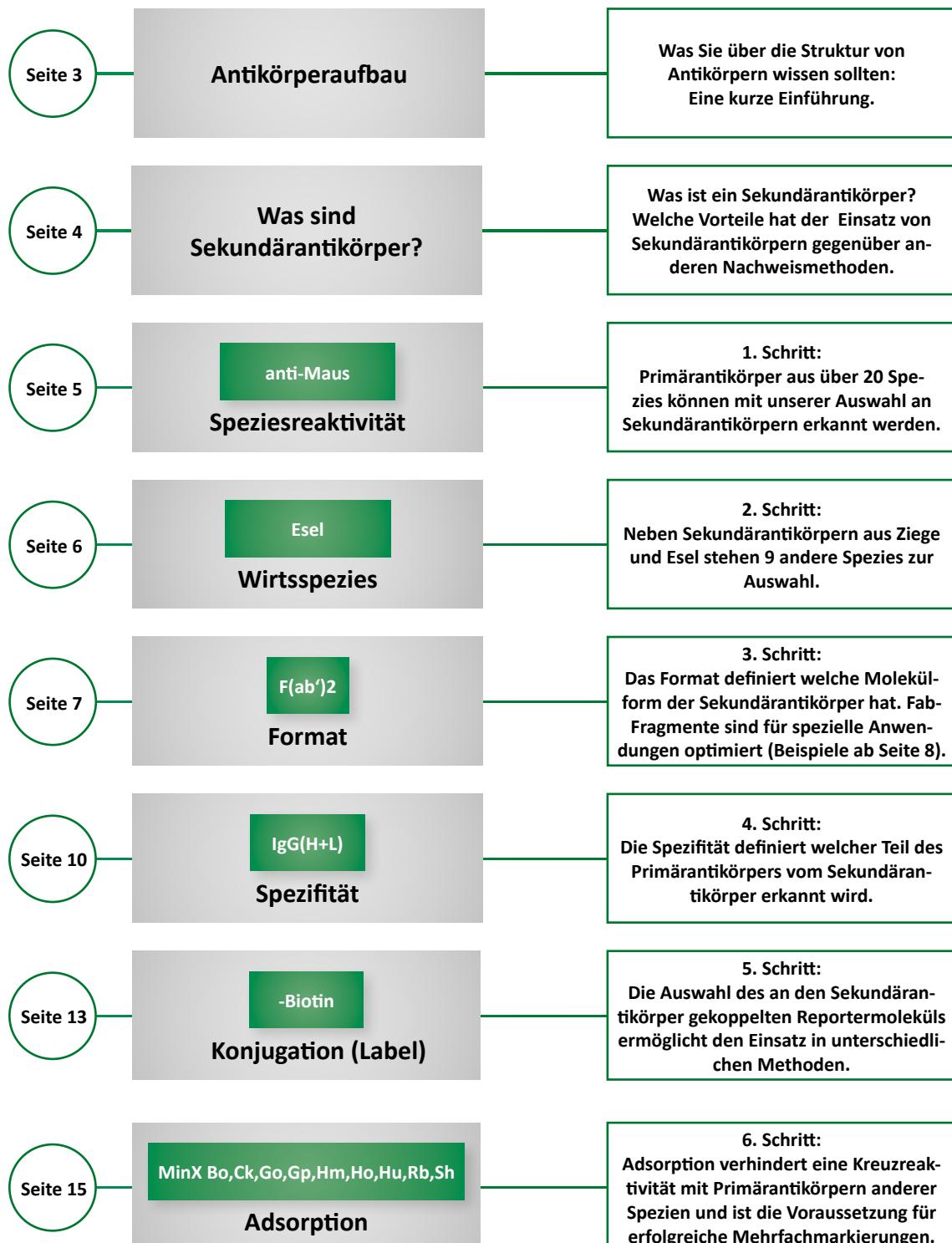
**dianova**™  
a BIOZOL Brand

Auswahlhilfe

# Sekundärantikörper



## Inhalt



## Antikörperaufbau

### IgG als Referenzstruktur für Immunglobuline

Ein Immunglobulin G (IgG) besteht aus je zwei identischen leichten („L“ight) bzw. schweren („H“eavy) Polypeptidketten, die durch kovalente Disulfidbrücken verbunden sind. Der untere Bereich wird 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). Die leichten Ketten bestehen aus jeweils einer variablen (VL) und einer konstanten Domäne (CL). Die schweren Ketten hingegen haben jeweils eine variable und drei konstante Domänen. Bezeichnet werden diese analog als VH und CH1, CH2, CH3.

### Weitere Immunglobulin-Isotypen bzw. Klassen

In Säugern lassen sich fünf Immunglobulinklassen, die auch als Isotypen bezeichnet werden, unterscheiden (IgG, IgA, IgM, IgE und IgD).

Die Unterschiede zwischen den Isotypen liegen innerhalb der H-Ketten. So haben IgM und IgE neben Unterschieden in der Peptidsequenz eine zusätzliche konstante Domäne (CH4), im Vergleich zu den drei konstanten Domänen bei IgG und IgA. Letzteres wird zudem auch als Homodimer exprimiert, welches über eine J-Kette (Joining Peptide / Joining Chain) verbunden ist. IgM hingegen wird als Pentamer gebildet und enthält ebenfalls eine J-Kette.

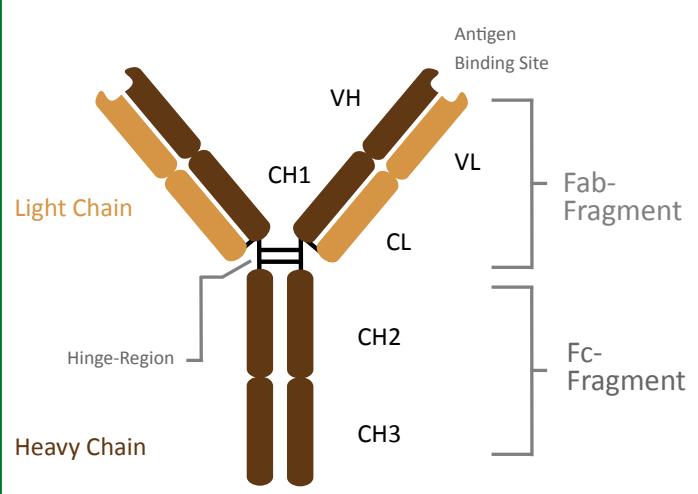
Darüber hinaus werden IgG und IgA noch in vier bzw. zwei Subklassen eingeteilt, die untereinander geringere Unterschiede in der H-Kette aufweisen, als dies zwischen den Hauptklassen der Fall ist.

### Varianten der leichten Kette ( $\kappa$ und $\lambda$ )

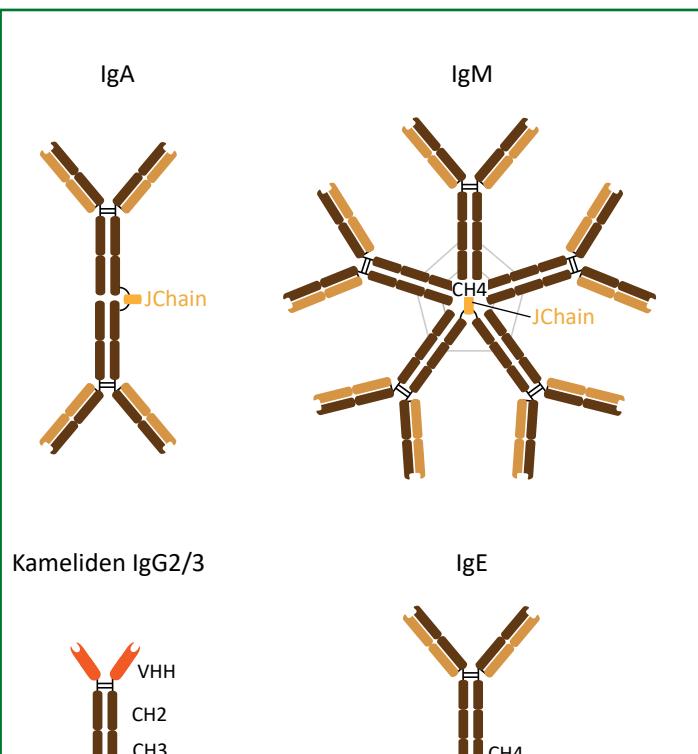
Unterschiede sowohl zwischen den Haupt- als auch den Subklassen treten ausschließlich im Bereich der H-Ketten auf. Im Bereich der L-Ketten gibt es zwei Varianten ( $\kappa$  und  $\lambda$ ). Dabei überwiegt die  $\kappa$ -L-Kette im Normalserum stark.

### Struktur der Antikörper aus Kameliden

Kameliden besitzen unter den Säugetieren einzigartige IgG-Subklassen. Im Serum dieser Tiere befindet sich neben dem konventionellen IgG1 (klassischer Aufbau), IgG2 und IgG3. Diese besitzen weder leichte Ketten noch CH1 Domänen in den schweren Ketten (Abb.2). Die Schwere-Ketten-Antikörper haben eine geringe Größe, sind äußerst stabil und zeigen eine hohe Spezifität und Affinität zum jeweiligen Antigen.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung eines Immunglobulin G (IgG)



**Abb. 2:** Schematische Darstellung von Immunglobulinen der Klasse A, IgM, IgE und Kameliden IgG2 bzw. 3

## Was sind Sekundärantikörper?

### Was ist ein Sekundärantikörper?

Die Bezeichnung Sekundärantikörper basiert auf Ihrer funktionellen Eigenschaft, andere Antikörper als Antigen zu erkennen. Die Antikörper, die von einem Sekundärantikörper erkannt werden, werden in Analogie dazu Primärantikörper genannt.

Immunmarkierungen mit nur einem Antikörper werden auch als direkte Immunmarkierungen bezeichnet. Der Primärantikörper ist dabei in der Regel direkt an ein Reporter-Molekül gebunden. Dies kann ein (Fluoreszenz-)Farbstoff oder ein Enzym sein, welches ein Substrat in einen Farbstoff umsetzt. Antikörper, die kovalent mit einem Reporter bzw. Marker verbunden sind, werden als Konjugate bezeichnet.

Im Gegensatz dazu werden Methoden, bei denen ein Sekundärantikörper zur Erkennung eines anderen Antikörpers herangezogen werden, als indirekte Markierungen bezeichnet.

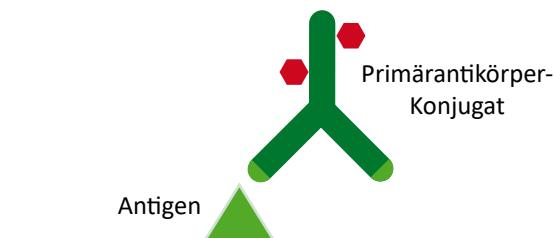
Sekundärantikörper werden hergestellt, indem Tiere mit Immunglobulinen oder Teilen von Immunglobulinen als Antigen immunisiert werden. Die Art der Immunisierung und die anschließende Aufreinigung der resultierenden Antikörper ist dabei entscheidend für die Spezifität der Sekundärantikörper.

### Welche Vorteile hat der Einsatz von Sekundärantikörpern gegenüber anderen Nachweismethoden?

Gegenüber dem direkten Nachweis hat die Verwendung von Sekundärantikörpern Vorteile. Da in der Regel mehrere Sekundärantikörper an einem Primärantikörper binden können, kommt es zu einer Signalverstärkung im Vergleich zu direkten Methoden. Zudem bietet der Einsatz von Sekundärantikörpern ein hohes Maß an Flexibilität, da nicht jeder Primärantikörper direkt markiert sein muss.

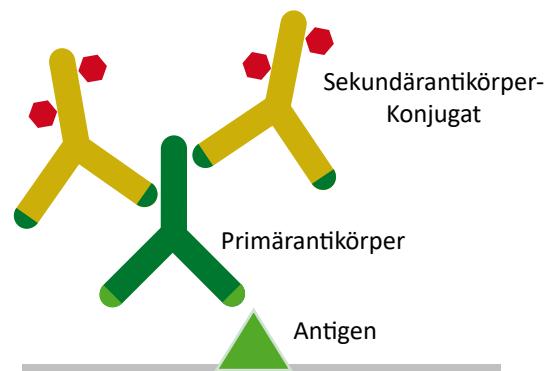
Insbesondere bei indirekten Mehrfachmarkierungen, müssen aber die Reagenzien sorgfältig ausgewählt und aufeinander abgestimmt werden, um fundierte Ergebnisse zu gewährleisten.

### Direkter Immunnachweis



- + Geringerer Zeitaufwand, da 1-Schritt-Protokoll
- + Bei Mehrfachmarkierungen keine Probleme durch Kreuzreaktivität von Sekundärantikörpern
- Schwächeres Signal / geringere Sensitivität, da keine Signalverstärkung
- Geringere Flexibilität, da direkt konjugierte Antikörper benötigt werden

### Indirekter Immunnachweis



- + Hohe Flexibilität: 1 Sekundärantikörper für viele Primärantikörper einsetzbar
- + Höhere Sensitivität / Signalverstärkung
- ! Bei Mehrfachmarkierungen ist genaue Planung notwendig
- Höherer Zeitaufwand, da 2-Schritt-Protokoll

anti-Maus

**Speziesreakтивität****1. Schritt:**

Gegen welche Spezies soll der Sekundärantikörper gerichtet sein?

Dies ist in der Regel die Spezies, aus der der Primärantikörper stammt. Nur in wenigen Ausnahmefällen ist es sinnvoll, kreuzreagierende Antikörper gegen eine verwandte Spezies einzusetzen.

**Antikörper gegen Hamster IgG**

- !** Nahezu alle monoklonalen Antikörper aus Hamstern stammen von Maus-armenischen Hamster-Hybridomen. Die von diesen Hybridomen produzierten IgG sind also „armenische“ und nicht „syrische“ IgG. Die meisten kommerziell erhältlichen polyklonalen anti-Hamster IgG-Antikörper sind gegen syrische Hamster-IgG gerichtet und detektieren monoklonale Antikörper aus armenischem Hamster daher nicht so wirkungsvoll wie anti-armenische Hamster IgG.

**Nachweis von Antikörpern aus Schaf, Ziege und Rind**

- !** Zwischen IgGs aus Schaf, Ziege und Rindern besteht weitgehend Homologie, so dass gegen Ziege generierte Sekundärantikörper auch für die Detektion von Primärantikörpern aus dem Schaf/Rind verwendet werden können. Anti-Schaf-Antikörper eignen sich auch für den Nachweis von Primärantikörpern aus Ziege/Rind.

**Auswahl der Speziesreaktivitäten**

Die Nomenklatur unserer Antikörper hilft Ihnen, sich bei der Auswahl zu orientieren!

Esel

F(ab')2

anti-Maus

Wirtsspezies

Format

Speziesreakтивität

IgG(H+L)

Spezifität

-Biotin

Konjugation

MinX Bo,Ck,Go,Gp,Hm,Ho,Hu,Rb,Sh

Adsorption

Esel

**2 . Schritt:****Aus welcher Wirtsspezies soll der Sekundärantikörper stammen?****Wirtsspezies**

Erfahrungsgemäß sind Antikörper aus der Ziege oder dem Esel für den Nachweis von Primärantikörpern der meisten Spezies geeignet.

Bei indirekten Mehrfachmarkierungen mit unkonjugierten Primärantikörpern sollten alle Sekundärantikörper-Konjugate aus derselben Wirtsspezies stammen, damit Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper untereinander vermieden werden. Stark präadsorbierte Antikörper (siehe auch Schritt Adsorption) aus dem Esel sind zwar spezifischer als die weniger adsorbierten Sekundärantikörper aus anderen Wirtsspezies, können aus diesem Grund aber auch weniger sensitiv sein.

**Antikörper aus Rind zum Nachweis von Ziege-Ig**

Reagenzien, die im Labor verwendet werden, können in vielen Fällen Immunglobuline aus dem Rind enthalten. Dies gilt zum Beispiel für FCS in Zellkulturmedien, Milchpulver in Western Blot-Anwendungen oder BSA als Stabilisator für Proteine und Antikörper. Beim Nachweis von Primärantikörpern aus der Ziege kann das aufgrund der engen Verwandschaft von Ziege und Rind Probleme verursachen. Zum Nachweis von Ziege-Primärantikörpern ohne Kreuzreaktion mit Rind empfehlen wir Rind-anti-Ziege Antikörper von Jackson ImmunoResearch (805-xxx-180).

**Antikörper aus dem Alpaka**

Antikörper aus dem Alpaka eignen sich ebenfalls als Sekundärantikörper, wenn Reagenzien bovine IgGs enthalten. Zudem befinden sich im Serum von Kameliden neben dem konventionellen IgG1 (klassischer Aufbau), IgG2 und IgG3. Diese besitzen weder leichte Ketten noch CH1 Domänen in den schweren Ketten (s. Abschnitt Sekundärantikörperstruktur). Die Schwere-Ketten-Antikörper haben eine geringe Größe, sind äußerst stabil und zeigen eine hohe Spezifität und Affinität zum jeweiligen Antigen. Diese Eigenschaften machen sie für den Einsatz als Sekundärantikörper besonders geeignet.

**Immunpräzipitation mit Kaninchen-Antikörpern**

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.

**Auswahl an Wirtsspezies für Sekundärantikörper**

- !** Bei Mehrfachmarkierungen sollten alle Sekundärantikörper aus der gleichen Spezies stammen!
- !** Bei Mehrfachmarkierungen sollte der Sekundärantikörper gegen weitere Spezies, die zusätzlich nachgewiesen werden, adsorbiert sein (s. Schritt Adsorption)!
- !** Um Hintergrund zu reduzieren, eignet sich zum Blockieren Normalserum aus der gleichen Spezies, aus der die Sekundärantikörper stammen, am besten!



Die Nomenklatur unserer Antikörper hilft Ihnen, sich bei der Auswahl zu orientieren!

Esel

F(ab')2

anti-Maus

IgG(H+L)

-Biotin

MinX Bo,Ck,Go,Gp,Hm,Ho,Hu,Rb,Sh

**Wirtsspezies****Format****Speziesreakтивität****Spezifität****Konjugation****Adsorption**

F(ab')2  
Format

### 3. Schritt: Struktur des Sekundärantikörpers: Gesamt molekül (H+L), F(ab')2- oder Fab-Fragment?

**Das IgG-Gesamt molekül** ist die am häufigsten verwendete Antikörperform und für die meisten Anwendungen am besten geeignet.

Durch enzymatischen Verdau von IgG-Gesamt molekülen (s. Abbildung) lassen sich Antikörper-Fragmente gewinnen, die über besondere Eigenschaften verfügen und sich deshalb in einigen Anwendungsbereichen besser als Nachweisreagenzien eignen als Gesamt moleküle.

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

Monovalente **Fab-Fragmente** werden zur Blockierung und Doppelmarkierung von Primärantikörpern aus derselben Spezies oder als Blockierungsreagenzien gegen endogene Immunglobuline in Zell- und Gewebefärbungen eingesetzt, bei denen Gewebe und Primärantikörper aus derselben Spezies stammen. Da Fab-Fragmente nur eine antigenbindende Stelle haben (**monovalent**), können diese, nachdem sie ihr Zielmolekül gebunden haben, keine weiteren Antikörper binden.

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

#### Auswahl des Antikörperformats



Gesamt molekül (H+L)

Optimal für die meisten Anwendungen (Bivalent)



F(ab')2 Fragment

Verringelter Hintergrund:  
Keine Interaktion mit Fc-Rezeptoren

Bessere Diffusion: Kleiner als IgG(H+L)

Gute Antigenbindung: Zwei Antigen-Bindungsstellen (bivalent)

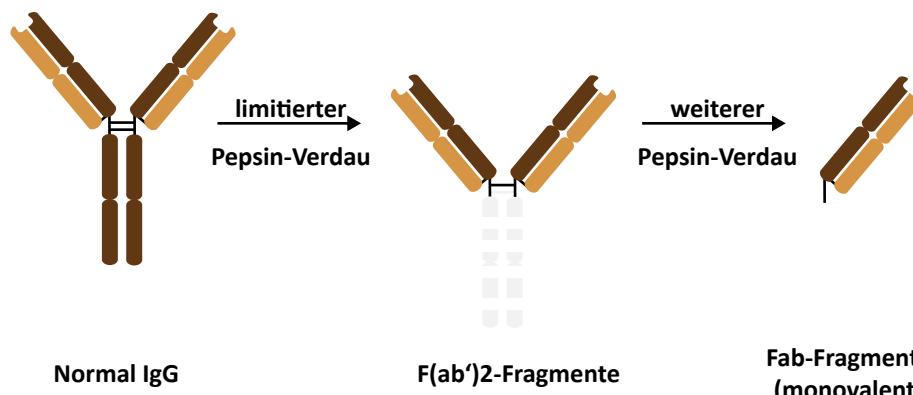


Fab Fragment

Für spezielle Methoden: Hat nur eine Antikörper-Bindungsstelle (monovalent)

Wegen geringer Bindungstärke nicht zu empfehlen für Standardfärbungen.

Der Einsatz von F(ab')2-Fragmenten verhindert nicht das Binden des Primärantikörpers an Fc-Rezeptoren! Das Blocken mit Normalserum, das aus derselben Wirtsspezies wie der Sekundärantikörper stammt, ist in diesem Fall nicht immer erfolgreich. Bei durch Fc-Rezeptoren verursachtem Hintergrund können Sie mit IgG- oder IgG-Fragmenten der Spezies, aus der das untersuchte Material stammt, blockieren und mit einem gegen diese Spezies präadsorbierten Sekundärantikörper arbeiten.



**Abbildung:** Proteolytische Vorbehandlung von Antikörpern mit Papain führt zur Spaltung in zwei mono valente Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Die proteolytische Behandlung mit Pepsin ergibt ein verkürztes Fc-Fragment und ein bivalentes F(ab')2-Fragment.

Die Nomenklatur unserer Antikörper hilft Ihnen, sich bei der Auswahl zu orientieren!

Esel

F(ab')2

anti-Maus

IgG(H+L)

-Biotin

MinX Bo,Ck,Go,Gp,Hm,Ho,Hu,Rb,Sh

Wirtsspezies

Format

Speziesreakтивität

Spezifität

Konjugation

Adsorption

## Anwendungen für Fab-Fragmente

### Unterscheidung von zwei Primärantikörpern aus derselben Spezies

Antikörper aus Kaninchen:



Kaninchen anti-Antigen X

Kaninchen anti-Antigen Y

Kaninchen IgG von nicht immunisierten Tieren

Antikörper aus Ziege:



Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)

Ziege Fab-Fragment anti-Kaninchen IgG (H+L)

Antikörper aus Maus:



Maus anti-Ziege IgG (H+L)

Maus anti-Kaninchen (H+L)

(adsorbiert gegen Ms, Hu und Rb Serumproteine)

(adsorbiert gegen Ms, Hu, Go und Sh Serumproteine)

Farbstoffe (Label):

Fluoreszenzlabel 1 (grün)

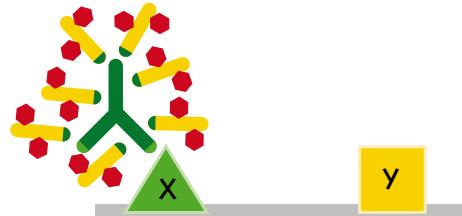
Fluoreszenzlabel 2 (rot)

1



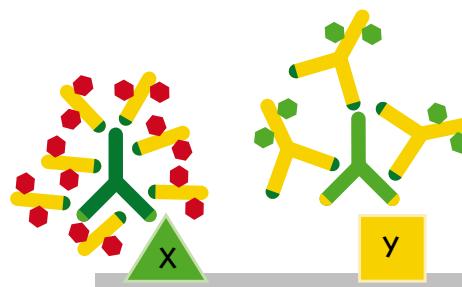
Inkubation mit dem ersten Primärantikörper (anti X).

2



Inkubation mit einem Überschuss an Fab-Fragment-Antikörper, der mit Label 2 konjugiert und gegen den Primärantikörper gerichtet ist.

3



Detektion des zweiten Primärantikörpers (anti Y) mit konventioneller indirekter Immunfluoreszenz.

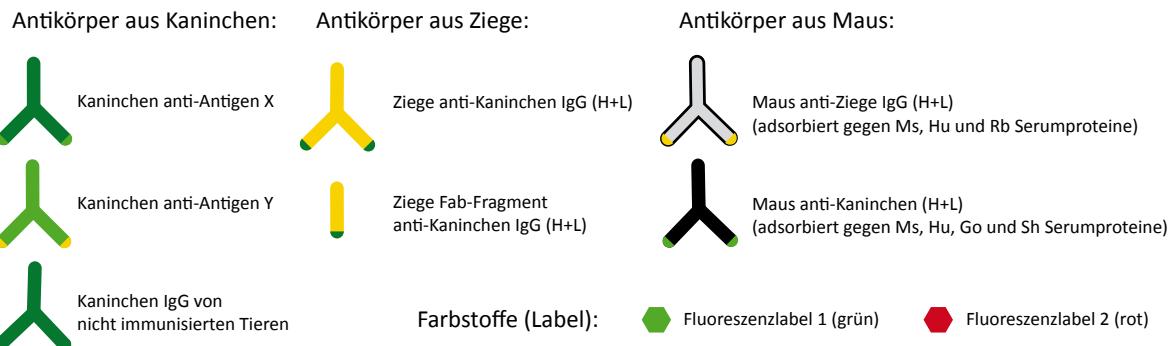
Alternativ kann die Methode auch adaptiert werden, indem in Schritt 1 ein direkt konjugierter Primärantikörper anstelle des unkonjuguierten Primärantikörpers verwendet wird und dieser dann in Schritt 2 mit einem unkonjuguierten Fab-Fragment blockiert wird.

Es können höhere Konzentrationen an Fab-Fragment-Antikörpern erforderlich sein, um ein vollständiges Blockieren des ersten Primärantikörpers zu erreichen. Sollte dies zu einem stärkeren Hintergrund führen, kann eine geringere Konzentration an konjugiertem Fab-Fragment Antikörper eingesetzt werden und danach zusätzlich mit unkonjugiertem Fab-Fragment blockiert werden.

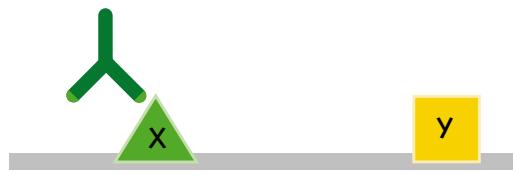
Achtung: Aggregate von konjugierten Fab-Fragmenten können sich als polyvalente Moleküle verhalten und so den zweiten Primärantikörper binden. Eine unerwünschte falsch positive Darstellung des zweiten Antigens kann die Folge sein.

## Anwendungen für Fab-Fragmente

### Überführen eines Primärantikörpers in eine „andere Spezies“ mithilfe eines Fab-Fragments

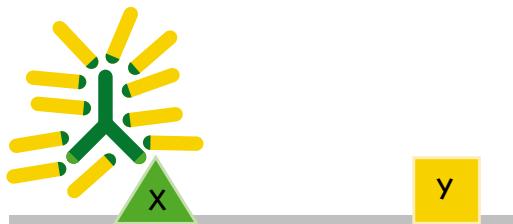


1



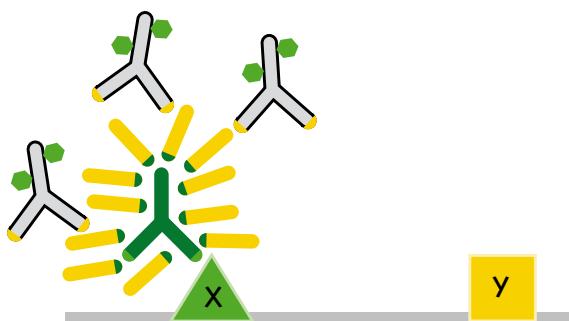
Inkubation mit dem ersten Primärantikörper (anti X).

2



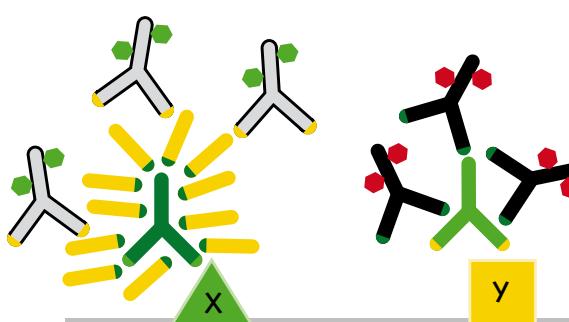
Inkubation mit einem Überschuss an unkonjugiertem Fab-Fragment-Antikörper, der gegen den ersten Primärantikörper gerichtet ist

3



Inkubation mit einem Tertiärantikörper, der mit Label 1 konjugiert ist anti-IgG(H+L) oder F(ab')2-Fragment und gegen das Fab-Fragment gerichtet ist. Wichtig ist hierbei, dass der Tertiärantikörper weder die Spezies der beiden Primärantikörper noch die des zweiten Sekundärantikörpers erkennt.

4 & 5



Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (anti-Y) und Inkubation mit dem zweiten Sekundärantikörper, der mit Label 2 konjugiert ist. Dieser erkennt weder die Spezies der Fab-Fragmente noch die des Tertiärantikörpers.

Das Testen verschiedener Konzentrationen bei jedem Schritt oder der Wechsel der Reihenfolge der einzelnen Schritte kann das Ergebnis beeinflussen. Auch das Blockieren mit dem entsprechenden Normalserum zwischen den Schritten kann helfen, die Hintergrundfärbung zu minimieren. Der Erfolg dieser Strategien erfordert eventuell einige empirische Versuche.



IgG(H+L)

**Spezifität****4. Schritt:****Was soll der Sekundärantikörper erkennen?**

Für immunologische Assays werden größtenteils polyklonale Antikörper vom Typ IgG (z. B. aus Kaninchen, Ziege, Huhn etc.) oder monoklonale Antikörper aus Maus, Ratte oder auch Hamster, die aus B-cell Hybridomen gewonnen werden, eingesetzt. Sekundärantikörper sollen dabei eine möglichst hohe Sensitivität für diesen Primärantikörper haben.

In der Regel ist dies ein Sekundärantikörper, für dessen Gewinnung als **Immunogen** ein Gesamtprotein IgG(H+L) eingesetzt wurde. Dieser erkennt eine Vielzahl von Epitopen auf Antikörpern verschiedener Klassen und Subklassen. (s. Abbildung links)

**Soll in einem geplanten Assay nur ein Primärantikörper erkannt werden und sind Immunglobuline anderer Klassen oder Subklassen kein Störfaktor, wie dies in den meisten Anwendungen der Fall ist, ist die Spezifität IgG(H+L) normalerweise am besten geeignet.**

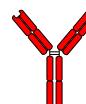
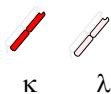
Häufig sollen in einem Experiment mehrere Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies gleichzeitig nachgewiesen werden (Mehrfachmarkierungen). In diesem Fall muss eine kreuzweise Erkennung verhindert werden. **Dies geschieht über die Adsorption von Antikörpern (MinX s. Schritt 6).** Die optimale Spezifität für jeden der Sekundärantikörper ist dann immer noch IgG(H+L).

**Zur oben genannten Regel gibt es Sonderfälle und Ausnahmen die auf den nächsten Seiten erörtert werden:**

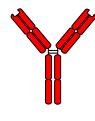
- ▶ Nachweis von klassenspezifischen Antikörpern bei gleichzeitiger störender Anwesenheit von Antikörpern anderer Klassen oder gleichzeitiger Nachweis von Antikörperklassen.
- ▶ Nachweis von monoklonalen Antikörpern bestimmter Subklassen.
- ▶ Gleichzeitiger Nachweis von monoklonalen Antikörpern unterschiedlicher Subklassen aus der gleichen Spezies.
- ▶ Gleichmäßige Erkennung von Antikörpern verschiedener Subklassen.
- ▶ Nachweis von leichten Ketten ohne störende Erkennung der schweren Kette.

**Beispiel: Spezifität des Antikörpers Maus IgG(H+L)**

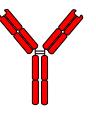
Immunogen: IgG(H+L)

**Erkennung**

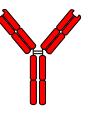
Light Chain



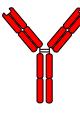
IgG1



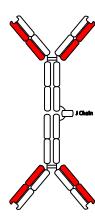
IgG2A



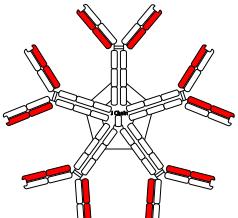
IgG2B



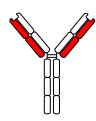
IgG3



IgA



IgM



IgE

Die Tierspezies (z.B. Ziege), in der das Antiserum gewonnen werden soll („Wirt“), wird mit aufgereinigtem Immunglobulin oder Immunglobulinteilen der entsprechenden Zielspezies immunisiert. In der Regel werden die Immunglobuline, die zur Immunisierung verwendet werden, aus Gesamtserum gewonnen, dh. die Zusammensetzung der einzelnen Subklassen und Teile entspricht der Normalverteilung im Serum der Spezies.

Antiserum von mit IgG(H+L) immunisierten Tieren enthält Antikörper, die sowohl gegen die leichten als auch gegen die schweren Ketten 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.

Die Nomenklatur unserer Antikörper hilft Ihnen, sich bei der Auswahl zu orientieren!

Esel

F(ab')<sub>2</sub>

anti-Maus

IgG(H+L)

Wirtsspezies

Format

Speziesreakтивität

Spezifität

-Biotin

MinX Bo,Ck,Go,Gp,Hm,Hu,Rb,Sh

Konjugation

Adsorption

IgG(H+L)

**Spezifität - Sonderfälle****4. Schritt:****Welche Sonderfälle gibt es bei der Auswahl der Spezifität**

**Nachweis von klassenspezifischen Antikörpern bei gleichzeitiger störender Anwesenheit von Antikörpern anderer Klassen oder gleichzeitiger Nachweis von Antikörperklassen**

**anti-IgG-Fc-Fragment**

Die Immunisierung (z.B. der Ziege) mit aufgereinigtem IgG Fc-Fragment (z.B. aus Maus/Mensch) führt zu Antikörpern, die hochspezifisch die schwere Kette des IgG-Moleküls detektieren. Da die Unterschiede der verschiedenen Immunglobinklassen 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')2-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.

**anti-IgM ( $\mu$ -Kette), anti-IgM Fc $5\mu$** 

Zur Herstellung von IgM-spezifischen Antikörpern wird die Wirtsspezies (z.B. Ziege) mit aufgereinigtem IgM (Maus und Ratte) oder Trypsin-verdautem, gereinigten IgM Fc $5\mu$  (Human) immunisiert. Nach affinitätschromatographischer Reinigung werden die anti-Maus und anti-Ratte IgM ( $\mu$ -Kette)-spezifischen Antikörper gegen IgG adsorbiert. Die anti-Human IgM Fc $5\mu$  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.

**anti-IgA ( $\alpha$ -Kette) / anti-IgE ( $\epsilon$ -Kette)**

Antikörper reagieren mit der schweren Kette von IgA oder IgE und sind gegen andere Subklassen adsorbiert, so dass keine nennenswerten Kreuzreaktionen mit anderen Klassen wie IgG oder IgM auftreten.



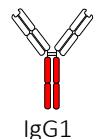
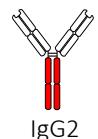
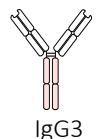
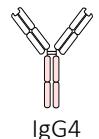
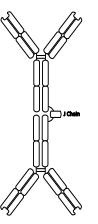
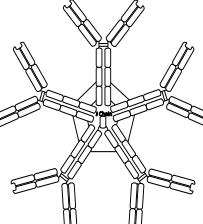
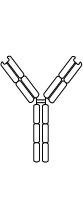
**Nachweis von monoklonalen Antikörpern bestimmter Subklassen.**



**Gleichzeitiger Nachweis von monoklonalen Antikörpern unterschiedlicher Subklassen der gleichen Spezies**

**Subklassenspezifische anti-Maus Antikörper gegen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c und IgG3**

Diese Antikörper sollten aufgrund ihrer hohen Spezifität nur eingesetzt werden, wenn eine Unterscheidung von Maus-Subklassen erforderlich ist.

**Beispiel: Spezifität des Antikörpers Human IgG (Fc)****Immunogen: IgG(Fc)****Erkennung****κ****Light Chain****IgG1****IgG2****IgG3****IgG4****IgA****IgM****IgE**

Anti-IgG (Fc) Antikörper reagieren nicht mit allen IgG-Subklassen gleich gut wie anti-IgG F(ab')2-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')2-Antiseren verwendet werden.

IgG(H+L)

**Spezifität - Sonderfälle****4. Schritt:****Welche Sonderfälle gibt es bei der Auswahl der Spezifität****Gleichmäßige Erkennung von Antikörpern verschiedener Subklassen****anti-IgG F(ab')2-Fragment**

Diese Antikörper werden durch Immunisierung mit aufgereinigtem F(ab')2-Fragment des Gesamt-IgG gewonnen. Da der Anteil an schwerer Kette des F(ab')2-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')2-Fragment-Antikörper werden zusätzlich gegen IgG Fc-Fragment präadsorbiert und reagieren deshalb nur mit dem Fab-Teil des IgG.

Mit diesen Immunreagenzien lassen sich alle Ig-Klassen und Subklassen (IgM, IgG1-4, IgA, etc.) relativ 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.

**anti-IgG + IgM (H+L) / anti-IgG + IgM + IgA (H+L)**

Um eine gleichmäßige Reaktivität zu erreichen, werden diese Produkte durch Mischen verschiedener Antikörper gegen die einzelnen Klassen hergestellt. In einer Mischung von anti-IgG + IgM (H+L) variiert die Reaktivität mit leichten Ketten von 30% bis 45%. Die anti-IgM-Gesamtreakтивität (einschließlich gegen leichte Ketten) in der Mischung liegt ca. zwischen 55% - 70%.

**Nachweis von leichten Ketten ohne störende Erkennung der schweren Kette****Anti-leichte Kette-spezifische Antikörper**

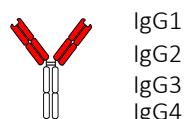
Anti-IgG leichte Kette-spezifische Antikörper reagieren mit nativen Primärantikörpern, die zur Detektion von Proteinen in Western Blots eingesetzt werden.

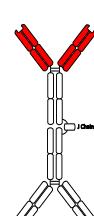
Bei geeigneter Verdünnung reagieren sie im Blot nicht mit der reduzierten und denaturierten schweren Kette (50 kDa) des IgG-Moleküls, zum Beispiel bei Proben die aus Immunpräzipitationsversuchen (IP) stammen, bei denen große Mengen der denaturierten schweren Kette das Zielprotein überdecken können.

**!** Anti-Light Chain Antikörper haben eine starke Reaktivität mit nativen leichten IgG-Ketten, die Sensitivität bei reduzierten/denaturierten Formen kann aber verringert sein. Für eine sensitive / quantitative Detektion von leichten IgG-Ketten im Western Blot sind sie nicht geeignet.

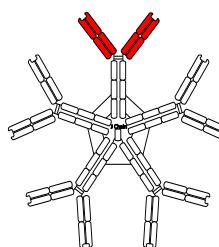
**Beispiel: Spezifität des Antikörpers IgG F(ab')2-Fragment**

Immunogen: F(ab')2-Fragment

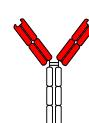
**Erkennung**IgG1  
IgG2  
IgG3  
IgG4

 Light Chain  
 $\kappa$        $\lambda$ 


IgA



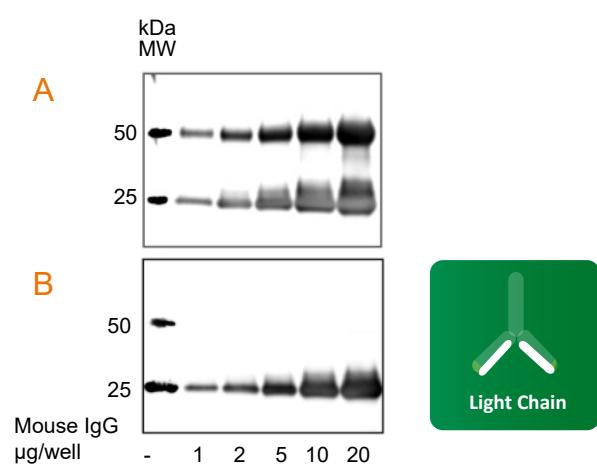
IgM



IgE

**!** 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')2-Fragment-Antikörpern bei der Erkennung von Primärantikörpern, die leichte Ketten vom  $\lambda$ -Typ tragen, eingeschränkt.

**!** 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.



Nachweis von Maus IgG mit Anti-Maus IgG(H+L) (115-035-003) (**A**) und Anti-Maus Light-Chain-spezifischem Antikörper (115-035-174) (**B**). Der Leichte-Kette-Antikörper ermöglicht den Nachweis von Zielproteinen bei 50 kDa, die sonst überdeckt sind (Abb. Jackson ImmunoResearch).

Biotin

**Konjugation****5. Schritt:****Welche Konjugation soll der Sekundärantikörper haben?**

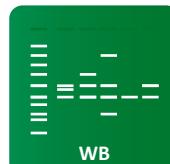
Die Wahl der Konjugate hängt von der eingesetzten Methode und der gewünschten Art der Detektion ab (enzymatisch, verstärkt, direkt, etc.). Insbesondere bei den Fluoreszenzfarbstoffen ist darauf zu achten, dass die notwendigen Anregungsquellen und Filter zur Verfügung stehen. Für fluoreszenzbasierte Methoden in der Immunhisto- und Zytchemie empfehlen wir Ihnen generell photostabile Farbstoffe wie Carbocyanine (z.B. Cy2, Cy3, Cy5) oder AlexaFluor® traditionellen Farbstoffen (z. B. FITC, TRITC) vorzuziehen. Einige der Farbstoffe sind auch für die Superresolution Mikroskopie geeignet. Für STED eignen sich die Farbstoffe Alexa Fluor 488, FITC und Alexa Fluor 594, für STORM eignen sich die Farbstoffe Alexa Fluor 488, FITC, Cy3, Alexa Fluor 647, Cy5 und Alexa Fluor 790.

**Reporter / Label für verschiedene Anwendungen und empfohlene Verdünnungen**

Konjugat



ELISA



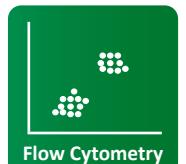
WB



IF/ICC



IHC



Flow Cytometry

**Unkonjugiert**

10-20 µg/ml

Cy2, FITC

1:50 – 1:200

1:50 – 1:200

1:50 – 1:200

Cy5

1:100 – 1:400

1:100 – 1:400

1:100 – 1:400

DyLight-/Alexa®-Konjugate, Cy3

1:100 – 1:800

1:100 – 1:800

1:100 – 1:800

Alexa®-680- / 790-Konjugate

1:50.000 – 1:200.000

Phycoerythrin

1:50 – 1:200

1:50 – 1:200

1:50 – 1:200

Peroxidase (HRPO) 1:5.000 – 1:100.000

1:5.000 – 1:100.000  
(non-ECL)

1:500 – 1:5.000

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 für Nachweis mit

- Streptavidin-Fluoreszenzkonjugat

1:200 – 1:1.000

1:200 – 1:1.000

1:200 – 1:1.000

- Enzym-konjugiertes Streptavidin

1:20.000 – 1:400.000

1:20.000 – 1:400.000

1:500 – 1:5.000

1:500 – 1:5.000

4 nm Gold

1:20 – 1:200

6 &amp; 12 nm Gold

1:20 – 1:40

18 nm Gold

1:10 – 1:20

Die Nomenklatur unserer Antikörper hilft Ihnen, sich bei der Auswahl zu orientieren!

Esel

F(ab')2

anti-Maus

IgG(H+L)

-Biotin

MinX Bo,Ck,Go,Gp,Hm,Ho,Hu,Rb,Sh

Wirtsspezies

Format

Speziesreakтивität

Spezifität

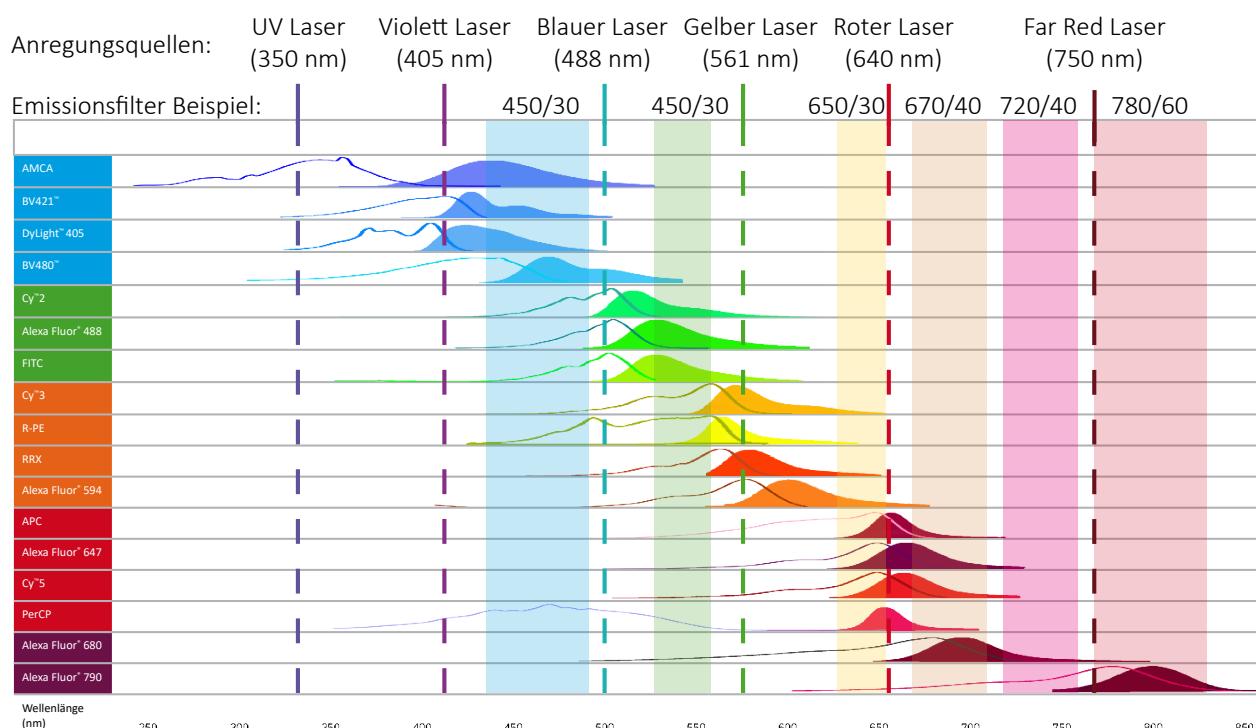
Konjugation

Adsorption

**FITC**  
**Konjugation**
**5. Schritt:**
**Fluorophore Anregungs- und Emissionsmaxima von Fluoreszenzfarbstoffen**  
**Enzymkonjugate und Substrate**

Die Auswahl der Fluorochrome für Immunfluoreszenzfärbungen ist abhängig von:

1. der Einstellung und der Ausstattung des Instrumentes, z.B. Verfügbarkeit von Lichtquellen, Filtersets und Detektionssystemen.
2. dem gewünschten Grad der Farbtrennung bei Mehrfachfluoreszenz-Markierungen: Rhodamin Red-X, Alexa Fluor 594 oder Alexa Fluor 647 geben beispielsweise eine bessere Trennung von Alexa Fluor 488 oder FITC als Cy3.
3. dem Expressionsgrad des Antigens: für gering exprimierte Antigene ein leuchtintensiveres Fluorochrom als für stark exprimierte Antigene auswählen.
4. der erforderlichen Sensitivität. So sind Alexa Fluor 488, Cy3, Alexa Fluor 594 und Alexa Fluor 647 leuchtintensiver als FITC, Cy2, TRITC, Rhodamin-Red X, Texas Red und Cy5.



Übersicht über gängige Fluoreszenzfarbstoffe, Anregungsquellen und Emissionsfilter (Abb. Jackson ImmunoResearch).

**Enzyme und häufig eingesetzte Substrate:**

Enzym	Substrat	Produktfarbe
Alkalische Phosphatase	BCIP/NBT	dunkelblau-violett
	Fast Red	rot (intensivrot)
	Neufuchsin	rosarot (fuchsinrot)

Enzym	Substrat	Produktfarbe
HRPO	DAB	braun
	AEC	rotbraun
	TMB	dunkelblau

Die Nomenklatur unserer Antikörper hilft Ihnen, sich bei der Auswahl zu orientieren!

Esel	F(ab')2	anti-Maus	IgG(H+L)	-Biotin	MinX Bo,Ck,Go,Gp,Hm,Ho,Hu,Rb,Sh
Wirtsspezies	Format	Speziesreakтивität	Spezifität	Konjugation	Adsorption



## 6. Schritt: Welcher Grad der (Prä)-Adsorption ist für meinen Sekundärantikörper erforderlich?

Prinzipiell können Ig-spezifische Antikörper gegen eine bestimmte Spezies mit Immunglobulinen und Serumproteinen anderer Spezies mehr oder weniger stark kreuzreagieren. Deshalb werden Antikörper teilweise gegen Immunglobuline und Serumproteine einer oder mehrerer Fremdspezies präadsorbiert, wodurch eine Kreuzreaktivität mit Molekülen dieser Spezies weitgehend beseitigt wird (Kreuzreaktivität < 1%). Diese haben dann eine „minimierte Kreuzreaktivität“ (*minimal cross-reaction to (MinX)*) bzw. werden als adsorbiert gegen ... bezeichnet.

Adsorbierte Antikörper werden empfohlen, wenn die mögliche Anwesenheit von Immunglobulinen einer anderen Spezies im Versuchsansatz zu Kreuzreaktionen führen kann.

Falls Antikörper mit unterschiedlichen Präadsorptionen zur Auswahl stehen, sollte berücksichtigt werden, dass Antikörper, die gegen 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).

Gegen eng verwandte Spezies präadsorbierter 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. 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 zusätzlich zu 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). Um eine Kreuzreaktivität mit Milchpulver, BSA oder FCS zu verhindern, empfehlen wir zum Nachweis von Ziege-Primärantikörpern Sekundärantikörper aus dem Rind (805-xxx-180).

**Abbildung:** Beispiel der Adsorption von Anti-Human Antikörpern aus Ziege. Das Ausgangsserum enthält kreuzreaktive Antikörper gegen Maus und Kaninchen (A). Durch eine säulenchromatographische Aufreinigung gegen Serumproteine aus Maus und Kaninchen (B) enthält die aufgereinigte Fraktion nur noch Antikörper, die gegen humane Antikörper gerichtet sind (C): Die Antikörper sind adsorbiert gegen Maus und Kaninchen (MinX Ms, Rb).

Die Nomenklatur unserer Antikörper hilft Ihnen, sich bei der Auswahl zu orientieren!

Esel	F(ab')2	anti-Maus	IgG(H+L)	-Biotin	MinX Bo,Ck,Go,Gp,Hm,Ho,Hu,Rb,Sh
Wirtsspezies	Format	Speziesreakтивität	Spezifität	Konjugation	Adsorption

Online  
**Sekundärantikörper-  
Portal von BIOZOL**

In unserer Sekundärantikörper-Suche finden Sie eine große Auswahl von Sekundärantikörpern verschiedener Hersteller. Für mehr als 10.000 Antikörper der wichtigsten Anbieter haben wir für Sie die Produktbezeichnungen vereinheitlicht und wir stellen Ihnen erweiterte Filterfunktionen zur Verfügung, die Ihnen die Auswahl und Vergleichbarkeit von Nachweisreagenzien deutlich vereinfacht.

Das Sekundärantikörper-Portal  
ist umgezogen

Die erweiterten Filter umfassen Gesamt-IgG und (Fab')2-Sekundärantikörper namhafter internationaler Hersteller wie Jackson ImmunoResearch, Southern Biotech und Rockland Immunochemicals, aber auch 1.500 qualitativ herausragende Produkte unter der BIOZOL-Marke dianova.

Sie haben trotzdem noch Fragen? Unser wissenschaftliches Beratungsteam hilft Ihnen gerne weiter. Wir beraten gerne!



Im Sekundärantikörper-Portal finden Sie unter anderem Sekundärantikörper folgender Hersteller

