The complete guide to antibody conjugation 抗體標定指南

progress happens together
abcam

EXCEL BIOMEDICAL 昶安生技
台北:(02)8751-5851 台南:(06)311-0133 客服:0800-012-310
台中:(04)2422-0117 新竹:(03)621-0429 信箱:service@exbio.com.tw

AB-3502-AB

Contents

介紹 **Introduction** 3

抗體標定 **Antibody conjugation** 3

直接 vs 間接分析 **Direct vs indirect assays** 3
- 如何挑選適合的分析方法 4
- 常見標的物 5

抗體標定化學方法 **Antibody labeling chemistries** 6
- NHS ester method 6
- Two-tag method (heterobifunctional method) 7
- Site-specific conjugation 7
  - Cysteine-based conjugation 8
  - Glycan-based conjugation 8

標定試劑組 **Conjugation kit** 9
- Four key considerations to generate high-quality conjugates 9
- Confirming successful antibody conjugation 10

Additional resources 11
- Antibody conjugation 11
- General 11

Introduction

無論是進行西方墨點法，或使用多重影像系統來形象化腫瘤微環境的表現，通常依賴不同的標的物接合抗體來了解蛋白質的結構、功能、定位和其他蛋白質相互作用。這份指南提供了抗體標定的完整介紹，包括直接與間接測定法的區別、常用的標的物、標的物接合抗體背後的不同化學反應，讓您可使用最適合的方法來進行抗體標定。

Antibody conjugation

抗體標定 (Antibody conjugation)，又稱抗體標記 (Antibody labeling)，是將一個抗體連接到特定標的物或標記的過程。大多數免疫分析方法利用抗體直接與特定標的物標定，或由標定的次級抗體檢測，提供可測量的訊號。

Direct vs indirect assays

如果標的物直接標定到主抗體上，即為直接標定法。如果主抗體未標定，而標的物附著在另一種分子上像是次級抗體，即為間接標定法 (Figure. 1)。

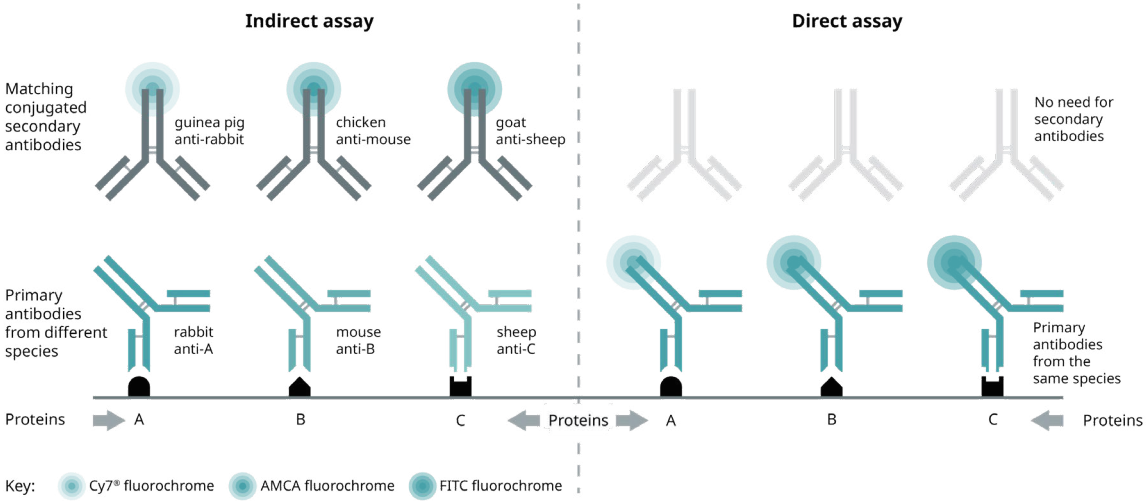


Figure 1. Indirect versus direct assays.

選擇「直接」或「間接」法

兩種方法各具優缺點，您可以參考實驗設計判斷適合的方法。

Table 1. 直接與間接法的比較 Advantages and disadvantages of direct and indirect methods.

	直接 (conjugated primary antibody)	間接 (primary antibody + conjugated secondary antibody)
合適性	適合偵測中-高表現的目標物，無須利用次級抗體來放大訊號	適合偵測低表現的目標物，須利用次級抗體來放大訊號
時間	使用標定初級抗體可以減少步驟以縮短實驗時間，只需要經過一次培養即可	使用次級抗體需要花較長時間做培養，需先使用未標定的抗體與檢體反應後，再用標定的次級抗體來與初級抗體反應
花費	價錢通常較高	次級抗體價錢相對來說較低，且可以應用在別的初級抗體上
複雜度	步驟相對簡單，好設計實驗，染劑標定抗體的結合讓您可以有更好的自由度去設計多重因子的分析	需要選擇適合的次級抗體與多個控制組，實驗設計較複雜，這在多因子分析中特別重要，因為需要多個主抗體，每個主抗體針對不同的物種，以及多個相應的次級抗體，每個次級抗體都需接合到不同的染劑
物種交叉反應	由於螢光已經標定在抗體上，因此物種交叉反應已降到最低	除了目標物，次級抗體可能有物種交互反應的情形，可使用預吸附抗體降低物種交叉反應
背景值	使用直接法可降低背景值，因為主抗體已經標定，且不太可能與樣本中的其他抗原反應	在實驗中添加了額外的試劑，次級抗體可能與樣本中的其他抗原發生交叉反應，導致較高的背景值

常用的標的物 Commonly used labels

用於標定抗體的標的物包括螢光染劑、小分子標記物 (Biotin)、酵素 (HRP)、Alkaline phosphatase (AP)、蛋白 (R-PE, APC, Streptavidin)、乳膠微粒、奈米金與寡核苷酸等。可依照實驗需求來選擇適合的標的物。

Table 2. 常用的標定物與應用 Labels and their most common applications

實驗類型	標的物
Western blot	HRP, AP, fluorescent dyes
Immunofluorescence	Fluorescent dyes, including Alexa Fluor® dyes
Fluorescent immunohistochemistry (singleplex)	Fluorescent dyes
Fluorescent immunohistochemistry (multiplex)	Fluorescent dyes, oligonucleotides
Chromogenic immunohistochemistry	HRP, AP, Biotin
Flow cytometry	Fluorescent dyes, such as Alexa Fluor® dyes, fluorescent proteins, including Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), and tandem dyes
ELISA, ELISA-based applications	HRP, Biotin
Immuno-PCR, Proximity ligation assay (PLA), Single-cell proteomics	Oligonucleotides
Lateral flow assay (LFA)	Latex and gold nanoparticles, and fluorescent nonoparticles (Europium)
Mass cytometry (CyTOF®, Imaging Mass Cytometry™)	Metal ion tags

Antibody labeling chemistries

如果您想使用標定好的初級抗體來進行實驗，可以購買商業化標記的初級抗體，或者使用標定試劑組 (Conjugation kit) 自行進行初級抗體的標定。

無法找到適當的抗體和標記組合，標定試劑組會是您的好幫手!
在接下來的部分中，將針對常見的標記方法說明，以幫助您選擇適合的方法來完成您的實驗。

抗體標定通常步驟繁雜且需要一定的專業知識。
使用傳統的標定方法去標定抗體需要對化學修飾有基本的了解，除此之外，有許多種胺基酸殘基可進行化學標定，最常見的是離胺酸 (Lysine) 的側鏈上的胺基團、半胱胺酸 (Cysteine) 還原產生的硫醇基 (Sulfhydryl groups)，或是碳水化合物的官能基。

以下是我們幾個常見的抗體標定方法：

NHS ester method

使用 NHS (N-Hydroxysuccinimide) 酯基的共價結合是最常見的抗體標定方法之一，原理是將欲標定的標的物附著到離胺酸殘基的胺基團上。NHS 酯方法為使用具 NHS 基團的螢光染料，在與抗體反應後，通過各種分離過程去除任何多餘的反應性染料 (Figure. 2)。

例如在管柱層析中，分離過程相比於抗體複合物，使用標的物具有大小上的優勢。儘管這些分離步驟可能導致部分損失，但同時也可以去除未結合的染劑，降低實驗中可能產生高背景的機會。

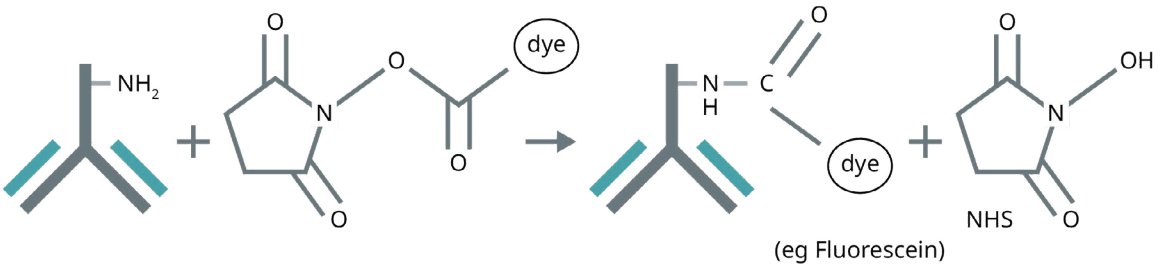


Figure 2. NHS ester reaction with an amine (pH 8.0).

Two-tag method (heterobifunctional method)

Two-tag 法通常用於共價結合蛋白分子，例如HRP。因為抗體 (Ab) 和標籤 (L) 都具有多個離胺酸基團，但需注意的是可能會有 Ab-Ab 或 L-L 同源二聚體或高分子量聚集的風險。

Two-tag 法的主要優勢在於它提供了一種可控制的反應，來形成共價結合抗體。然而，但在實際應用中可能會面臨一些挑戰，包括預先結合中的分離步驟可能導致潛在的抗體損失、回收量的不確定性、不同批次之間的變異性與缺乏可擴展性。這些考慮因素在設計實驗流程時需要仔細考慮，以確保取得準確而可靠的結果。

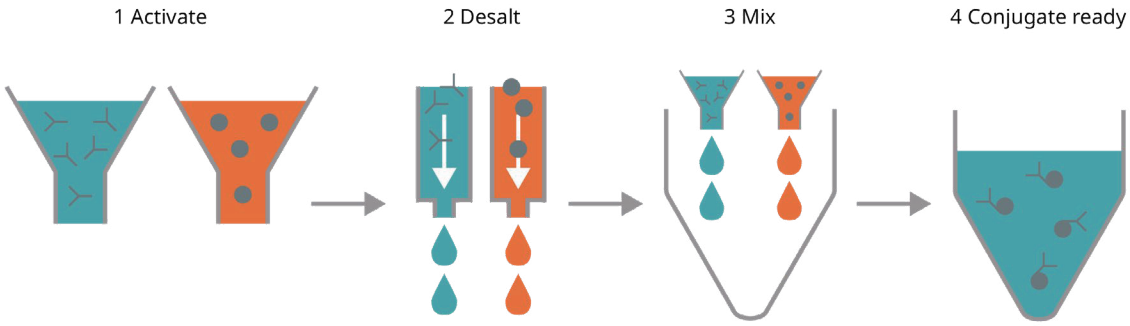


Figure 3. The two-tag approach to conjugation.

Site-specific conjugation

以上描述的所有標記方法都依賴於抗體鏈中的特定胺基酸殘基。然而，這些胺基酸的數量和位置可能取決於抗體鏈的序列，某些胺基酸可能屬於抗原結合位點。標的物結合在抗原結合位點附近可能會干擾抗體的結構、電荷和親和力，因此也會影響其功能。

位點特異性共價結合確保標定發生在遠離抗原結合位點的位置，因此標的物不會產生立體阻礙，影響抗體的結合親和力和親和度。通過對特定F_C區域進行修改，可以對標記位置的更精確控制，確保不會對抗體的性能產生負面影響。這有助於提高抗體標記的可靠性和可控性，並確保實驗結果的一致性。

Cysteine-based conjugation

對於主要胺基修飾的替代方法是針對硫醇基進行修飾。
蛋白質和抗體中存在胺基鏈內雙硫鍵 (-S-S-)，因此需要進行化學還原以使其轉變為可反應形式的硫醇基 (-SH)，以進行抗體標記。每次還原時，將形成兩個硫醇基團，可以與硫醇基反應的化合物形成配對，例如雙馬來醯亞胺 (Maleimides) 和吡啶基二硫酮 (Pyridyl disulfides)。

這種方法通過對抗體中的硫醇基進行標定，提供了對不同胺基酸殘基的選擇，與主胺基標記方法相比，提供了另一個靈活的選擇。這可以在實驗中用來探索不同的標定位置，同時也需要謹慎考慮對抗體結構和功能的影響。

以半胱胺酸殘基為目標，我們可以將感興趣的標的物附著在遠離結合位點區域。然而，並非所有的抗體都能承受化學還原反應，可能導致不穩定的半抗體 (Half antibodies) 的產生，由於只存在一個結合位點，因此其親和力較低。

Glycan-based conjugation

醣類 (Glycan) 是由所有生物製造的基於碳水化合物的聚合物。這種特異性位點方法 (Site-specific) 專注於所有 IgG 抗體的 F_c 區域上的碳水化合物殘基。這種方法也可以在遠離抗原結合位點的地方附著所需的標的物。

早期的化學方法相對複雜且嚴格，通常藉由於對 cis-二醇的氧化以形成醛基，並利用這些基團與肼基 (Hydrazides) 反應。目前較創新和溫和的方法包括使用酵素將一個偶氮基團 (Azido moiety) 附著到 IgG 抗體重鏈上 N 端的醣基上；一旦進行了偶氮修飾，即可對感興趣的標的物透過「點擊化學 (click chemistry)」方法附著到抗體上。

Conjugation kits

標定試劑組的簡化了傳統複雜的共價結合過程。Lightning-Link®，採用簡單的三個步驟。將待標定的抗體加入含有所需標定的冷凍乾燥混合物中，共價結合的抗體即標定完成，無需進行純化步驟，降低了抗體損失的風險。

優勢包括可重復性和可擴展性，只需 10 µg - 100 mg 的抗體即可進行標定，Lightning-Link® 試劑組超過 45 種不同的標記物滿足您在實驗上的需求。

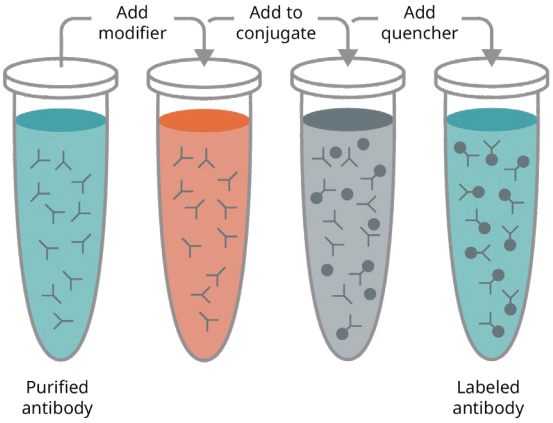


Figure 4. The Lightning-Link® kit labeling method.

Four key considerations to generate high-quality conjugates

大多數標定化學反應的效率，特別是 NHS 酯基方法，取決於多個因素如：何種應用、抗體的純度和濃度，以及緩衝溶液的成分等。

標定抗體時需要重點注意哪些事項？

1. 選擇最適合的標記物: 根據最終的應用來選擇適合的標記物
2. 確定為經純化的抗體: 只有純化抗體適合進行標定，不建議使用未經處理的血清或組織培養上清液
3. 確定您的抗體濃度: 抗體濃度至少應為 1 mg/mL
4. 確定您的緩衝溶液成分: 某些緩衝溶液成分與標定反應不相容，如:BSA、Sodium azide、Glycerol、EDTA (Table. 4)

如果抗體不符合上述要求，可以使用 Abcam 的純化及濃縮試劑盒，輕鬆純化或濃縮抗體。另外，Abcam 擁有超過 10,000 種專為抗體標定設計的 Carrier-free 無載體系列抗體。不含影響標定實驗的成分 (如: BSA、Sodium azide、Glycerol) 等，可直接對抗體進行標定，無需進行抗體純化或濃縮。

Table 4. Buffer formulation components that can interfere with conjugation reaction and purification kits.

Unconjugated antibody properties	Compatibility	Notes
Purified antibody	Yes	–
Antibody in ascites fluid, serum, hybridoma or tissue culture media.	No	ab109209 ab128751 適合純化血清或腹水中的 IgG
Antibody concentration	> 1mg/mL	ab102778 可濃縮純化抗體 ab287853 可確認抗體濃度
pH	6.5 – 8.5	–
Amine free buffer (eg, MES, MOPS, HEPES, PBS), NaCl, Borate buffer, Chelating agents (eg, EDTA), Sugars	Yes	–
BSA	Only at < 0.1%, w/v	ab173231 可去除抗體中的BSA
Sodium azide	Only at < 0.1%, w/v	ab102778 可濃縮純化抗體 Sodium azide 可能影響 HRP 的活性
Glycerol	≤ 50 %, v/v	Use only at concentrations up to 50%
Gelatin	Only at < 0.1%	Use only at concentrations <0.1% 如果要進行 IHC 實驗則避免抗體含有 gelatin，可能會造成背景值過高
Tris	< 50 mM	–
Glycine	No	–
Thiomersal / Thimerosal, Merthiolate, Proclin 300, Nucleophilic components (Primary amines, eg, amino acids or ethanolamine and thiols, eg, mercaptoethanol or DTT)	No	–

Note: 上述所顯示的濃度理應不影響抗體標定反應。但並不建議在超過特定濃度與其他化合物結合使用，可能會影響抗體結合反應。

Confirming successful antibody conjugation

在繼續實驗的下一步之前，確認抗體結合是否成功非常的重要。可使用流式細胞儀測量標定程度以確認抗體共價結合是否成功。

Lightning-Link® Antibody Labeling Kits

Our full range of fluorescent labels

Fluorescent label	Maximum absorbance (nm)	Excitation colour	Suggested excitation laser (nm)	Maximum emission (nm)	Emission colour
AMCA**	352	N/A	355	452	
DyLight® 350**	354	N/A	355	432	
Atto 390**	388		405	468	
DyLight® 405**	402		405	428	
PerCP	484		488	678	
PerCP/Cy5.5	484		488	692	
DyLight® 488**	496		488	524	
Alexa Fluor® 488**	496		488	524	
Fluorescein***	498		488	532	
R-Phycoerythrin	498, 544, 566†		488, 532, 561	580	
PE/Texas Red®	498, 544, 566†		488, 532, 561	618	
PE/Atto594	498, 544, 566†		488, 532, 561	632	
PE/Cy5	498, 544, 566†		488, 532, 561	672	
PE/Cy5.5	498, 544, 566†		488, 532, 561	700	
PE/Cy7	498, 544, 566†		488, 532, 561	782	
Atto488**	504		488	530	
B-Phycoerythrin	546		561	580	
Cyanine Dye 3**	552		561	576	
Rhodamine**	555		561	588	
Alexa Fluor® 555**	552		532	570	
DyLight® 550**	556		561	584	
Atto 565**	570		561	598	
Alexa Fluor® 568**	580		532	604	
Alexa Fluor® 594**	592		532	620	
DyLight® 594**	594		561*	629	
Texas Red®	596		561*	616	
DyLight® 633**	628		633, 635, 640	660	
Atto 633**	634		633, 635, 640	660	
FluoProbes647H**	650		633, 635, 640	684	
Cyanine Dye 5**	652		633, 635, 640	678	
Allophycocyanin	652		633, 635, 640	666	
APC/Cy5.5	652		633, 635, 640	700	
APC/Cy7	652		633, 635, 640	790	
Alexa Fluor® 647**	652		640	672	
DyLight® 650**	656		633, 635, 640	686	
Cyanine Dye 5.5**	680		640*	705	
DyLight® 680**	686		640*	716	
Alexa Fluor® 700**	695		640*	720	
DyLight® 755**	756		640*	794	
DyLight® 800	776		640*	798	

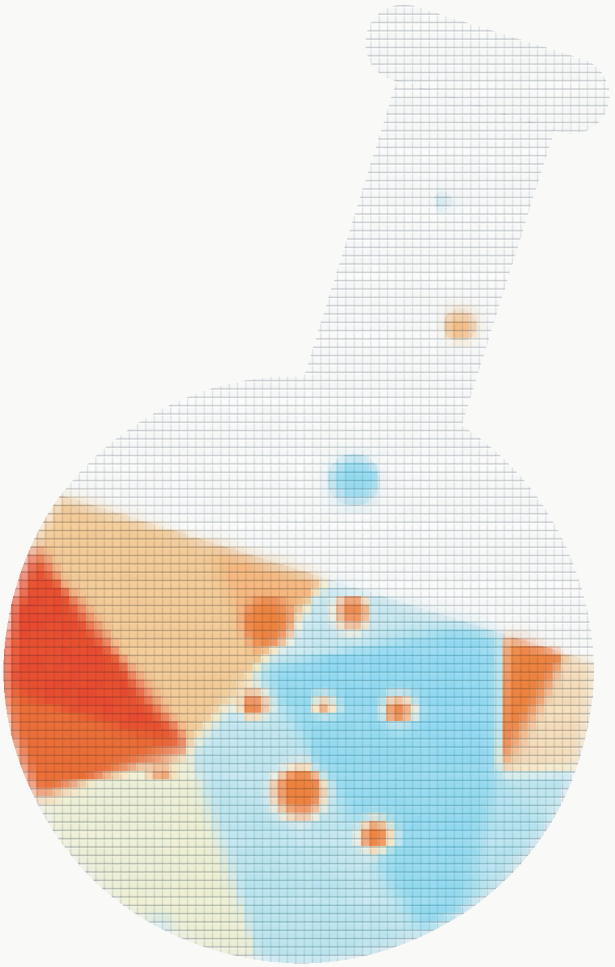
† R-PE has three maxima, and all can be used. The optimal will depend on the application. * This laser line is some distance from the Maximum Absorbance, so performance will be compromised if this dye is used with the suggested laser line. ** Lightning-Link® Fast kit. *** Both Fast and standard Lightning-Link® kits.

Visit **abcam.com/kits/antibody-conjugation-kits** to see our full range including nanoparticles such as Gold, Latex, Europium and Magnetic beads and oligonucleotide conjugation kits

progress happens together abcam

For more information, please visit **abcam.com/kits/antibody-conjugation-kits**

Alexa Fluor® and Dylight® are registered trademarks of Life Technologies. Alexa Fluor® and Dylight® dye conjugates contain technology licensed to Abcam by Life Technologies



To help you progress faster!

EXCEL BIOMEDICAL 昶安生技

台北:(02)8751-5851　台南:(06)311-0133　客服:0800-012-310
台中:(04)2422-0117　新竹:(03)621-0429　信箱:service@exbio.com.tw

AB-3502-AB