

Antibody labeling kits

Contents

| | |
|---|-------|
| English: Antibody labeling kits | 3-7 |
| Русский: Наборы для флуоресцентного мечения антител | 8-14 |
| Deutsch: Kits zur Antikörpermarkierung | 15-21 |

Lumiprobe Corporation
(US and Worldwide)
9:00AM - 9:00PM EST

Phone: +1 888 973 63 53

Lumiprobe GmbH
(Germany and Europe)
8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Phone: +49 511 16596811

Lumiprobe RUS Ltd
(Russia and CIS)
8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

Antibody labeling kits

The kit is used for the preparation of labeled antibodies having 2.5-3 labels per antibody. The kit contains all reagents and materials for ten labeling reactions, each for 100 µg of the antibody. The dye is a NHS ester, taken in controlled excess. It reacts with the amine groups of lysines of the antibody at mild alkaline pH. The purification of the antibody is achieved by gel filtration using spin columns. These kits contain sulfonated, water soluble dyes, that are most suitable for the labeling of sensitive proteins, including antibodies.

Kit components

| Kit component | Count | | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1321-10rxn | 3321-10rxn | 7321-10rxn | 5321-10rxn | 6321-10rxn |
| | 10 reactions | 10 reactions | 10 reactions | 10 reactions | 10 reactions |
| N1320, Sulfo-Cyanine3 NHS ester, 1 rxn | 10 | — | — | — | — |
| N3320, Sulfo-Cyanine5 NHS ester, 1 rxn | — | 10 | — | — | — |
| N7320, Sulfo-Cyanine5.5 NHS ester, 1 rxn | — | — | 10 | — | — |
| N5320, Sulfo-Cyanine7 NHS ester, 1 rxn | — | — | — | 10 | — |
| N6320, Sulfo-Cyanine7.5 NHS ester, 1 rxn | — | — | — | — | 10 |
| Desalting spin column, PBS | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Desalting receptacle vial, 1.5 mL | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Desalting waste vial, 2 mL | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| PBS tablet, for 100 mL of buffer | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 15050, DMSO, labeling grade, 1 mL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1584-05mL, Sodium azide solution, 3%, 0.5 mL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1689-15mL, Sodium bicarbonate, 126 mg | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Store at temperature between +3 °C and +20 °C. Do not freeze!

Shelf life 12 months.

Protocol

1. Antibody preparation.

Optimal conditions for the labeling reaction are the following: antibody at a concentration of 1 mg/mL dissolved in 0.1 M sodium hydrocarbonate solution. Sodium azide is compatible with the labeling. If concentration of antibody is below 1 mg/mL, it should be concentrated. Antibody preparation should be free of aminoacids, proteins like BSA and buffer components that bring pH to unfavourable (2-7.5 or 9-12) ranges.

2. Setting up the reaction.

2.1. Add a solution of antibody in sodium hydrocarbonate (100 ug in 100 μ L*) to the fluorophore, vortex, and incubate for 30 min at room temperature.

* if a smaller amount of antibody is to be labeled, dissolve lyophilized dye in 10 μ L of anhydrous DMSO, and take 1 μ L of the solution per 10 ug of antibody. The solution of dye in DMSO should be consumed immediately.

3. Purification of the labeled antibody.

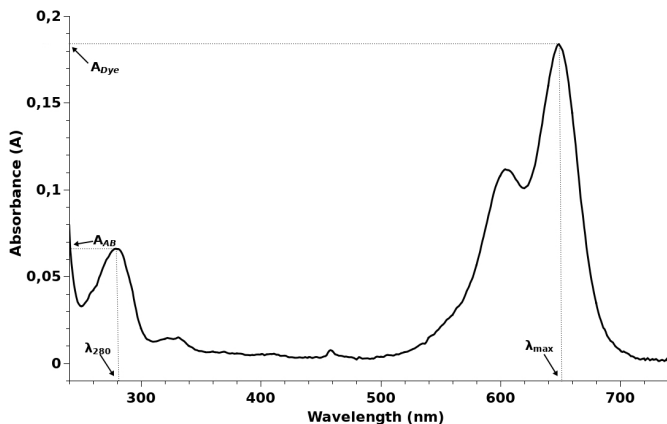
3.1. Prepare the column. The column should be at room temperature prior to use. The gel should be resuspended using vortex. Put the column into a waste receptacle (without cap), and centrifuge for 2 min at 1,000 g (speed must be carefully controlled — for standard 6 cm rotor, 1,000 g = 3800 rpm). The small bulge of the column should be oriented outwards.

3.2. Apply 400 μ L of 1x PBS buffer, centrifuge for 2 min at 1,000 g.

3.3. Remove the column from waste receptacle. Put it into collection tube (with cap). Apply 100 μ L of the reaction mixture onto the column, incubate for 1 min, and elute the antibody by centrifugation for 2 min at 1,000 g. Add 1/100 volume of 100x sodium azide. Antibodies can be aliquoted to improve their shelf life. Current aliquot can be stored at +4 °C the rest at -20 °C.

4. Measurement of dye to antibody ratio.

To calculate dye to antibody ratio, measure absorption spectrum of the conjugate, or absorption at 280 nm (A_{AB}), and at dye absorption maximum (A_{Dye}). A typical absorption spectrum of a dye labeled antibody is shown below. Depending on the dye, wavelength of the maximum may vary.



An absorption spectrum of a labeled antibody contains dye peak (with longer wavelength), and antibody peak (at around 280 nm). Dye to antibody ratio is calculated using the following formula:

$$\frac{\text{Dye}}{\text{AB}} = \frac{A_{Dye} \times \epsilon_{AB}}{(A_{AB} - A_{Dye} \times CF) \times \epsilon_{Dye}}$$

with **Dye/AB** — average number of fluorophores per antibody molecule, A_{dye} — optical density of the sample at dye absorption maximum, A_{AB} — sample optical density

at 280 nm, ϵ_{AB} — molar extinction coefficient of antibody at 280 nm (210,000 for IgG), ϵ_{Dye} — molar extinction coefficient of dye at absorption maximum (see table below), CF_{280} — correction factor for dye (see table below).

| Dye | λ_{max} nm | ϵ | CF_{280} |
|------------------|--------------------|------------|------------|
| sulfo-Cyanine3 | 548 | 162,000 | 0.06 |
| sulfo-Cyanine5 | 646 | 271,000 | 0.04 |
| sulfo-Cyanine5.5 | 673 | 195,000 | 0.11 |
| sulfo-Cyanine7 | 750 | 240,600 | 0.04 |
| sulfo-Cyanine7.5 | 778 | 222,000 | 0.09 |

Example of calculation

After labeling of IgG antibody with sulfo-Cyanine5 and purification, a solution has been obtained with absorption spectrum above. Determine dye to protein ratio.

Using absorption spectrum, the following values can be found: $A_{Dye} = 0.184$ at dye absorption maximum (646 nm, see the table), $A_{AB} = 0.066$ (at 280 nm), $\epsilon_{AB} = 210000$ for IgG; $\epsilon_{Dye} = 271,000$, and $CF_{280} = 0.04$.

$$\frac{Dye}{AB} = \frac{A_{Dye} \times \epsilon_{AB}}{(A_{AB} - A_{Dye} \times CF) \times \epsilon_{Dye}} = \frac{0.184 \times 210\,000}{(0.066 - 0.184 \times 0.04) \times 271\,000} = 2.43$$

Dye/AB — is 2.43 fluorophore molecules per antibody.

Interpretation of results, and antibody storage

In most cases, optimal dye to antibody ratio is 2-3 dye molecules per antibody. Increase of dye loading above this value does not improve fluorescent signal because of the concentrational quenching of the fluorescence. When too few fluorophores are attached during the reaction, decrease antibody loading per reaction. Use of expired kit can also lead to this result.

We recommend to test binding of labeled antibodies with their antigens. The labeled antibodies can be stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. An aliquot that is currently in use, should be stored at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to avoid freeze-thaw cycles. The stability of the conjugate is determined by antibody itself rather than fluorophore or the chemical bond. Labeled antibodies should not be exposed to direct sunlight for extended time, but tolerate ambient lighting well.

Наборы для флуоресцентного мечения антител

Наборы позволяют быстро ввести флуорофоры (флуоресцентные красители) в состав антитела (2-3 метки на 1 молекулу белка). В набор входят компоненты для проведения 10 реакций x 100 мкг антитела. Принцип действия основан на использовании сукцинимидного эфира красителя (берется в избытке), который в слабощелочной среде реагирует со свободными аминогруппами антитела (N-концевой аминогруппой, аминогруппой на лизине). Последующая очистка антитела от непрореагировавшего реагента производится гель-фильтрацией на микроколонках (входят в набор). Для мечения используются полностью растворимые в воде красители, поэтому наборы отлично подходят для мечения белков, в том числе антител.

Состав набора

| Компонент набора | Количество | | | | |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 1321-10гкл 10 реакций | 3321-10гкл 10 реакций | 7321-10гкл 10 реакций | 5321-10гкл 10 реакций | 6321-10гкл 10 реакций |
| N1320, Sulfo-Cyanine3 активированный эфир, 1 гкл | 10 | — | — | — | — |
| N3320, Sulfo-Cyanine5 активированный эфир, 1 гкл | — | 10 | — | — | — |
| N7320, Sulfo-Cyanine5.5 активированный эфир, 1 гкл | — | — | 10 | — | — |
| N5320, Sulfo-Cyanine7 активированный эфир, 1 гкл | — | — | — | 10 | — |
| N6320, sulfo-Cyanine7.5 активированный эфир, 1 гкл | — | — | — | — | 10 |
| Спин-колонка для обессоливания, PBS | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Пробирка приемная для обессоливания, 1.5 мл | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Пробирка приемная без крышки, 2 мл | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Таблетка PBS, на 100 мл буфера | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 15050, ДМСО, для мечения, 1 mL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1584-05mL, Раствор азида натрия, 3%, 0.5 mL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1689-15mL, Гидрокарбонат натрия, 126 mg | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Хранить при температуре от +3 °С до +20 °С. Не замораживать!

Срок хранения 12 месяцев.

Протокол

1. Подготовка антитела.

Препарат антитела не должен содержать примеси свободных аминокислот или других белков, например BSA, а также компонентов буферных растворов с pH 2-7,5 или 9-12. Если антитело находится в буферном растворе с pH 8- 8,5 (на основе бикарбоната натрия или TrisHCl) и гарантированно не содержит других примесей, его можно использовать в реакции без дополнительной очистки. Если вы не уверены, что препарат антитела не содержит примесей, то обязательно проведите процедуру очистки. Для очистки антитела (при необходимости) рекомендуется использовать один из следующих методов: диализ, гель-фильтрация или ультрафильтрация на колонках, с использованием 0.1 М раствора гидрокарбоната натрия (навеска гидрокарбоната натрия есть в наборе).

Оптимальные условия для проведения мечения антитела: концентрация антитела 1 мг/мл в растворе 0.1 М гидрокарбоната натрия без посторонних примесей. Присутствие консервирующего агента азиды натрия в растворе антитела (до концентрации 0.04%) не оказывает влияния на реакцию.

Если концентрация антитела ниже 1 мг/мл, то ее необходимо довести до 1 мг/мл с помощью концентрирования (ультрафильтрацией) и последующего разбавления. Для полной очистки от возможных примесей рекомендуется провести два цикла концентрирования/разбавления. После каждого концентрирования антитело разбавляется 0.1 М гидрокарбонатом натрия.

Если концентрация антитела выше 1 мг/мл, перед разбавлением рекомендуется провести его однократную промывку на колонке для ультрафильтрации с помощью 0.1 М гидрокарбоната натрия. Для полной очистки от возможных примесей рекомендуется провести два цикла концентрирования/разбавления. После промывки антитело разбавляется 0.1 М гидрокарбонатом натрия.

Концентрацию антитела рекомендуется контролировать спектрофотометрически (для этих целей лучше всего подходит бесцветный спектрофотометр).

Стоит отметить, что концентрация антитела в реакционной смеси влияет на степень мечения. Например, при постановке реакции со 100 мкг антитела в объеме менее 100 мкл будет получено модифицированное антитело со степенью мечения до 4-5 молекул красителя на антитело. При постановке реакции со 100 мкг антитела в объеме, большем 100 мкл, будет получено модифицированное антитело со степенью мечения 0.3-1 молекул красителя на антитело.

2. Постановка реакции.

2.1. В пробирку с лиофилизированным флуорофором (флуоресцентным красителем) добавьте раствор антитела в 0.1 М гидрокарбонате натрия (рекомендуемые количества — 100 мкг* антитела в 100 мкл**), перемешайте на вортексе до полного растворения реагента и инкубируйте 30 мин при комнатной температуре.

* если необходимо провести реакцию с меньшим количеством антитела, необходимо развести лиофилизированный реагент в 10 мкл безводного DMSO и взять для реакции по 1 мкл раствора на каждые 10 мкг антитела. Раствор реагента в DMSO не подлежит хранению.

3. Очистка антитела от избытка реагента.

3.1. Предварительно растворите таблетку буфера PBS в 100 мл воды.

3.2. Подготовьте колонку. Убедитесь, что колонка имеет комнатную температуру. Сорбент ресуспендируйте на вортексе. Снимите с колонки колпачки, поместите ее в пробирку для сбора жидкости и центрифугируйте получившуюся конструкцию 2 мин при 1000 g (необходимо строго соблюдать установленную скорость; для стандартного ротора радиусом 6 см, 1000 g соответствует 3800 об/мин; при центрифугировании необходимо соблюдать ориентацию колонки в роторе: выступ на верхней части колонки должен быть направлен от центра ротора). После центрифугирования удалите фильтрат.

3.3. Нанесите на колонку 400 мкл буфера PBS, центрифугируйте 2 мин при 1000 g. После центрифугирования удалите фильтрат. Перенесите колонку в 1,5 мл пробирку для сбора антитела, входящую в набор.

3.4. Нанесите в центр колонки 100 мкл** реакционной смеси, инкубируйте 1 мин, центрифугируйте в течение 2 мин при 1000 g. В пробирке соберется очищенное антитело***.

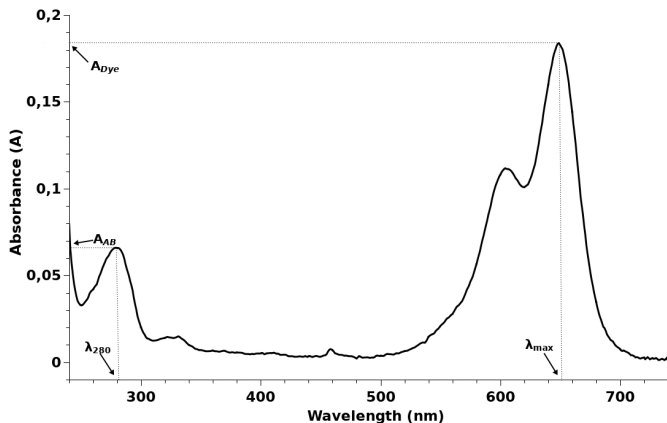
**Для очистки на колонку можно наносить от 50 до 100 мкл. Если реакция проводилась в меньшем объеме, рекомендуется после реакции довести объем препарата минимум до 50 мкл путем добавления буфера PBS.

***После центрифугирования к препарату антитела можно добавить раствор азид натрия (имеется в наборе) в объеме 1% от объема препарата. При необходимости препарат антитела можно разделить на алиquotы по мере центрифугирования. В этом случае алиquotу, с которой ведется работа, следует хранить при +4 °С, остальные алиquotы — при -20 °С. При +4 °С допустимо хранить только те растворы, в которые добавлен азид натрия.

4. Контроль количества флуорофоров, прореагировавших с антителом.

Для того чтобы вычислить степень мечения (число молекул флуорофора, введенных на 1 молекулу антитела), необходимо измерить оптическую плотность раствора при длине волны 280 нм (A_{AB}) и длине волны максимума поглощения красителя (A_{Dye}). Типичный вид спектра поглощения показан на рисунке.

В зависимости от красителя длина волны максимума его поглощения может меняться.



В спектре поглощения меченого антитела присутствует пик красителя (длинноволновый), и пик поглощения антитела (~280 нм). Число молекул флуорофора на 1 молекулу антитела рассчитывается по формуле:

$$\frac{Dye}{AB} = \frac{A_{Dye} \times \epsilon_{AB}}{(A_{AB} - A_{Dye} \times CF) \times \epsilon_{Dye}}$$

где **Dye/AB** — искомое число молекул красителя на молекулу антитела, **A_{Dye}** — оптическая плотность образца на длине волны максимума поглощения красителя, **A_{AB}** — оптическая плотность образца на длине волны 280 нм, **ε_{AB}** — мольный коэффициент экстинкции антитела на длине волны 280 нм (для IgG — 210000), **ε_{Dye}** — мольный коэффициент экстинкции красителя на длине волны максимума поглощения (берется из таблицы ниже), **CF₂₈₀** — фактор коррекции для красителя на длине волны 280 нм (берется из таблицы ниже).

| Краситель | λ _{max} , нм | ε | CF ₂₈₀ |
|------------------|-----------------------|---------|-------------------|
| sulfo-Cyanine3 | 548 | 162 000 | 0.06 |
| sulfo-Cyanine5 | 646 | 271 000 | 0.04 |
| sulfo-Cyanine5.5 | 673 | 195 000 | 0.11 |
| sulfo-Cyanine7 | 750 | 240 600 | 0.04 |
| sulfo-Cyanine7.5 | 778 | 222,000 | 0.09 |

Пример расчета

В ходе реакции мечения антитела IgG красителем sulfo-Cyanine5 после очистки был получен препарат, имеющий спектр поглощения на рисунке выше. Определить степень мечения антитела.

По спектру поглощения находим **A_{Dye}** = 0.184 на длине волны максимума поглощения красителя (646 нм, см. таблицу), **A_{AB}** = 0.066 (на длине волны

280 нм). $\epsilon_{AB} = 210000$ для IgG, из таблицы берем $\epsilon_{Dye} = 271000$ и $CF_{280} = 0.04$.

$$\frac{Dye}{AB} = \frac{A_{Dye} \times \epsilon_{AB}}{(A_{AB} - A_{Dye} \times CF) \times \epsilon_{Dye}} = \frac{0.184 \times 210\,000}{(0.066 - 0.184 \times 0.04) \times 271\,000} = 2.43$$

Dye/AB — искомое число молекул красителя на молекулу антитела — составляет 2.43 молекулы флуорофора на антитело.

Интерпретация результатов и хранение антител

Оптимальная степень мечения для получения хорошего флуоресцентного сигнала составляет в большинстве случаев 2-3 молекулы красителя на молекулу антитела. Дальнейший рост степени мечения не приводит к существенному усилению флуоресцентного сигнала, поскольку наблюдается концентрационное тушение флуоресценции. Если степень мечения недостаточна, необходимо уменьшить количество антитела, вводимого в реакцию. Низкая степень мечения может быть связана с использованием набора с истекшим сроком годности.

Антитела после мечения желательно протестировать на предмет их связывания с субстратом. Хранить меченые антитела можно при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Аликвоту, с которой ведется работа, необходимо хранить при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ во избежание многократного замораживания-оттаивания. Стабильность конъюгатов определяется стабильностью самого антитела, а не флуорофора. Не следует хранить меченые антитела на прямом солнечном свете, однако они вполне совместимы с комнатным освещением.

Kits zur Antikörpermarkierung

Die Kits dienen der Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern. Ein Kit enthält Reagenzien und Materialien für zehn Markierungsreaktionen mit jeweils 100 µg Antikörper. Der Fluorophor wird als NHS-Ester im kontrollierten Überschuss eingesetzt, um die Markierung eines Antikörpers mit 2,5–3 Markermolekülen zu erzielen. Bei schwach alkalischem pH-Wert reagiert der Fluorophor mit den Aminogruppen der antikörper-eigenen Lysin-Seitenketten. Die Aufreinigung erfolgt anschließend mit Gelfiltrationssäulchen in der Tischzentrifuge. Die Kits enthalten sulfonierte, wasserlösliche Fluorophore, die sich sehr gut für die Markierung empfindlicher Proteine, einschließlich Antikörpern, eignen.

Bestandteile

| Komponente | Anzahl | | | | |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 1321-10rxn | 3321-10rxn | 7321-10rxn | 5321-10rxn | 6321-10rxn |
| | 10 Reaktionen | 10 Reaktionen | 10 Reaktionen | 10 Reaktionen | 10 Reaktionen |
| N1320, Sulfo-Cyanin 3 NHS-Ester, 1 rxn | 10 | — | — | — | — |
| N3320, Sulfo-Cyanin 5 NHS-Ester, 1 rxn | — | 10 | — | — | — |
| N7320, Sulfo-Cyanin 5.5 NHS-Ester, 1 rxn | — | — | 10 | — | — |
| N5320, Sulfo-Cyanin 7 NHS-Ester, 1 rxn | — | — | — | 10 | — |
| N6320, Sulfo-Cyanin 7.5 NHS-Ester, 1 rxn | — | — | — | — | 10 |
| Zentrifugationssäulchen zum Entsalzen, PBS | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Auffanggefäß (1,5 ml) für die Gelfiltration | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Abfallgefäß (2 ml) für die Gelfiltration | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| PBS-Tablette, ergibt 100 ml Puffer | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 15050, DMSO, Markierungsgüte, 1 mL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1584-05mL, Natriumazidlösung, 3%, 0.5 mL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1689-15mL, Natriumbicarbonat, 126 mg | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Lagern bei +3 °C bis +20 °C. Nicht einfrieren!

Haltbarkeit: 12 Monate.

Anleitung

1. Vorbereitung der Antikörperlösung

Die Antikörper sollten vor der Markierungsreaktion in 0,1 M Natriumbicarbonatlösung auf eine Konzentration von 1 mg/ml gelöst werden. Natriumazid beeinträchtigt die Reaktion nicht. Falls die Antikörperkonzentration geringer als 1 mg/ml ist, sollte die Lösung aufkonzentriert werden. Die Antikörperlösung sollte keine Aminosäuren, Proteine wie BSA und Pufferkomponenten, die den pH-Wert in einen unerwünschten Bereich (2–7,5 oder 9–12) bringen, enthalten.

2. Reaktionsansatz

2.1 Zentrifugieren Sie den lyophilisierten Fluoreszenzfarbstoff kurz an.

2.2 Geben Sie die vorbereitete Antikörperlösung (100 µg in 100 µl*) direkt auf den lyophilisierten Fluorophor und vortexen Sie langsam. Inkubieren Sie die Reaktionslösung 30 min bei Raumtemperatur.

* Falls eine geringere Antikörpermenge markiert werden soll, lösen Sie den lyophilisierten Fluorophor in 10 µl wasserfreiem DMSO und setzen Sie 1 µl dieser Lösung pro 10 µg Antikörper ein. Die Lösung des Fluorophors in DMSO sollte unmittelbar verbraucht werden.

3. Aufreinigung der markierten Antikörper

3.1 Vorbereitung des Säulchens: Das Säulchen sollte bei Gebrauch Raumtemperatur angenommen haben. Resuspendieren Sie das Säulenmaterial durch Vortexen. Entfernen Sie zunächst den unteren Verschluss und stecken Sie das Säulchen in ein Abfallröhrchen (ohne Verschlusskappe). Entfernen Sie dann auch den oberen Deckel und zentrifugieren Sie 2 min lang mit 1.000 g, um den Puffer zu entfernen ($1.000 \times g = 3.800 \text{ min}^{-1}$ für Tischzentrifuge mit Standard-Rotor für 1,5-ml-Röhrchen). Die Markierung am oberen Säulchenrand dient der gleichbleibenden Ausrichtung und sollte bei allen Zentrifugationsschritten nach außen weisen. Verwerfen Sie den eluierten

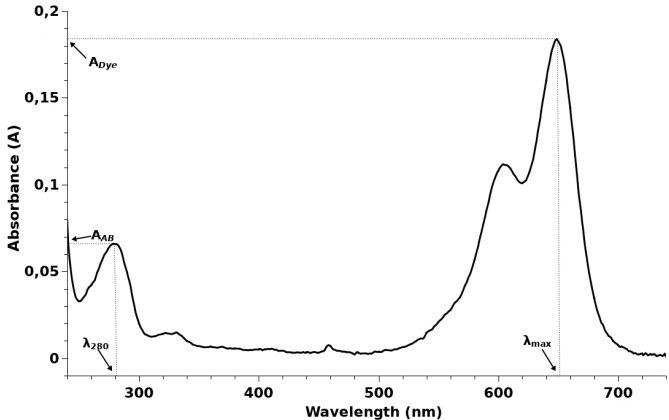
Puffer und stecken Sie das Säulchen wieder in dasselbe Abfallröhrchen.

3.2 Geben Sie 400 μl PBS auf das Säulenmaterial und zentrifugieren Sie erneut für 2 min mit 1.000 g .

3.3 Verwerfen Sie das Abfallröhrchen mit dem eluierten Puffer und stecken Sie das Säulchen in ein Auffanggefäß (mit Deckel). Pipettieren Sie 100 μl des Reaktionsansatzes mittig auf das Säulenmaterial. Nach einer Minute bei Raumtemperatur eluieren Sie die Antikörper durch Zentrifugation für 2 min mit 1.000 g . Vergessen Sie dabei nicht, den Rotordeckel anzubringen. Geben Sie als Konservierungsmittel 1/100 Volumenanteil 100 \times Natriumazidlösung zum Eluat. Zur Langzeitlagerung empfiehlt es sich, die Antikörperlösung aliquotiert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ einzufrieren. Die Gebrauchslösung sollte bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

4. Bestimmung des Verhältnisses von Farbstoff zu Antikörper

Um das Mengenverhältnis des Fluoreszenzfarbstoffs zum Antikörper zu bestimmen, nehmen Sie ein Absorptionsspektrum des Konjugats auf oder messen Sie die Absorption bei 280 nm (A_{AB}) und am Absorptionsmaximum des Fluorophors (A_{Dye}). Ein typisches Absorptionsspektrum eines markierten Antikörpers ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums hängt dabei von der Wahl des Fluoreszenzfarbstoffs ab.



Das Absorptionsspektrum eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers weist einen Antikörperpeak (bei etwa 280 nm) und einen Farbstoffpeak (mit größerer Wellenlänge) auf. Das Mengenverhältnis des Farbstoffs zum Antikörper berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Dye}}{\text{AB}} = \frac{A_{\text{Dye}} \times \epsilon_{\text{AB}}}{(A_{\text{AB}} - A_{\text{Dye}} \times \text{CF}) \times \epsilon_{\text{Dye}}}$$

mit **Dye/AB** = durchschnittliches Verhältnis von Fluorophor- zu Antikörpermolekülen, **A_{Dye}** = optische Dichte der Probe am Absorptionsmaximum des Fluorophors, **A_{AB}** = optische Dichte der Probe bei 280 nm, **ε_{AB}** = molarer Extinktionskoeffizient des Antikörpers bei 280 nm (210.000 für IgG), **ε_{Dye}** = molarer Extinktionskoeffizient des Fluorophors am Absorptionsmaximum (lt. folgender Tabelle), **CF₂₈₀** = Korrekturfaktor des Fluorophors (lt. folgender Tabelle).

| Fluorophor | λ_{\max} nm | ϵ | CF_{280} |
|------------------|---------------------|------------|------------|
| Sulfo-Cyanin 3 | 548 | 162.000 | 0,06 |
| Sulfo-Cyanin 5 | 646 | 271.000 | 0,04 |
| Sulfo-Cyanin 5.5 | 673 | 195.000 | 0,11 |
| Sulfo-Cyanin 7 | 750 | 240.600 | 0,04 |
| Sulfo-Cyanin 7.5 | 778 | 222.000 | 0,09 |

Beispielrechnung

Nach der Markierung eines IgG-Antikörpers mit Sulfo-Cyanin 5 und anschließender Aufreinigung wurde das oben abgebildete Absorptionsspektrum aufgenommen. Daraus soll nun das Verhältnis von Farbstoff zu Protein ermittelt werden.

Dem Absorptionsspektrum bzw. obiger Tabelle lassen sich folgende Werte entnehmen: $A_{\text{dye}} = 0,184$ am Absorptionsmaximum des Fluorophors (646 nm lt. Tabelle), $A_{\text{AB}} = 0,066$ (bei 280 nm), $\epsilon_{\text{AB}} = 210.000$ für IgG; $\epsilon_{\text{Dye}} = 271.000$, $CF_{280} = 0,04$.

$$\frac{\text{Dye}}{\text{AB}} = \frac{A_{\text{Dye}} \times \epsilon_{\text{AB}}}{(A_{\text{AB}} - A_{\text{Dye}} \times CF) \times \epsilon_{\text{Dye}}} = \frac{0,184 \times 210\,000}{(0,066 - 0,184 \times 0,04) \times 271\,000} = 2,43$$

Dye/AB = 2,43 Fluorophormoleküle pro Antikörpermolekül.

Interpretation des Ergebnisses, Antikörperlagerung

In den meisten Fällen wird das optimale Verhältnis von Fluorophor zu Antikörper bei 2–3 liegen. Eine stärkere Beladung mit Farbstoff verbessert das Fluoreszenzsignal aufgrund von konzentrationsabhängigen Quencheffekten in der Regel nicht. Sollten bei der Reaktion zu wenige Farbstoffmoleküle konjugiert werden, verringern Sie bitte die eingesetzte Antikörpermenge. Die Verwendung eines abgelaufenen Kits kann ebenfalls zu einem solchen Ergebnis führen.

Es empfiehlt sich, das Bindeverhalten markierter Antikörper an ihr Antigen zu überprüfen. Die markierten Antikörper können bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Ein

Gebrauchsaliquot sollte im Kühlschrank gelagert werden, um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden. Die Stabilität des Konjugats ist eher von der Stabilität des Antikörpers abhängig als von der des Fluorophors oder der kovalenten Bindung. Die markierten Antikörper sollten nicht über einen längeren Zeitraum dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden, tolerieren aber üblicherweise das Umgebungslicht.

Lumiprobe Corporation

(US and Worldwide)

9:00AM - 9:00PM EST

201 International Circle, Suite 135

Hunt Valley, Maryland 21030

USA

Phone: +1 888 973 63 53

Lumiprobe GmbH

(Germany and Europe)

8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Feodor-Lynen-Strasse 23

30625 Hannover

Germany

Phone: +49 511 16596811

Lumiprobe RUS Ltd

(Russia and CIS)

8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Kotsyubinskogo 4, bld. 3

121351 Moscow

Russian Federation

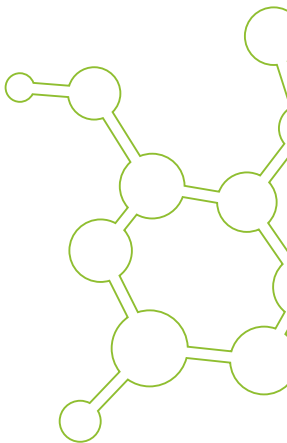
Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

The certificate No.: 44 100 202070

Issued by TÜV NORD CERT GmbH



www.lumiprobe.com