Technische Info

Guter Rat ist Roth.

# Auswahl, Anwendung und Validierung von Antikörpern

Ein Leitfaden für den gezielten Einsatz von Primär- und Sekundärantikörpern

## Inhalt


I. Antikörperauswahl und -anwendung

II. Auswahl eines sekundären Antikörpers

III. Antikörperanwendungen und -validierung


## I. Antikörperauswahl und -anwendung

Neben der Überprüfung der ausreichenden Spezifität eines Antikörpers sollten bei der Auswahl für ein Experiment weitere Aspekte berücksichtigt werden. Die nachfolgenden Kriterien sind für die meisten gängigen antikörperbasierten Anwendungen relevant.

### 1. Spezies-Reaktivität

Primäre Antikörper erkennen Proteine nur bestimmter Spezies.Üblicherweise bezieht sich dies auf die Spezies, aus der das immunisierende Antigen ursprünglich stammt, sowie auf nahe verwandte Arten. Prüfen Sie, ob der Antikörper für Ihre Spezies validiert ist. Bei hochkonservierten Proteinen kann auch eine nicht getestete Spezies erkannt werden.

### 2. Anwendungskompatibilität

Nicht alle Antikörper funktionieren in allen Techniken (z. B. IHC vs. Western Blot). Dies ist meist auf Unterschiede in der Probenaufbereitung der einzelnen Methoden zurückzuführen, wodurch die Antigene jweils unterschiedlich präsentiert oder zugänglich gemacht werden. Daraus folgt, dass die Tauglichkeit eines ausgewählten Antikörpers für die beabsichtigte Anwendung überprüft und validiert werden muss.

### 3. Klonalität

Die Klonalität spiegelt wider wie der Antikörper hergestellt wurde und gegen wie viele Epitope er gerichtet ist.

- Polyklonal: erkennt mehrere Epitope, stärkeres Signal, geeignet bei niedriger Zielproteinmenge.
- Monoklonal: spezifisch, reproduzierbar, geeignet für Sandwich-ELISAs oder langfristige Experimente.

## 4. Ziel-Epitop-Position

Die Bindungsstelle eines Antikörpers kann entscheidend sein. Für FACS muss er z. B. die extrazelluläre Domäne erkennen, da die Membran unpassierbar ist. Auch bei alternativen Spleißvarianten oder Knockout-Modellen kann die Epitope-Lage die Aussagekraft beeinflussen.

Das Epitop wird durch das Immunogen bestimmt, das ganz oder teilweise aus dem Protein bestehen kann; Details stehen im Produktdatenblatt.

## 5. Trägerstoffe und Konservierungsmittel

Antikörper werden meist in PBS mit Trägerproteinen wie BSA und Konservierungsmitteln wie Glycerin oder Natriumazid gelagert, um Stabilität zu gewährleisten und Bakterienwachstum zu verhindern.

Diese Zusätze können jedoch Experimente beeinflussen: BSA kann die Konjugation mit Fluorophoren oder Enzymen reduzieren, und Natriumazid ist zelltoxisch. Für Konjugationen oder Arbeiten mit lebenden Zellen werden daher Antikörper ohne Zusatzstoffe bevorzugt.

## 6. Antikörperkonzentration

Optimale Konzentration hängt von Affinität, Anwendung und Probe ab. Verdünnungsreihen helfen, das beste Signal-Rausch-Verhältnis zu ermitteln.

## 7. Direkt vs. Indirekt

Nachdem ein Antikörper an sein Zielprotein gebunden ist, muss seine Bindung sichtbar gemacht werden. Dies kann entweder direkt oder indirekt erfolgen (***Abbildung 1***).

- Direkt: Primärantikörper konjugiert an Marker.
- Indirekt: Sekundärantikörper erkennen Primärantikörper, Signalverstärkung möglich, aber höherer Hintergrund.

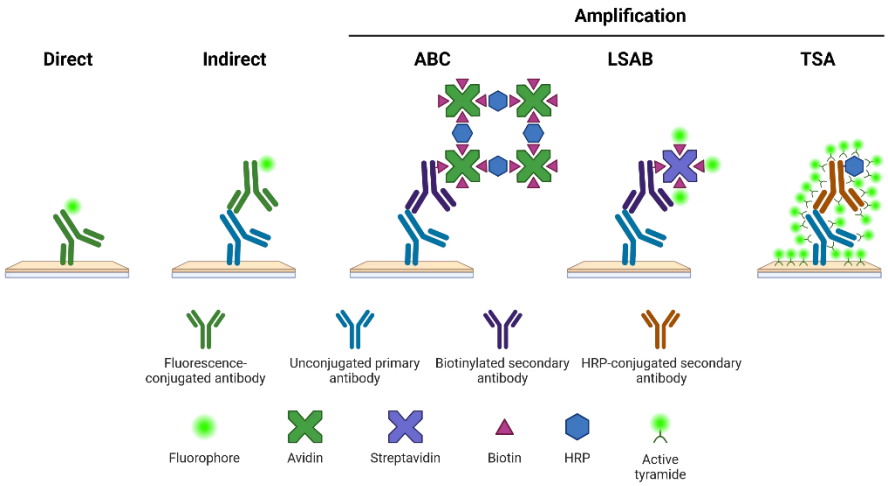


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung verschiedener Methoden zur Zielerkennung. Zu den Amplifikationsmethoden gehören der Avidin-Biotin-Komplex (ABC), markiertes Streptavidin-Biotin (LSAB) und Tyramid-Signalamplifikationssysteme (TSA). Erstellt mit BioRender von antibodies.com.

## 8. Verstärkung

Neben der indirekten Detektion kann die Signalstärke durch zusätzliche Amplifikationsschritte erhöht werden (*Abbildung 1*). Häufig werden dazu Sekundärantikörper mit Biotin verwendet, das von mehreren Avidin- oder Streptavidinmolekülen gebunden wird. Diese tragen wiederum mehrere Fluorophore oder Enzyme, wodurch das Signal eines einzelnen Sekundärantikörpers verstärkt wird.

Eine weitere Verstärkungsmethode ist das Tyramid-Signalverstärkungssystem (TSA), das auf der Enzymaktivität von Meerrettichperoxidase (HRP) beruht. HRP wandelt inaktives, fluoreszenzmarkiertes Tyramid in ein reaktives Radikal um, das an benachbarte Tyrosinreste bindet und so den Bereich um die Antikörperbindungsstelle sichtbar macht.

## 9. Wirtsspezies & Multiplexing

Der Wirt eines Antikörpers bezeichnet die Tierart, in der er erzeugt wurde. Dies ist besonders wichtig für indirekte Nachweismethoden, da Sekundärantikörper gezielt auf die Wirtsart des Primärantikörpers reagieren. Primärantikörper sollten möglichst nicht aus derselben Spezies wie die untersuchte Probe stammen – zum Beispiel Maus-Antikörper auf Mausgewebe –, da sonst Sekundärantikörper (z. B. Ziege-Anti-Maus) nicht nur den Primärantikörper, sondern auch endogene Proteine binden können.

Beim Multiplexing in der IHC müssen Primärantikörper verschiedener Wirtsarten eingesetzt werden, um mehrere Proteine gleichzeitig nachzuweisen (*Abbildung 2*). Sind zwei Primärantikörper derselben Spezies vorhanden, erkennen die Sekundärantikörper beide, was zu Kreuzreaktivität führt und die Visualisierung erschwert. Zusätzlich kann es problematisch werden, wenn Sekundärantikörper andere Sekundärantikörper erkennen, etwa wenn Esel-Antikörper gegen Ziegen sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper aus Ziegen binden.

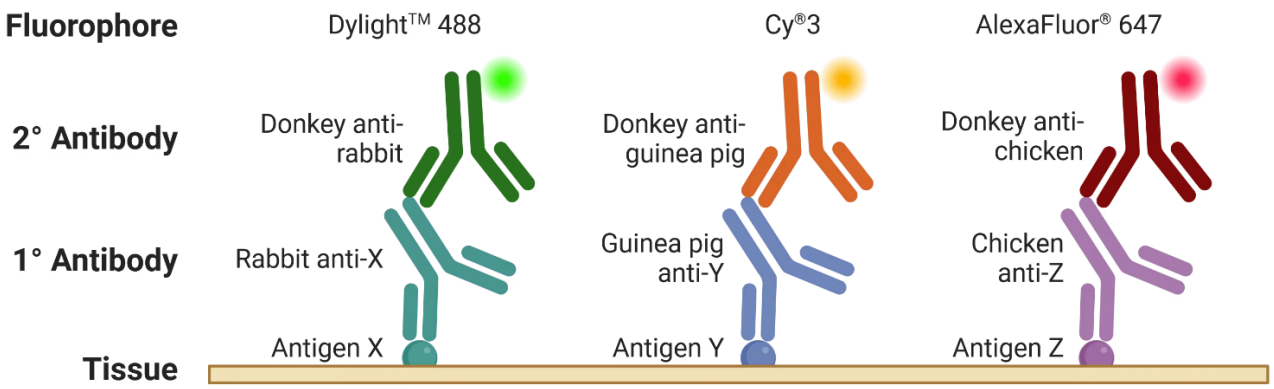


**Abbildung 2: Multiplex-Färbung mit IHC.** Durch die Verwendung von Primärantikörpern verschiedener Spezies können mehrere Antigene gleichzeitig nachgewiesen werden. Sekundärantikörper erkennen dann Primärantikörper einer bestimmten Spezies und können durch Konjugation mit spektral unterschiedlichen Fluorophoren unter einem Fluoreszenzmikroskop aufgelöst werden. Erstellt mit BioRender von antibodies.com.

## 10. Lagerung & Einfrieren

Gelöste Antikörper werden meist auf Eis versandt, lyophilisierte Antikörper können bei Raumtemperatur verschickt und vor Gebrauch in Wasser oder PBS rekonstituiert werden.

Für kurze Lagerung (1–2 Wochen) ist 4 °C ausreichend. Langfristig sollten Antikörper aliquotiert und bei -20 °C oder -80 °C eingefroren werden; frostfreie Gefrierschränke sind zu vermeiden. Aliquots reduzieren Kontamination und Schäden durch wiederholtes Einfrieren. Die Größe sollte dem typischen Experimentbedarf entsprechen, aber nicht unter 10 µl liegen, um Verdunstung zu verhindern.

Konjugierte Antikörper, insbesondere Fluorophor- oder Enzymkonjugate, erfordern besondere Lagerung: lichtempfindliche Fluorophore dunkel aufbewahren; Enzyme möglichst nicht einfrieren, außer das Datenblatt erlaubt -20 °C mit Kryoprotektivum. Sekundärantikörperkonjugate behalten bei 4 °C oft monatelang ihre Aktivität..

## 11. Zusatzstoffe

Antikörper können zur Vermeidung bakterieller Kontamination Natriumazid in einer Endkonzentration von 0,02 % (w/v) enthalten. Im Datenblatt ist angegeben, ob Natriumazid bereits zugesetzt wurde.

Bei der Verwendung mit lebenden Zellen sollte Natriumazid jedoch vermieden werden, da es zelltoxisch ist. Außerdem hemmt Natriumazid die Aktivität von HRP, weshalb es nicht für HRP-konjugierte Antikörper geeignet ist.

Glycerin wirkt als Kryoprotektivum, senkt den Gefrierpunkt auf unter −20 °C und ermöglicht so die Lagerung von Antikörpern im Gefrierschrank ohne tatsächliches Einfrieren. Dadurch bleiben bakterienhemmende Effekte und Aktivität erhalten, während Schäden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermieden werden. Bei −80 °C friert Glycerin jedoch ein, daher sollten Glycerin-Lagerbestände bei −20 °C aufbewahrt werden. Glycerin wird in der Regel auf eine Endkonzentration von 50 % zugesetzt; einige Antikörper sind unter diesen Bedingungen jedoch nicht stabil, daher sollte das Produktdatenblatt konsultiert werden.

## II. Auswahl eines sekundären Antikörpers

Sekundärantikörper sind Immunglobuline, die in der Forschung eingesetzt werden, um an Primärantikörper zu binden, welche spezifische Zielmoleküle erkennen. Meist sind sie mit Fluorophoren oder Enzymen konjugiert, wodurch sie eine hochempfindliche Detektion ermöglichen, die sowohl auf die Spezies als auch auf den Isotyp des Primärantikörpers abgestimmt ist.

Die Wahl des passenden Sekundärantikörpers ist entscheidend für den Erfolg von Experimenten, die den indirekten Nachweis eines Zielantigens erfordern. Dieser Leitfaden fasst die zentralen Eigenschaften und Auswahlkriterien zusammen, die bei der Auswahl eines Sekundärantikörpers berücksichtigt werden sollten.

Unsere Checkliste bietet zudem eine kompakte Übersicht und unterstützt Sie bei der schnellen Auswahl des geeigneten Sekundärantikörpers.

### 1. Definition und Funktion

Sekundärantikörper binden an Primärantikörper, die Zielmoleküle erkennen. Sie sind meist an Fluorophore oder Enzymreporter gekoppelt und ermöglichen eine hochempfindliche Signalverstärkung (***Abbildung 3***) sowie flexible Nutzung in verschiedenen Anwendungen.

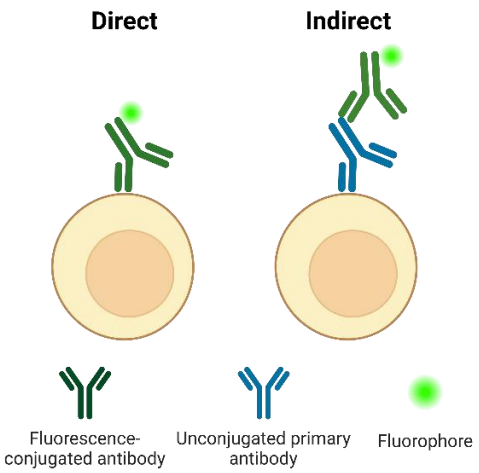


**Abbildung 3:** Antigene können direkt durch konjugierte Primärantikörper oder indirekt durch Sekundärantikörper nachgewiesen werden.

**Vorteile der Verwendung**

- Signalverstärkung: Mehrere Sekundärantikörper pro Primärantikörper erhöhen das Signal.
- Flexibilität: Ein Sekundärantikörper kann viele Primärantikörper desselben Wirts erkennen.
- Erweiterte Konjugatoptionen: Einfacher verfügbare Reporter oder Fluorophore im Vergleich zu Primärantikörpern.
- Anwendungserweiterung: Gleicher Primärantikörper kann in verschiedenen Techniken eingesetzt werden.
- Nachteil: erhöhtes Hintergrundsignal möglich.

## 2. Auswahlkriterien

a. Wirtsspezies des Primärantikörpers

Sekundärantikörper müssen spezifisch für die Wirtsspezies des Primärantikörpers sein.

b. Wirtsspezies des Sekundärantikörpers

Typischerweise aus Ziege oder Esel. Bei Multiplexing auf unterschiedliche Wirte achten, um Kreuzreaktivität zu vermeiden.

c. Isotyp und Format des Primärantikörpers

Sekundärantikörper sind spezifisch für Isotypen (IgG, IgM etc.) und Teile des Antikörpers (H, L oder H+L). Auswahl reduziert Off-Target-Bindung und ermöglicht Multiplexing.

d. Sekundärantikörperformat

- Ganze IgG-Antikörper: hohe Empfindlichkeit, mehr Reporter.
- Fragmente (Fab, $F(ab')_2$): bessere Gewebepenetration, keine Fc-bindenden Off-Target-Effekte.

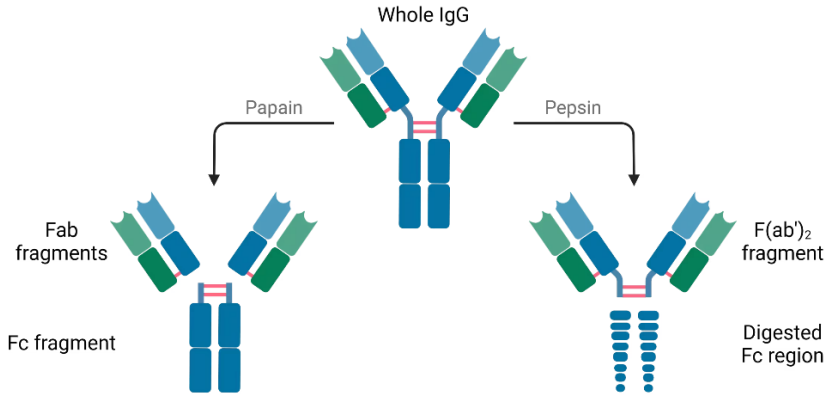


**Abbildung 4:** Durch enzymatische Verdauung mit Papain oder Pepsin erzeugte Antikörperfragmente.

e. Konjugat

- Fluorophore: für Immunfluoreszenz, räumliche Auflösung.
- Enzyme (HRP, AP): für chromogene oder chemilumineszente Nachweise (ELISA, Western Blot, IHC).
- Biotin: für Signalverstärkung via Avidin/Biotin-System.
- Auswahl abhängig von Anwendung, Detektionsmethode, Multiplexing, Amplifikation und Verfügbarkeit.

f. Kreuzadsorption

Reduziert Off-Target-Bindung bei verwandten Spezies oder Multiplex-Experimenten. Einsatz nur bei Bedarf, da leichte Verringerung der Epitoperkennung möglich.

### 3. Multiplexing

Gleichzeitiger Nachweis mehrerer Zielantigene erfordert unterschiedliche Primärantikörper-Wirtsarten, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Sekundärantikörper sollten spektral unterscheidbare Konjugate besitzen (siehe ***Abbildung 2***).

### 4. Checkliste für Sekundärantikörper

- **Wirtsspezies** des Primärantikörpers bestimmen
- **Wirtsspezies** des Sekundärantikörpers wählen
- **Isotyp und Format** des Primärantikörpers bestimmen
- **Sekundärantikörperformat** wählen (IgG, Fab, $F(ab')_2$)
- Geeignetes **Konjugat** auswählen (Fluor, Enzym, Biotin)
- **Kreuzadsorption** prüfen und bei Bedarf einsetzen

### 5. Nomenklatur-Beispiel

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-H&L (HRP), kreuzadsorbiert:

- Ziege: Wirt des Sekundärantikörpers
- Anti-Kaninchen-IgG: Spezies und Isotyp des Primärantikörpers
- H&L: erkennt schwere und leichte Ketten
- HRP: Konjugat
- Kreuzadsorbiert: reduzierte Off-Target-Bindung

## III. Antikörperanwendungen und -validierung

Antikörper sind vielseitige Werkzeuge in der Forschung, mit denen sich zahlreiche Fragestellungen zu Proteinen beantworten lassen, etwa zu deren Häufigkeit, Modifikationen, zellulärem Vorkommen und Interaktionen mit anderen Molekülen. Vor der Verwendung eines Antikörpers muss überprüft werden, ob er spezifisch an sein Zielmolekül bindet, um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten.

1. **Hauptanwendungen von Antikörpern:**

- **ELISA:** um die Menge des Zielantigens in einer flüssigen Probe wie Serum zu erkennen und zu quantifizieren. Die gängigsten ELISA-Formate sind der direkte, indirekte, Sandwich- und kompetitive ELISA. Jedes hat spezifische Vorteile, wobei der Sandwich-ELISA meist die höchste Spezifität erreicht, da zwei komplementäre Antikörper zum Einsatz kommen.
- **Durchflusszytometrie (FACS):** Methode zur Analyse von Zellen oder Partikeln in Suspension, bei der Laserlicht die physikalischen Eigenschaften und Fluoreszenzsignale jeder einzelnen Zelle misst. Antikörper werden dabei verwendet, um spezifische Oberflächen- oder intrazelluläre Proteine zu markieren, oft gekoppelt an Fluorophore. So lassen sich Zelltypen identifizieren, ihre Häufigkeit bestimmen und Merkmale wie Aktivierungsstatus oder Proteinexpression analysieren.
- **Immunhistochemie (IHC), Immunzytochemie (ICC) und Immunfluoreszenz (IF):** Immunhistochemie (IHC) und Immunzytochemie (ICC) nutzen Antikörper, um Proteine in Geweben bzw. Zellen nachzuweisen. Die Detektion erfolgt entweder kolorimetrisch über Enzyme oder als Immunfluoreszenz (IF) über Fluorophore, was Multiplexing erleichtert. Nach Fixierung binden Primärantikörper an das Zielprotein, gefolgt von direkter oder indirekter Visualisierung über Sekundärantikörper. IHC wird häufig in der Pathologie zur Diagnose und Prognose von Krankheiten eingesetzt.
- **Immunpräzipitation (IP) und Co-IP:** Antikörper auf Kügelchen isolieren gezielt Proteine aus komplexen Proben. Co-IP fängt zusätzlich an das Zielprotein gebundene Interaktionspartner ein. Die isolierten Proteine können z. B. mit ELISA, Western Blot oder Massenspektrometrie analysiert werden.
- **Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP):** ChIP isoliert Proteine, die an DNA gebunden sind, um Zielsequenzen und Chromatinstruktur zu analysieren. RIP untersucht statt DNA Protein-RNA-Interaktionen.
- **Western Blot:** Technik zum Nachweis spezifischer Proteine, die zuvor nach Größe durch SDS-PAGE getrennt wurden. Nach der Proteintrennung werden sie auf eine Membran übertragen und mit Antikörpern detektiert, um Menge, Molekulargewicht und mögliche posttranslationale Modifikationen zu analysieren.

2. **Antikörperspezifität und Validierung:**

Antikörper binden normalerweise hochspezifisch an ihr Ziel, können aber bei ähnlichen Epitopen auch Off-Target-Proteine erkennen. Daher ist die Validierung der Antikörperspezifität entscheidend, um zuverlässige und präzise Forschungsergebnisse zu gewährleisten.

- **Knockout (KO)-Validierung:** Goldstandard zur Überprüfung der Antikörperspezifität. Dabei wird das Zielprotein in Wildtyp-Proben mit genetisch modifizierten KO-Proben verglichen. Ein hochspezifischer Antikörper zeigt im KO-Zustand kein Signal; ein Signal weist auf unspezifische Bindung hin. KO-Zellen oder -Organismen lassen sich mittels Techniken wie homologer Rekombination, TALENs oder CRISPR-Cas9 erzeugen. KO-Validierungen erfolgen meist durch ICC oder Western Blot.
- **Protein-Array-Validierung:** Genomweite Protein-Arrays prüfen die Spezifität von Antikörpern gegenüber über 19.000 Proteinen und erkennen sowohl Ziel- als auch Off-Target-Bindungen. Dabei werden Proteine auf ein Array aufgetragen, mit dem Antikörper inkubiert und anschließend durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper visualisiert. Die Signalstärke zeigt die Bindungsstärke an.
- **Biophysikalische Validierung:** Biophysikalische Validierung gewährleistet Reinheit und Spezifität von Antikörpern. Neben klassischen SDS-PAGE-Analysen wird dafür häufig SEC-HPLC eingesetzt, die Aggregationen sichtbar macht und quantifiziert. Alle Biosimilar-Antikörper von Antibodies.com werden mittels SEC-HPLC und Funktionstests geprüft.
- **Weitere Methoden:** Orthogonale Validierung, unabhängige Antikörpervalidierung, markierte Proteinexpression und Immunocapture-Massenspektrometrie (IMS).

3. **Kontrollen:**

- **Positive Kontrolle:** Probe mit starker Zielmolekül-Expression; Antikörper sollte ein starkes Signal zeigen.
- **Negative Kontrolle:** Probe ohne Zielmolekül; Antikörper sollte kein Signal erzeugen.
- Technikspezifische Kontrollen und alternative Ansätze wie Knockdown oder Überexpression können zusätzliche Sicherheit bieten.

## Abbildungsverzeichnis

**ABBILDUNG 1:** SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VERSCHIEDENER METHODEN ZUR ZIELERKENNUNG.. 2

**ABBILDUNG 2:** MULTIPLEX-FÄRBUNG MIT IHC. 3

**ABBILDUNG 3:** ANTIGENE KÖNNEN DIREKT DURCH KONJUGIERTE PRIMÄRANTIKÖRPER ODER INDIREKT DURCH SEKUNDÄRANTIKÖRPER NACHGEWIESEN WERDEN. 5

**ABBILDUNG 4:** DURCH ENZYMATISCHE VERDAUUNG MIT PAPAIN ODER PEPSIN ERZEUGTE ANTIKÖRPERFRAGMENTE. 6

## Referenzen

Hamnett, R. (30. September 2024). *Antibody Applications and Validation*. Von antibodies.com: https://www.antibodies.com/antibody-basics/applications-validation abgerufen

Hamnett, R. (21. September 2024). *How to Choose a Secondary Antibody*. Von antibodies.com: https://www.antibodies.com/antibody-basics/secondary-antibody-selection abgerufen

Hamnett, R. (30. September 2024). *How to Choose and Use an Antibody*. Von antibodies.com: https://www.antibodies.com/antibody-basics/how-to-choose-and-use-an-antibody abgerufen

e.c. 09/2025