

abcam

使用Abcam的Alexa Fluor<sup>®</sup>荧光二抗  
细胞多重染色从未有如此容易



验正品 询技术 学实验  
查物流 抢促销 扫一扫

## 关于Abcam的Alexa Fluor®偶联二抗

我们的高性能Alexa Fluor®偶联二抗经过严苛的检测，以确保高亮度和低背景的染色。

“在红色区域的光谱位置与其他蓝色荧光基团组成了完美的双染组合……，它在经受6个月的冰箱储存后仍能给出良好信号”

特点	好处
亮度最强	与其它光谱类似的荧光染料相比，Alexa Fluor®染料的荧光强度最强。
更好的光稳定性	更好的光稳定性留给拍照更长的时间。
酸碱敏感度	Alexa Fluor®能在广泛的pH范围内保持较高的荧光强度。
水溶性好	好的水溶性能防止Alexa Fluor®偶联二抗沉淀和凝聚。

### 性能

- 在我们自己的实验室中内部生产，确保质量和批次间稳定性。
- Alexa Fluor®偶联物的激发光波长与常规激发光源的波长一致。
- 平均每个二抗分子上结合的荧光分子数目经过优化，以降低光漂白并保证染色亮度。同时每个偶联二抗都会通过过柱分选的步骤来去除未结合染料以确保最低的染色背景。

### 偶联

- 我们目前提供9种Alexa Fluor®染料，覆盖了从紫外到远红外的全波段。
- 我们有大量的二抗使用了Alexa Fluor®偶联，这些二抗来源于驴、山羊、兔等多种物种。
- 这些二抗中有很多经过了预吸附处理，以降低物种间交叉反应，从而作为多色分析的理想选择。

### 验证

- 我们的Alexa Fluor®偶联二抗经过了广泛的应用验证，包括免疫荧光/免疫细胞化学、荧光免疫印迹和流式细胞技术。

## 示例 细胞成像

图像由UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School的Shaohua Li博士提供

### 荧光免疫印迹

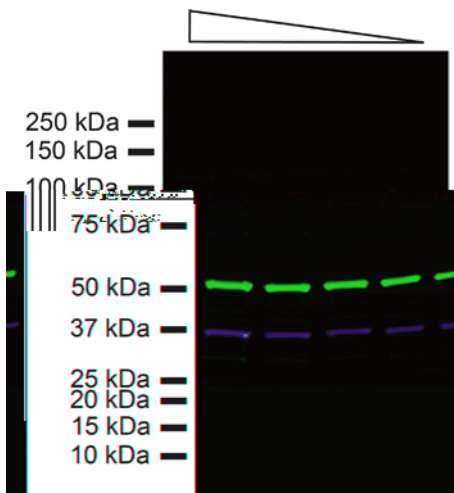


Image: copyright © 2014 Abcam plc

### 流式细胞结果

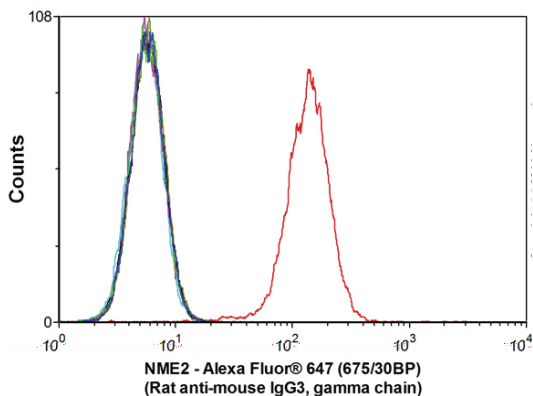


Image: copyright © 2014 Abcam plc

### 示例

小鼠胚胎干细胞分化形成的拟胚体 (EB)。

#### 绿色

一抗是兔抗层粘连蛋白，二抗是预吸附的Alexa Fluor® 488偶联山羊抗兔IgG - H&L ( ab150081 )。

#### 红色

一抗是小鼠抗disabled 2，二抗是预吸附的Alexa Fluor® 594偶联山羊抗小鼠IgG - H&L ( ab150120 )。

#### 蓝色

DAPI复染的细胞核。

### 示例

Hela细胞提取物。1到5道是细胞总蛋白量，从25µg, 20µg, 15µg, 10µg 到 7µg递减。

#### 红色

α微管蛋白 (一抗ab18251+ Alexa Fluor® 680偶联羊抗兔二抗ab175773)。

#### 绿色

GAPDH (一抗ab83956 + Alexa Fluor® 790偶联羊抗鸡二抗ab175787)。

### 简述

叠加图显示大鼠抗小鼠IgG3 γ链二抗的亚类特异性。Alexa Fluor 647偶联二抗 (ab172329)只特异性地识别小鼠 IgG3一抗 (红色)，但不识别其它小鼠IgG亚型如IgG1 (黑色)、IgG2a (绿色)、IgG2b (粉色)和IgM (浅蓝)。

## Abcam的Alexa Fluor®二抗

Target antibody	Host	Pre-adsorbed (cross-adsorbed) *	Alexa Fluor	Alexa Fluor	Alexa Fluor	Alexa Fluor	Alexa Fluor	Alexa Fluor	Alexa Fluor	Alexa Fluor	Alexa Fluor
			405	488	555	568	594	647	680	750	790
Rabbit IgG H&L	Donkey		ab175651	ab150073	ab150074	ab175470	ab150076	ab150075	ab175772	ab175731	ab175780
			ab175648	ab150061	ab150062	ab175692	ab150064	ab150063	ab186692	ab175728	ab186693
				ab150065	ab150066	ab175693	ab150068	ab150067		ab175729	
	Donkey F(ab') <sub>2</sub>				ab175694					ab175730	
	Goat		ab175652	ab150077	ab150078	ab175471	ab150080	ab150079	ab175773	ab175732	ab175781
			ab175653	ab150081	ab150082	ab175695	ab150084	ab150083	ab186696	ab175733	ab186697
		ab175654	ab150085	ab150086	ab175696	ab150088	ab150087		ab175734		
Rabbit IgG Fc	Goat		ab175655	ab150089	ab150090	ab175697	ab150092	ab150091		ab175735	
		ab175656	ab150097	ab150098	ab175698	ab150100	ab150099		ab175736		
Rabbit IgM	Goat			ab150093				ab150095			
Mouse IgG H&L	Donkey		ab175658	ab150105	ab150106	ab175472	ab150108	ab150107	ab175774	ab175738	ab175782
				ab150109	ab150110	ab175700	ab150112	ab150111	ab186698	ab175739	ab186699
	Donkey F(ab') <sub>2</sub>				ab175699				ab175737		
	Goat		ab175660	ab150113	ab150114	ab175473	ab150116	ab150115	ab175775	ab175740	ab175783
			ab175661	ab150117	ab150118	ab175701	ab150120	ab150119	ab186694	ab175741	ab186695
	Rabbit			ab150125	ab150126	ab175703	ab150128	ab150127	ab186701	ab175743	ab186702
	Rabbit F(ab') <sub>2</sub>			ab169345				ab169348		ab175762	
Mouse IgM Mu	Goat		ab175662	ab150121		ab175702		ab150123		ab175742	
Rat IgG H&L	Donkey		ab175670	ab150153	ab150154	ab175475	ab150156	ab150155	ab175777	ab175750	ab175785
	Donkey F(ab') <sub>2</sub>			ab150149	ab150150	ab175708		ab150151		ab175749	
	Goat		ab175671	ab150157	ab150158	ab175476	ab150160	ab150159	ab175778	ab175751	ab175786
			ab175673	ab150165	ab150166	ab175710	ab150168	ab150167		ab175753	
	Goat F(ab') <sub>2</sub>									ab175752	
	Rabbit F(ab') <sub>2</sub>			ab169346		ab175719		ab169349		ab175763	
Rat IgG Fc	Goat F(ab') <sub>2</sub>		ab150161			ab150164	ab150163				
Goat IgG H&L	Donkey		ab175664	ab150129	ab150130	ab175474	ab150132	ab150131	ab175776	ab175744	ab175784
				ab150133	ab150134	ab175704	ab150136	ab150135		ab175745	
	Donkey F(ab') <sub>2</sub>			ab150137		ab175705	ab150140	ab150139		ab175746	
	Rabbit			ab150141	ab150142		ab150144	ab150143		ab175747	
				ab150145	ab150146	ab175707	ab150148	ab150147		ab175748	
Rabbit F(ab') <sub>2</sub>			ab169344				ab169347		ab175761		
Chicken IgY H&L	Goat		ab175674	ab150169	ab150170	ab175477	ab150172	ab150171	ab175779	ab175754	ab175787
			ab175675	ab150173	ab150174	ab175711	ab150176	ab150175		ab175755	
Sheep IgG H&L	Donkey		ab175676	ab150177	ab150178	ab175712	ab150180	ab150179		ab175756	
	Rabbit			ab150181	ab150182	ab175713	ab150184	ab150183		ab175757	
Guinea pig IgG H&L	Goat			ab150185	ab150186	ab175714	ab150188	ab150187		ab175758	
Armenian Hamster IgG H&L	Goat			ab173003				ab173004		ab175760	
Human IgM	Rabbit			ab150189				ab150191			

\* 多重染色实验中，如果几种不同的一抗以及对应的二抗同时使用，预吸附的二抗便是理想之选。预吸附步骤减少了二抗和细胞组织内源性免疫球蛋白的交叉反应风险。

## Alexa Fluor® 二抗选择指南

我们的指南将帮助您选出最适合您的应用的二抗。

### 一抗的宿主物种

二抗是针对产生一抗的宿主物种而开发的。比如，如果你使用来源于兔的一抗，就需要使用抗兔的二抗，这个抗兔的二抗需要产生于兔之外的物种（比如驴抗兔二抗）。

### 类/亚类

二抗是针对一抗特定的同种型的。多克隆一抗主要产生于兔、山羊、绵羊和驴，同种型主要是IgG。所以二抗通常是抗IgG H&L (重链和轻链)的抗体。

单克隆一抗通常产生于小鼠、兔子和大鼠。比如，单克隆一抗是小鼠IgG1，就需要使用抗小鼠IgG的二抗或者特异性次之的抗小鼠IgG的F(ab)片段化二抗。

### 人免疫球蛋白的类、亚类、型及亚型

- 类或者同种型：IgG ( $\gamma$  重链), IgM ( $\mu$ ), IgA ( $\alpha$ ), IgE ( $\epsilon$ ), IgD ( $\delta$ )。
- 亚类：IgG1 ( $\gamma$ 1 重链), IgG2 ( $\gamma$ 2), IgG3 ( $\gamma$ 3), IgG4 ( $\gamma$ 4); IgA1 ( $\alpha$ 1), IgA2 ( $\alpha$ 2)。
- 型： $\kappa$ 轻链,  $\lambda$ 轻链。
- 亚型： $\lambda$ 1,  $\lambda$ 2,  $\lambda$ 3,  $\lambda$ 4。

### 其它类型的反应

- 多价二抗识别所有类的一抗。
- 抗Fc或者重链( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , 以及  $\mu$ ) 的二抗只识别重链。
- 抗F(ab)或整个分子的二抗识别重链和轻链而不依赖于抗体类。
- 抗轻链 ( $\kappa$ 和 $\lambda$ ) 的二抗识别所有类的抗体，因为所有的类使用同样的 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链。

### 预吸附二抗是消除物种交叉反应的理想选择

预吸附（也被称为交叉吸附）是用以提高抗体特异性的进一步处理方法。比如有一个二抗混合物含有抗兔IgG轻链二抗、抗绵羊IgG轻链二抗和抗牛IgG轻链二抗，可以先在基质上包被可能产生交叉反应的物种的血清蛋白（这个例子中是绵羊和牛的轻链）。当二抗混合物通过这样的吸附柱时，与羊和牛的IgG轻链起交叉反应的二抗就会结合并滞留在基质上，只专一识别兔IgG轻链的二抗才能穿过吸附柱。通过这一步骤，所产生的二抗仅特异性地识别兔IgG轻链，从而降低了物种交叉反应。

## F(ab) 或(Fab')<sub>2</sub>片段化二抗

F(ab) 和(Fab')<sub>2</sub>片段化二抗消除了二抗Fc部位与部分细胞上的Fc受体之间的非特异性结合，这类细胞有诸如巨噬细胞、树突状细胞、中粒性细胞、自然杀伤细胞和B细胞。由于分子更小，这样的二抗更容易更有效地穿透进入组织中。因为没有Fc部位，片段化二抗不会干扰通过抗Fc调控的抗体识别。

## Alexa Fluor®偶联的荧光二抗- 常见问题

为了让客户更方便地使用我们的Alexa Fluor®荧光二抗，我们与Brendan Collins (Abcam 技术支持代表)讨论了大家常问的问题。下面是我们总结的常见问题部分。

### 抗体应该在什么温度下储存？

4°C 存储不应超过1-2周。收到货后应该将抗体管子短暂离心使抗体溶液汇聚到管底，同时将二抗溶液分装。分装后的抗体应储存在-20°C 或 -80°C。

### 为什么要分装二抗？

分装能将污染的可能性最小化，并避免反复冻融造成的衰减。由于原装浓度可能会因为挥发和抗体被管壁吸附而受影响，所以尽量避免分装成10微升以下的体积。

### 什么样的管子推荐用于抗体存储？

分装应储存在避光低吸附管子。长时间暴露在光线下会因为荧光素的光漂白而有损抗体活性。

### 抗体可以稀释保存吗？

抗体如果稀释最好用原装的缓冲液(0.02% 叠氮钠, 1% BSA, 30% glycerol, PBS)，另外也可以用PBS。但推荐将抗体储存在较高的浓度，因为过度稀释可能会影响稳定性。

### 什么样的封闭液适合抗体？

产品说明书给出了最适合您实验的的封闭液。封闭液需要每次使用前新鲜制备。下表给出了典型应用的常用封闭液。

应用	封闭液*
荧光免疫印迹	5% BSA 或5% 脱脂奶粉
免疫荧光/免疫细胞化学 ( IF/ICC )	10%的血清，来源于产生二抗的物种。另外也可用1% BSA或者 1% 明胶。
流式细胞技术	0.5 - 1% BSA 或5 - 10% 胎牛血清。

\*添加抗体前封闭试剂需要完全溶解。没有溶解的封闭试剂可能会在实验中造成假象。

### 样品孵育中抗体需要在什么溶液中稀释？

用封闭液稀释用于样品孵育的抗体能够降低背景。样本也可以孵育在不含封闭试剂的抗体溶液中，比如TBST (添加 Tween® 20的Tris盐溶液)。虽然结果可能会有所不同，但如果背景不是问题，建议建议用含低浓度封闭试剂的缓冲液稀释抗体。

### 样本的二抗孵育需要多长时间？

孵育时间主要看待测蛋白表达量。总的来说免疫印迹和免疫荧光/免疫细胞化学只需要一小时的孵育就可以有效检测。

### 样本在孵育期间暴露在光线下会影响结果吗？

使用Alexa Fluor®偶联二抗时样本应该保持避光。过多暴露在光线下可能会引起荧光染料光漂白，从而影响偶联二抗的性能。

### 样本和二抗的孵育应该在什么温度下进行？

样本与Alexa Fluor®偶联二抗的孵育温度主要看孵育时间。一小时孵育室温合适，过夜孵育最好在4°C进行。

### 抗体的稀释度多少合适？

检测时抗体稀释度依赖于应用、实验条件和特定目标蛋白。合适的二抗起始浓度是一抗的十分之一。但是最好通过系列稀释作出滴定曲线来确定最佳稀释度。滴定要模拟要做的实验。

### 怎样降低背景？

与其它荧光染料比，Alexa Fluor®偶联二抗的荧光强度提供更强的信号放大。样本孵育中二抗通常用封闭缓冲液稀释以降低背景。使用合适的二抗稀释度也会对降低背景有帮助。孵育之后一定要充分洗涤样本。需要提醒的是长时间比如过夜孵育可能会增加背景。

### 二抗溶液能重复用吗？

如果需要达到最佳效果，不推荐重复使用Alexa Fluor®偶联二抗。如果要用重复使用二抗溶液，由于每次使用后有效浓度降低，需要增加新鲜二抗。

### 使用什么作为阴性对照？

样本只加二抗（不加一抗）可以作为检测二抗非特异性吸的阴性对照。

### Alexa Fluor®偶联二抗可以用于多重染色吗？

我们的Alexa Fluor®偶联二抗是多重标记的理想选择。其经过严苛的测试以确保高特异性和灵敏度。我们广泛的Alexa Fluor®偶联二抗识别诸多物种，可以用于标记多重抗原。下面的表格说明了我们目前的Alexa Fluor®偶联二抗及其特性。

Alexa Fluor®	溶液颜色*	最强激发光(nm)	最强发射光 (nm)	发射光颜色**	匹配染料
405	colorless	402	421	blue	Cascade Blue
488	yellow	495	519	greenCy2,	FITC (fluorescein)
555	pink	555	565	orange	Cy3, TRITC (rhodamine)
568	violet	578	603	orange/red	Rhodamine red
594	purple	590	617	red	Texas red
647	blue	650	668	far red	APC, Cy5
680	blue	679	702	near-IR***	Cy5.5, IR680
750	cyan	749	775	near-IR***	Cy7
790	cyan	784	814	near-IR***	IR800

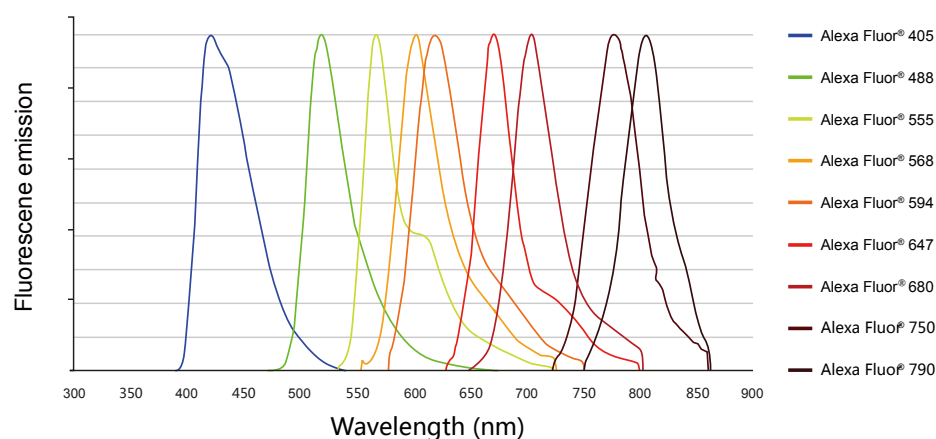
\*试管中溶液外观颜色。

\*\* 通过配置了合适滤光片的常规荧光显微镜看到的典型发射光颜色。

\*\*\*近红外荧光染料发出的光不能被观察到，因为肉眼看不到波长超过大约650nm的光。

### 哪些Alexa Fluor®偶联二抗适合做多重染色？

设计多重标记实验时，重要的一点是使用的Alexa Fluor®偶联二抗的发射光波长有显著差别（至少差40nm）。下图显示了目前我们提供的每一个产品的发射光谱。



如果要达到理想的效果，尽量使用没有波长重叠的Alexa Fluor®偶联二抗。下表是双染和三染的常见组合。

免疫染色	抗体组合
双染	Alexa Fluor®488 和 Alexa Fluor®647
三染	Alexa Fluor®405、Alexa Fluor®555 和 Alexa Fluor®647