

# 創世紀季刊

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA 簡介.....	2
ELISA 的製備及分析流程 .....	4
如何最佳化 ELISA 條件? .....	5
Plate Coating Buffers .....	6
Blocking Buffers .....	6
Conjugate Stabilizer Diluents .....	7
Assay Diluents .....	8
Sample Diluents .....	9
Substrates for ELISA and Immunoblotting .....	10
Stop Solutions for Substrates .....	11
Substrates for ELISA and Immunoblotting.....	11
HRP-Conjugated Secondary Antibodies .....	11
ELISA Wash Buffer .....	11
ELISA Development Template Kits.....	12
Conjugation-Ready HRP Maleimide .....	13
Rapid Test Mouse Monoclonal Isotyping Kit.....	13
抗體的最強競爭對手 — Aptamer 簡介.....	14
AptoCyto™ Flow Cytometry Aptamers.....	18
AptoPrep™ Proteins Precipitation Kit .....	19
AptoPrep™ Cell Isolation Kit.....	20

創世紀生技有限公司

服務信箱 [service@biogenesis.com.tw](mailto:service@biogenesis.com.tw) 服務專線 0800-211-667

台北 02-26558877 竹南 037-687493 台中 04-22602466

高雄 07-3105441 花蓮 03-8463953

<http://www.biogenesis.com.tw>

# Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

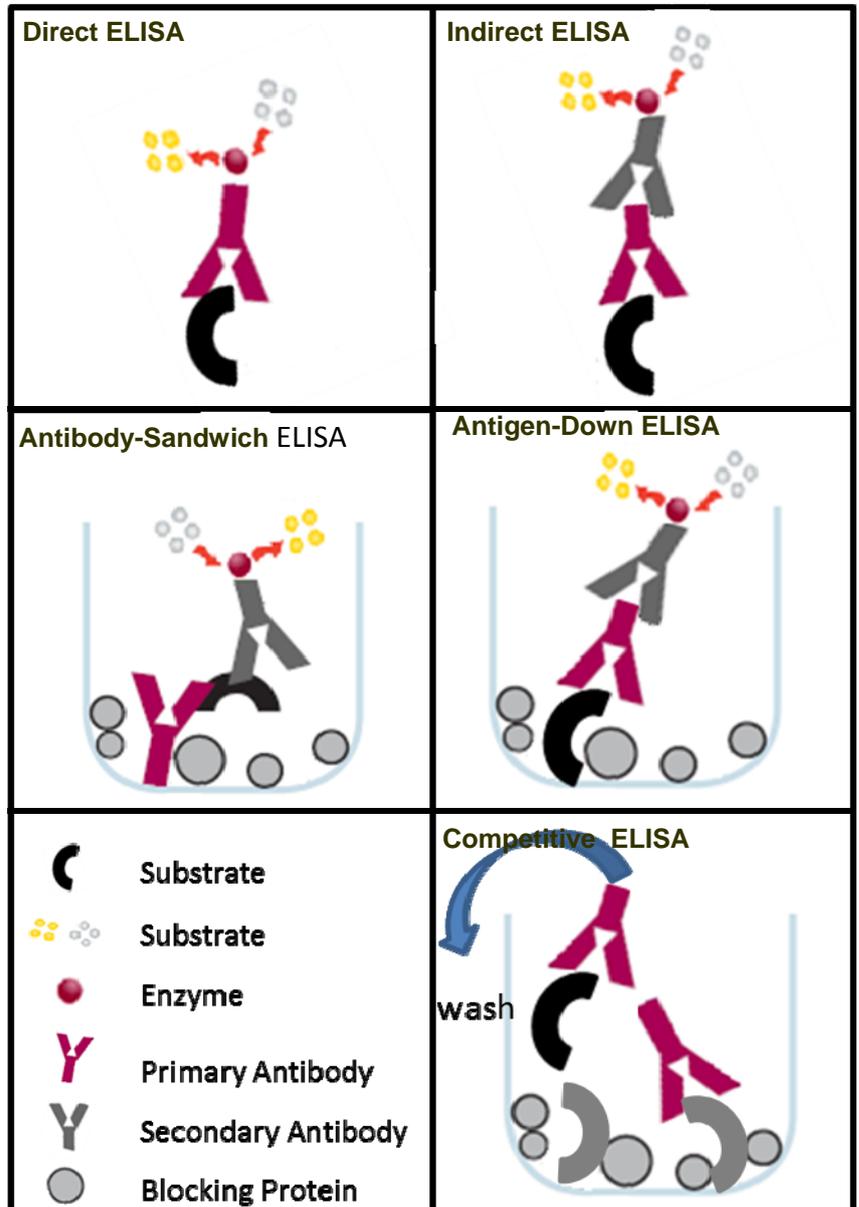
## ELISA 簡介

**ELISA** 原理為利用抗體與抗原之間的高度專一性來做為定量標記的方法，搭配特定酵素連結到抗體上，用酵素活性來做為定量標記。自在 1971 年首次由 Engvall 和 Perlman 所發表至今，以其不論是測抗原或抗體都有很高的敏感性及專一性，並且安全又穩定，仍廣為應用於基礎研究，產業界的各種檢驗及醫療檢驗上。

ELISA 依呈色抗體分為以酵素標定 primary antibody 直接呈色的 Direct ELISA 及以酵素標定 secondary antibody 結合 primary antibody 間接呈色的 Indirect ELISA，兩者優缺點比較如表。Direct ELISA 的優點是快速且訊號專一性高，缺點包括 Primary antibody 的效力可能因標定物有所影響，需針對個別 primary antibody 進行標定，訊號強度難放大。Indirect ELISA 的優點包括：有許多以商品化的 secondary antibody 可供選擇，可以靈活搭配只要 primary antibody 及 secondary antibody 免疫自不同物種，primary antibody 沒有任何修飾可以維持最佳的效力，

primary antibody 有一個以上的 epitope 供 secondary 辨認，訊號得以放大靈敏度較高，一種 primary 可以搭配不同標定的 secondary antibody 可以有各種呈色方式。

常見的 ELISA 依檢測標的為抗原或抗體有 Antibody-Sandwich ELISA 及 Antigen-Down ELISA，Antibody-Sandwich ELISA (Figure 1) 可用於偵測分泌性的產物如細胞激素 (cytokines)。此種方法是將專一性的抗體結合在 96-well plate 內，這些專一性抗體對抗原具有極高的親和性，因此即使最初的混合物中抗原的濃度很低，也能將其集中於 plate 表面，再加入另一組能辨認異於固定相的抗體辨認 epitope 的標記抗體來偵測所結合的抗原。



而 Antigen-Direct ELISA (Figure 2) 是將抗原結合在 96-well plate 內，使樣品血清中的抗體(例如 human IgE)結合至盤底的抗原，再加上帶有酵素(例如 HRP)的物種專一性的抗體(例如 goat IgG anti-human IgE)，使之結合在固定於盤內的待測抗體，呈色愈強，代表樣品中的抗體愈多。常用在診斷病人對特定過敏原的反應，或是疫苗接種後代表免疫效果的抗體力價。

當待測抗原分子較小，無法製備兩種不同的 primary antibody 來建構 Antibody-Sandwich ELISA 時，可改用 Competitive ELISA (c ELISA) 方法是利用標記的參考抗原和未知樣品內的特定抗原互相競爭與吸附在塑膠孔內的 primary antibody 的結合位置。在 competitive ELISA 中，固定濃度的酵素標定的抗原會與待測蛋白共同競爭 primary antibody 的結合位置，當樣品中待測蛋白越多，則愈少酵素標定的抗原可被 primary antibody 固定於盤底，使最後呈色時產生愈少的訊號。因此 competitive ELISA 的訊號強度會與待測物的濃度成反比。

<b>Direct ELISA Detection</b>	
<b>優點</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 快速：因為只使用一種抗體</li> <li>● 沒有因secondary antibody 引起的Cross-reaction</li> </ul>
<b>缺點</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Primary antibody 的效力可能因標定物(如 HRP 等)有所影響</li> <li>● 針對個別 primary antibody 進行標定耗費時間及成本</li> <li>● 訊號強度難放大</li> </ul>
<b>Indirect ELISA Detection</b>	
<b>優點</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 有許多以商品化的secondary antibody 可供選擇</li> <li>● 可以靈活搭配只要primary antibody 及secondary antibody 免疫自不同物種</li> <li>● 因為primary antibody 沒有任何修飾，可以維持最佳的效力</li> <li>● 靈敏度較高：因primary antibody 有一個以上的 epitope 供secondary 辨認，訊號得以放大</li> <li>● 一種primary 可以搭配不同標定的secondary antibody 可以有多种呈色方式</li> </ul>
<b>缺點</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● secondary antibody 可能引起的 Cross-reaction, 以致產生非專一性訊號</li> <li>● 操作程序較多</li> </ul>

# ELISA 的製備及分析流程

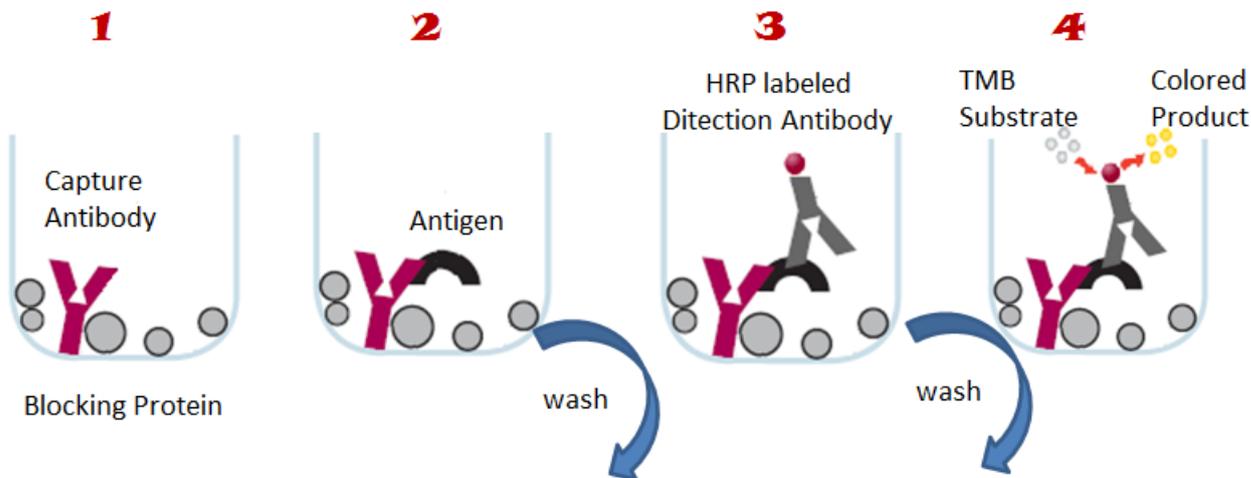
各種 ELISA 的製備步驟不外乎

- plate coating
- Microtiter plate blocking
- sample and conjugate dilution
- plate washing between incubation steps
- 呈色



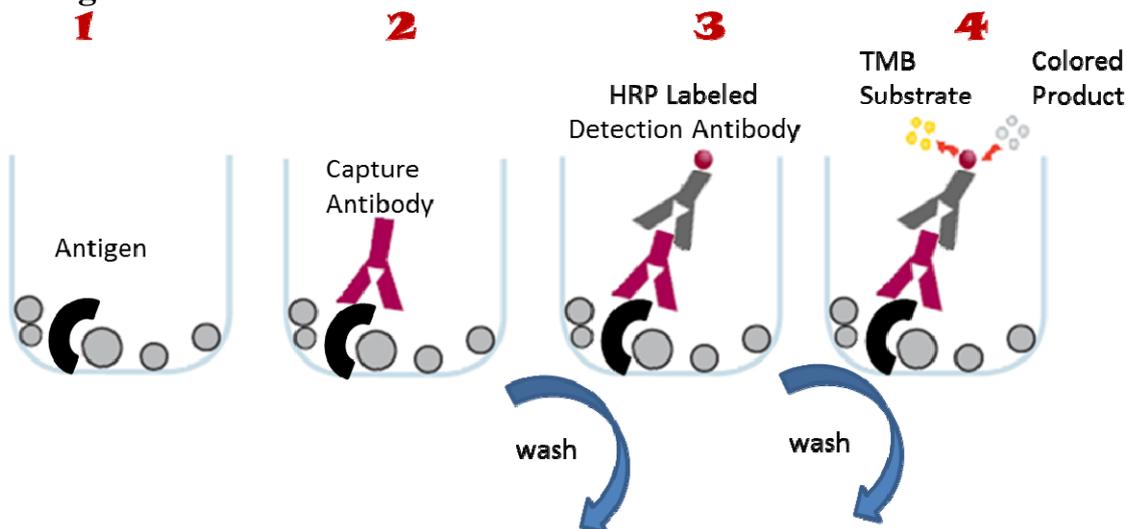
圖 A 與圖 B 分別為常見的 **Antibody-Sandwich ELISA** 及 **Antigen-Down ELISA** 的流程：

## (A) Antibody-Sandwich ELISA

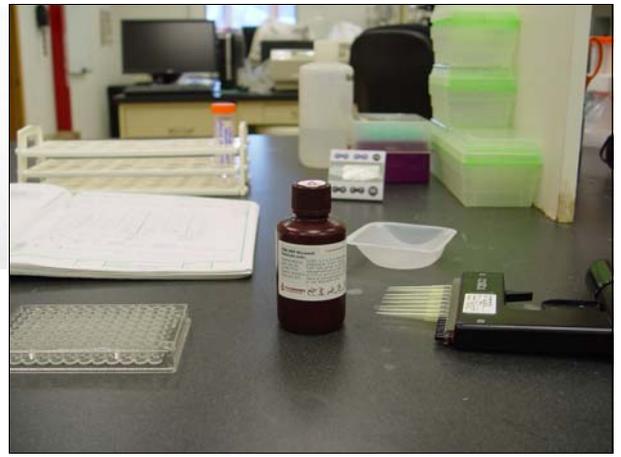


1. 將 Capture Antibody coat 在盤底，並以 block reagent 使盤底佔滿未結合蛋白的部分
2. 加入 Antigen 使其被 Capture Antibody 固著於盤底，並洗去未結合的 Antigen
3. 加 HRP labeled Detection Antibody (direct or un direct)，並洗去未結合的抗體
4. 加入 TMP 使其與 HRP 反應並呈色

## (B) Antigen-Down ELISA



1. 將 Antigen coat 在盤底，並以 block reagent 使盤底佔滿未結合蛋白的部分，
2. 加入待測血清使其與 Antigen 結合，並洗去未結合的抗體
3. 加入 HRP labeled Detection Antibody 使其與能辨認抗原的待測抗體結合，並洗去未結合的抗體
4. 加入 TMP 使其與 HRP 反應並呈色



## 如何最佳化 ELISA 條件？

**ImmunoChemistry Technologies, ICT, 20 年的 solution 專家的方案包括：**

**減**低背景值並且增加訊號/雜訊比值來增進靈敏度。ICT 針對 ELISA 各步驟量身定做各種相關試劑及 buffer，使各步包括 ELISA well blocking, sample and conjugate dilution, plate washing, 都能增進訊號並且將雜訊降至最低進而提升靈敏度。

**增**進精準度並且減少不同盤間的差異。使用 ICT 的 protein stabilizing buffers, 96-well 分析盤並選定批號, 可使相當長的保存期間內仍保持分析的一致性及盤與盤間的精確度。

**提**高分析的再現性使用固定可靠的試劑來源能使您的免疫反應或 ELISA 再現性更高。

**使**專一訊號更強 對於特定 sample 使用特別的 blocking and stabilizer 配方減低非專一性的訊號。

**穩**定蛋白上的標定物 藉著使用 ICT 的 alkaline phosphatase 及 horseradish peroxidase conjugate stabilizers 可穩定蛋白上的標的物。

**加**長保存期限 藉著使用 ICT 的 coating and blocking buffers 穩定所吸附蛋白, 增長製備好的免疫分析盤的保存期限。使用 ICT 的 immunoassay reagents, ELISA buffers, 及 diluents 依不同蛋白的性質而定, 可以使製備好的免疫分析盤於室溫或 2°-8°C 保存下, 達到幾個月至幾年不等的效期。

**ImmunoChemistry Technologies (ICT)** 1994 年成立於美國明尼蘇達州, 以其堅強的免疫化學及螢光分析技術提供高品質的生物醫學實驗試劑, 除了 ELISA 相關緩衝液外, ICT 研發的細胞內部螢光分析試劑與動物體內完整細胞分析套組可以用在各種階段性的病理分析, 包括細胞凋亡 (apoptosis)、細胞壞死 (necrosis)、細胞毒殺 (cytotoxicity)、氧化壓力 (oxidative stress)、癌症 (cancer)、和神經退化性疾病 (neurodegeneration) 等。至今產品行銷於二十多個國家。

# Plate Coating Buffers

穩定coating 於盤中的蛋白並增進專一性訊號強度

製備ELISA 的第一步是將抗體或抗原穩定地coating 在免疫分析盤底, ICT 針對coating 抗體及抗原分別提供特別的兩種配方配方。

## Antibody Plate Coating Buffer 5x (CB1)

Cat. #6245 (25mL), #644 (100mL), #645 (500mL), #646 (1L), #658 (10L)

## Antigen Plate Coating Buffer 5x (CB2)

Cat. #6246 (25 mL), #6247 (100 mL), #6248 (500 mL), #6249 (1-L), #6250 (10-L)

這兩種 ELISA plate coating buffers 藉著穩定coated protein 的 3D 結構, 保留antigen-recognition regions, 使其與待測分子的結合反應更好, 進而增進專一性訊號強度。

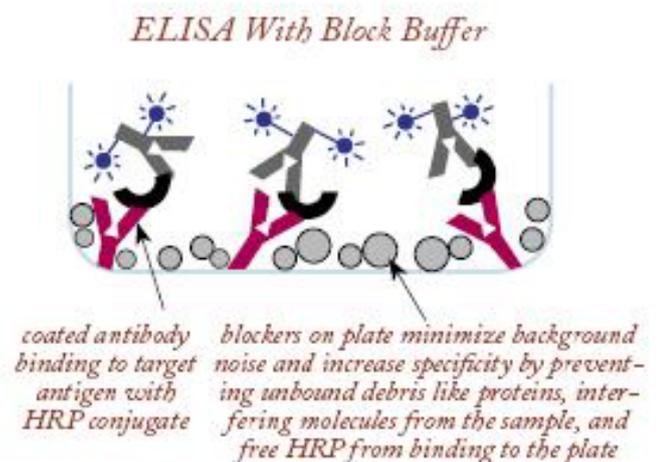
- 節省試劑
- 增進專一性訊號
- 延長coated plates 的效期

## Blocking Buffers

有效地 blocking 分析盤, 減低背景雜訊, 同時穩定 coated protein

- 防止非專一性的結合
- 減少 ELISA 背景訊號
- 防止對吸附於免疫分析盤的蛋白產生的非專一性結合
- 穩定吸附於免疫分析盤的蛋白, 增進後續的結合

針對不同條件, ICT 提供了六種配方的 ELISA Blocking Buffers 供客戶選擇, 您也可選購 Blocking Buffer Optimization Pack 一次測試三種條件, 詳細資訊見右表:



品名	特色說明	貨號
General Blocker Blocking Buffer (BB1)	帶有 mammalian protein blocking agent 適合大多數的 ELISA assay	100mL #632 500mL #633 1L #640 10L #659
Neptune Block Blocking Buffer (BB2)	使用 non-mammalian protein blocking molecules, 複合配方, 可 block 盤中更小的空缺 Ready to use	100mL #62 500mL #63 1L #64 10L #660
SynBlock Blocking Buffer (BB3)	完全的合成配方, protein-free, 可穩定乾燥狀態的 ELISA assay 長達 18 個月	100mL #641 500mL #642 1L #643 10L #661
BB4 Phosph-Free Blocking Buffer	適用於超高靈敏度, alkaline phosphatase detection ELISA assay	100mL #6262 500mL #6263 1L #6264 10L #6265
Alternative Block Blocking Buffer (BB5)	<ul style="list-style-type: none"> <li>完全的合成配方, protein-free, detergent free</li> <li>提供 microhydrated environment 穩定蛋白並保全 binding reactivity</li> <li>適用所有 ELISA, , 延長保存期間, 適合大量生產</li> </ul>	100 mL #6299 1-Liter #6301 10-Liter #6302
Monster Block Blocking Buffer (BB6)	<ul style="list-style-type: none"> <li>適用於解決 background 特別高的問題</li> <li>完全的合成配方, protein-free</li> <li>適用所有 ELISA,</li> <li>適用於分析 mammalian serum</li> </ul>	100 mL #6295 1-Liter #6297 10-Liter #6298
Block Buffer Optimization Pack (BBOP)	一次測試三種條件的組合包： <ul style="list-style-type: none"> <li>BB1 General Blocker (100mL)</li> <li>BB2 Neptune Block (100mL)</li> <li>BB3 SynBlock (100mL)</li> </ul>	cat# 641

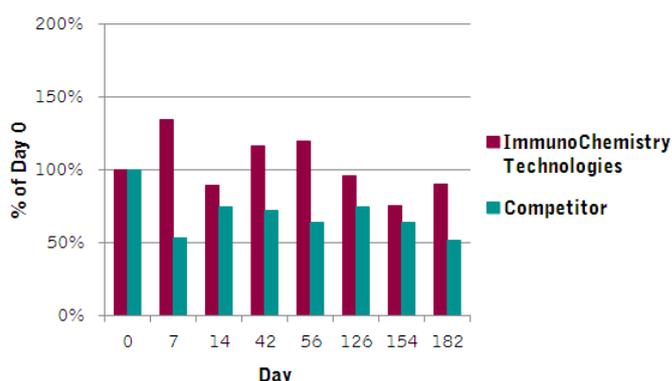
## Conjugate Stabilizer Diluents

New ELISA Solutions™ HRP Conjugate Stabilizer Reagents for use in all ELISA Detection Formats :

- 在稀釋 HRP-conjugated antibodies 的同時穩定 protein 原使結構, 並維持標定物活性
- 在保存期間維持 HRP-conjugated antibodies 呈色的活性
- 減低背景訊號可使 ELISA 產品在 2-8 °C 下維持六個月的呈色能力

品名	規格	貨號
Neptune™ HRP Conjugate Stabilizer, Non-Mammalian, 1x	100 mL	#6347
	1L	#6348
HRP Conjugate Stabilizer, Mammalian, 1X	100 mL	#6350
	1L	#6351

Signal Retention of HRP-IgG at 2-8°C with Neptune™ HRP Conjugate Stabilizer vs. Competitor



# Assay Diluents

## 減少介質效應並增進專一訊號

ICT's assay diluents 專為減少來自不同介質產生的變異而設計包括血清、血漿、尿液、細胞培養液以及標準品的稀釋液等，可加入標準品及樣品中，以減少介質效應，使標準品正確反應出存於不同介質的待測物濃度。

- 減少介質效應
- 使來自不同計算方式及樣品介質的結果更均一化
- 建立有效的標準曲線減低背景值
- 含有鈣離子螯和劑可抑制血液樣品中 complement 及 thrombin 產生的凝集
- 含微生物抑制劑使 ELISA 在 2°-8°C 穩定儲存長達 18 個月

針對不同條件，ICT 提供了四種配方的 assay diluent，您也可選購 Assay Diluent Optimization Pack 一次測試 四種條件

品名	特色說明	貨號	
<b>General Assay Diluent (AD1)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 含mammalian serum proteins 減少樣品介質中的蛋白與分析盤表面非專一性的作用</li> </ul>	100mL #620 1L # 622	500mL #621 10L# 671
<b>IgM-Reducing Assay Diluent (AD2)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● For Sandwich ELISA</li> <li>● 改善血清及血漿樣品中 IgM-mediated conjugate bridging 的干擾設計的配方</li> </ul>	100mL #623 1L # 625	500mL # 624 10L # 672
<b>Neptune Assay Diluent (AD3)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● For Antigen-down ELISA</li> <li>● 改善人、豬、牛的血清及血漿樣品中nonspecific binding 干擾設計的配方</li> </ul>	100mL #626 1L # 628	500mL # 627 10L # 673
<b>Antigen-Down Assay Diluent (AD4)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 為測試血清及血漿樣品的Antigen-down ELISA 而設計</li> <li>● 可抑制血液樣品中complement 及 thrombin 產生的干擾.的鈣離子螯和劑濃度最高</li> <li>● 可同時作為偵測血清及血漿樣品的sandwich ELISA 中的 Sample Diluent</li> </ul>	100mL #629 1L # 631	500mL # 630 10L # 674
<b>Assay Diluent Optimization Pack (ADOP)</b>	<p>含有以上四種 Assay Diluents 的組合供您一次找出最佳配方</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● AD1 General Assay (100 ml)</li> <li>● AD2 IgM-Reducing Assay Diluent (100 ml)</li> <li>● AD3 Neptune Assay Diluent (100 ml)</li> <li>● AD4 Antigen-Down Assay Diluent (100 ml)</li> </ul>	#958 (內含 AD1、AD2、AD3 及 AD4)	

# Sample Diluents



用以稀釋待測樣品病最佳化訊號

- 稀釋樣品至可測範圍
- 減少介質效應
- 防止nonspecific conjugate bridging
- Inhibition of complement and thrombin activity (clotting)

針對不同條件，ICT 提供了三種配方的 Sample Diluents, 您也可選購 Sample Diluent Optimization Pack 次測試三種條件

品名	規格	貨號
Neptune™ HRP Conjugate Stabilizer, Non-Mammalian, 1x	<ul style="list-style-type: none"> <li>● For Sandwich ELISA</li> <li>● 適合稀釋 goat, rabbit, mouse, avian, and human 血清, 及小鼠腹水 and 細胞培養液</li> </ul>	#647 (100mL); #648 (500mL); #649 (1L); #675 (10L)
HRP Conjugate Stabilizer, Mammalian, 1X	<ul style="list-style-type: none"> <li>● for Antigen-down ELISA format</li> <li>● for plasma Samples</li> <li>● non-mammalian protein-containing solution highly recommended</li> </ul>	#694; #695; #696; #697
SD3 Neptune Sample Diluent	<ul style="list-style-type: none"> <li>● for use with serum or plasma samples from mouse, porcine or bovine sources in an antigen-down format.</li> <li>● can also be used for human or other mammalian plasma samples in antibody-sandwich ELISAs</li> </ul>	#6124; #6125; #6126; #6127
含有以上四種 Sample Diluents 的組合供您一次找出最佳配方		
SDOP Sample Diluent Optimization Pack	<ul style="list-style-type: none"> <li>● SD1 100 ml</li> <li>● SD2 100 ml</li> <li>● SD3 100 ml</li> </ul>	#959

# Substrates for ELISA and Immunoblotting

ICT 針對不同訊號強度提供了數種fluorometric-based alkaline phosphatase 及 HRP substrates 可供 ELISA and immunoblotting, 包括各種靈敏度等級的TMB substrates for HRP detection

Format	Conjugate	Substrate	Absorbance
Microwell	HRP +++	<p><b>TMB 1-Component HRP Microwell Substrate (SUB1)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Substrate is ideal for most HRP detection ELISAs where the target is in the ng-pg range.</li> </ul>	370 or 620-650 nm
Microwell	HRP +++++	<p><b>TMB Super Sensitive 1-Component HRP Microwell Substrate (SUB2)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>most sensitive TMB substrate, is approximately 40-fold more sensitive than SUB1 TMB substrate.</li> </ul>	370 or 620-650 nm
Microwell	HRP ++	<p><b>TMB Slow Kinetic 1-Component HRP Microwell Substrate (SUB3)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>exhibits roughly 25% less sensitivity than SUB1 TMB substrate, for assays with long incubation periods (such as overnight incubations), and for assays that simply do not require a high level of sensitivity.</li> </ul>	370 or 620-650 nm
Microwell	HRP +	<p><b>ABTS 1-Component HRP Microwell Substrate (SUB4)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a good choice of assays with: samples containing high levels of the target molecule</li> </ul>	405-410 nm
Microwell	AP	<p><b>pNPP 1-Component AP Microwell Substrate (SUB5)</b></p> <p>formulation of pNPP alkaline phosphatase substrate contains a stabilizer to extend its benchtop shelf life.</p>	405-420 nm
Immunoblotting	HRP	<p><b>TMB 1-Component HRP Membrane Substrate (SUB6)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>useful for immunoblotting applications where HRP-conjugated molecules are used for detection.</li> <li>TMB membrane substrates react with HRP, yielding a dark blue reaction product.</li> <li>Our TMB 1-Component HRP Membrane Substrate formulation does not contain any aprotic solvents.</li> </ul>	370 or 620-650 nm
Immunoblotting	AP	<p><b>BCIP/NBT 1-Component AP Membrane Substrate (SUB7)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Substrate reacts with alkaline phosphatase, yielding a bluish-purple reaction product.</li> <li>NBT serves as the oxidant and BCIP is the alkaline phosphatase substrate.</li> </ul>	370 nm

## Stop Solutions for Substrates

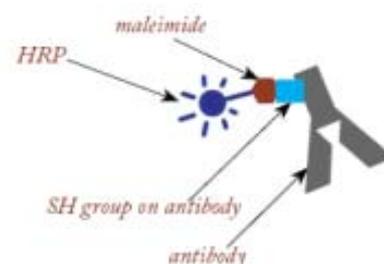
Stop Solutions 為呈色後，停止反應的試劑，依不同的呈色劑選擇適合的品項：

Format	Substrate	ICT Stop Solution	Catalog Number	Size
Microwell	TMB	Stop Solution for TMB Microwell Substrates STOP1	6282	100 mL
Microwell	ABTS	Stop Solution for ABTS Microwell Substrate STOP2	6283	100 mL
Microwell	pNPP	Stop Solution for pNPP Microwell Substrate STOP3	6284	100 mL

## HRP-Conjugated Secondary Antibodies

HRP-Conjugated Secondary Antibodies for **ELISA** or **Western Blot**

1.0 mg 包裝：



Application	Item	Cat. No.
Goat Secondary Antibody for Human IgG detection	Goat anti-Human IgG Fc	998
Goat Secondary Antibody for Mouse IgG detection	Goat anti-Mouse IgG Fc	6292
Goat Secondary Antibody for Rabbit IgG detection	Goat anti-Rabbit IgG Fc	6293

## ELISA Wash Buffer

ELISA Wash Buffer 10x WB1

用以有效的移除每步驟多餘的 antibody, antigen, substrate



Size	Cat. #
25 mL	6251
100 mL	650
500 mL	651
1 Liter	652
10 L	676

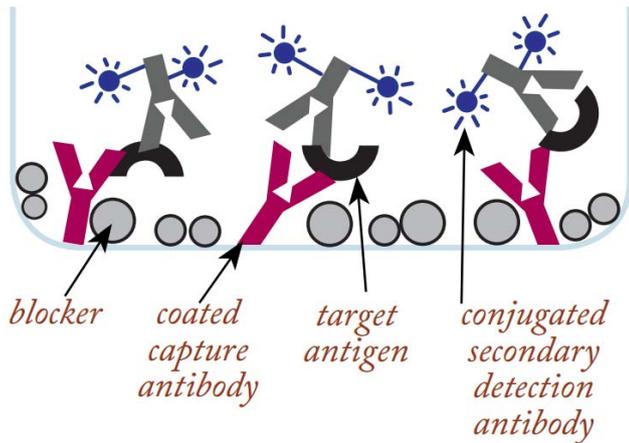
# ELISA Development Template Kits

最佳化ELISA assay 的產品組合, 依Antigen-down ELISA or Sandwich ELISA

分別提供以下兩種組合, 讓您一次備齊所有試劑, 緩衝液。

## Antibody-Sandwich ELISA Development Template Kit (#9100)

### Antibody Sandwich ELISA

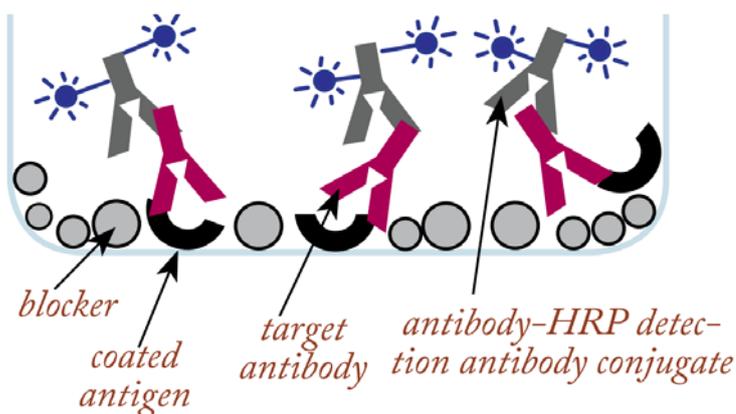


內容物包括：

- Antibody Coating Buffer (CB1), 5X, 25 mL
- Neptune Blocking Buffer (BB2), 500 mL
- HRP Conjugate Stock Stabilizer (CS6), 5X, 25 mL
- Neptune Assay Diluent, 100 mL Neptune Sample Diluent, 500 mL
- 10x ELISA Wash Buffer, 500 mL
- TMB 1-Component HRP Microwell Substrate (SUB1), 100 mL
- Stop Solution for TMB Microwell Substrates (STOP1), 100 mL

## Antigen-Down ELISA Development Template Kit (#9101)

### Antigen-Down ELISA

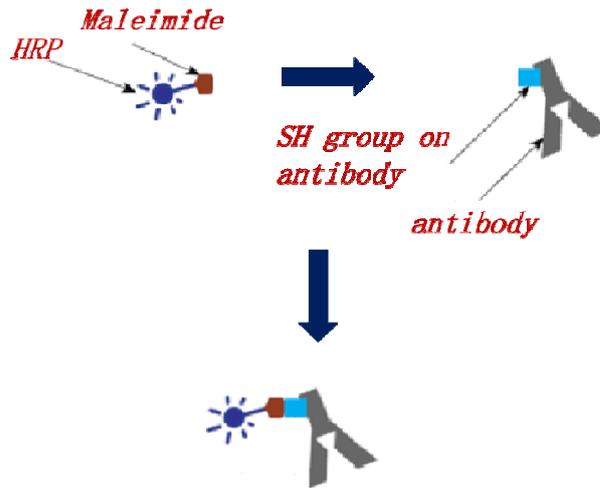


內容物包括：

- Antigen Coating Buffer, 5X (CB2), 25 mL
- General Blocker Blocking Buffer (BB1), 500 mL
- Antigen-Down HRP Conjugate Stabilizer, 5X (CS2), 25 mL
- General Serum Diluent for Sample Dilution (SD1), 500 mL
- 10x ELISA Wash Buffer, 500 mL
- TMB 1-Component HRP Microwell Substrate (SUB1), 100 mL
- Stop Solution for TMB Microwell Substrates (STOP1), 100 mL

# Conjugation-Ready HRP Maleimide

Catalog Number: #6294

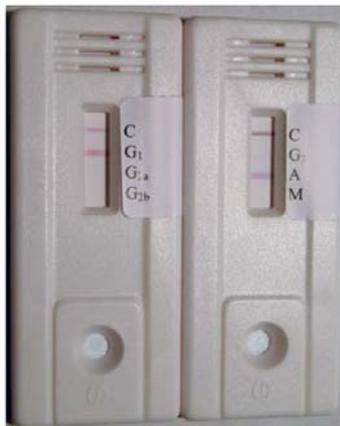


Conjugation-Ready HRP Maleimide, 5.0 mg, 內含 maleimide-activated HRP 可供穩定地將 HRP 結合至待 label 蛋白

- 可控制 標定至蛋白的比例
- 可避免因 periodate oxidation 引起的 HRP enzyme inactivation
- 可避免常用的 glutaraldehyde techniques 中 cross-linking 造成的 protein aggregation 甚至沈澱

# Rapid Test Mouse Monoclonal Isotyping Kit

Catalog Number: #998



The ICT Rapid Test Mouse Monoclonal Isotyping Kit 是一個操作僅需五分鐘就能分類 monoclonal antibody class and subclass determination.

- 靈敏的 gold-based 快速檢測套組適用於組織培養液及小鼠腹水。
  - 反應時間僅需 5 分鐘，操作時間精減至 20 min 以下
  - 兩個卡匣，一個偵測 IgG3、IgM 及 IgA antibodies，另一個偵測 IgG1、IgG2a、及 IgG2b isotypes.
  - Convenient – test for 6 major isotypes with one 5-minute rapid test
- 每組 kit 內含一瓶 45 ml 的 Sample Diluent

# 抗體的最強競爭對手 — Aptamer

Aptamer (適體, 其字源自拉丁文 aptus, 為「合適」之意) 是一小段由核糖核酸 (RNA) 或去氧核糖核酸 (DNA) 所組成的寡核酸 (Oligonucleotide), 由於寡核酸本身 3D 結構的關係, 與標的物形成高專一性及高親和性鍵結。不過即使是結合在同一個目標的 Aptamer 也有可能是由不同序列或構型的 RNA 或 ssDNA 所組成。

最早發現蛋白質與核酸的特異性結合, 是在 1980 年代研究 HIV 病毒與腺病毒 (adenovirus) 時發現病毒 RNA 上特定區域的結構對於病毒或是細胞蛋白質具有高度專一性及親和性。在 HIV 中病毒 RNA 上的 trans-activation response (TAR) 與病毒 Tat protein 結合會促進病毒複製; 而在腺病毒中同樣有一段 RNA aptamer 稱為 virus-associated (VA)-RNA 能夠調控蛋白質轉譯。

Aptamer 具有幾個特性, 包括:

1. 高安定性: 一般的抗體是屬於蛋白質, 經過加熱後蛋白質變性會改變其結構並喪失功能; Aptamer 是由核酸組成, 即使經過高溫加熱只要回復原來的溫度即可回復原來的構型。因此 Aptamer 比起抗體的對於溫度較不敏感, 也更容易保存。
2. 更容易生產與修飾: 如果是生產 monoclonal antibody 一般都要耗費半年以上的時間進行篩選, 而且篩選到的細胞也需要經過細胞培養、腹水生產、抗體純化才能得到合適的單株抗體, 不僅耗費的時間久, 而且生產成本昂貴; Aptamer 是由核酸組成, 因此只要篩選到適合的 aptamer 就可以直接以化學合成的方式大量合成 aptamer, 而且也可以根據應用的需求在核酸上標定螢光、Biotin 等標定物將 aptamer 作為 biosensor 使用。
3. 低抗原性: 抗體是屬於蛋白質, 所以在動物體內是相當好的抗原, 很容易誘發免疫反應, 經過長期注射後將失去效果; 而 aptamer 是屬於核酸, 對於免疫系統來說是低抗原分子而不容易被當作是外來物排斥, 故不容易產生免疫反應。
4. 多樣性的標的物: 一般來說小分子或是毒素因為分子小不容易經由免疫系統辨識產生抗體; 但是即使是離子或小分子與 aptamer 也有高的親和性與專一性, 如果使用 aptamer 作為辨識工具將可以大大拓展 biosensor 的應用。

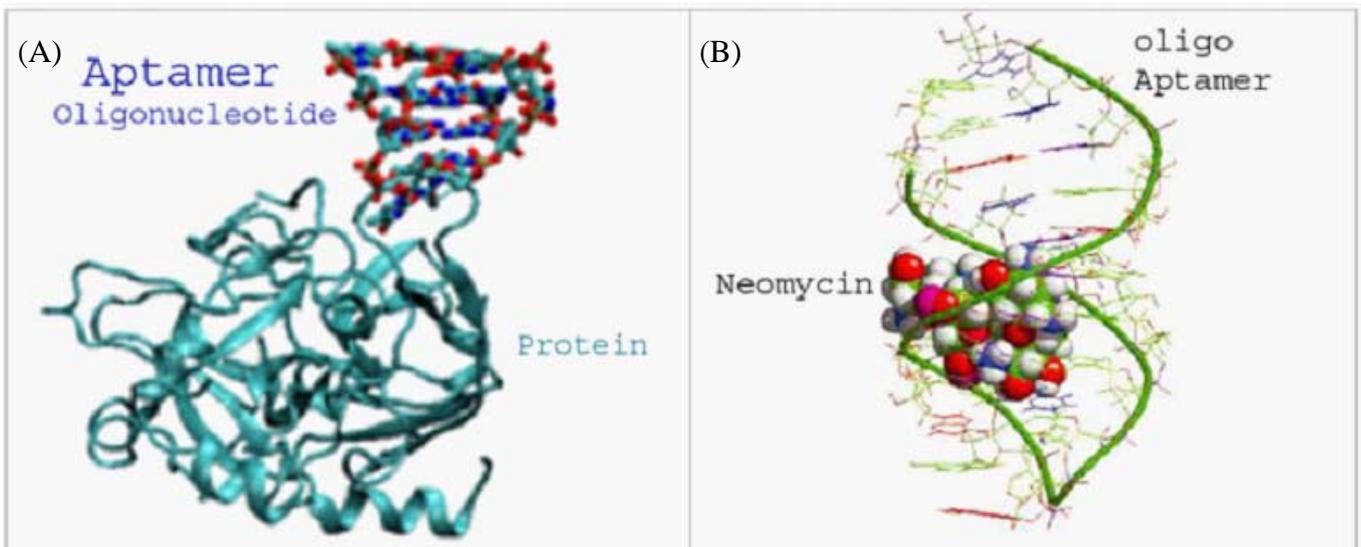


Fig.1 上圖分別為 Aptamer 與蛋白質 (A) 以及 Aptamer 與 Neomycin (小分子; B) 結合的結構圖

## Aptamer 篩選系統 - SELEX

篩選 Aptamer 的方法通稱為 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), 是一種在活體外進行 aptamer 篩選 (in vitro selection) 的方式。進行 SELEX 前, 以合成製備方式約 10<sup>12</sup>~10<sup>15</sup> 數量並對於目標物質具有親和性的 oligonucleotide library。一般來說 SELEX 的過程分為三個步驟:

1. Library 製備: 初始的 Library 會使用合成的單股核酸, 單股核酸是使用 30~40mer 之間合成的隨機序列 (random sequence) 組成, 兩端接上特定的引子 (primer) 以利後續複製使用。
2. 篩選過程 (結合與分離): 在這個步驟中會使用目標物質與 library 內的 oligonucleotide 進行結合, 以親和性方式先把無法與目標物結合的 oligonucleotide 排除。一般目標物可能先固定在硝化纖維素膜 (Nitrocellulose Membrane)、Agarose beads、磁珠 (Magnetic Bead)、甚至是直接使用細胞作為目標物 (Cell-SELEX)。通常 SELEX 都是改善這個步驟的流程, 可以縮短 aptamer 篩選的時間。
3. 複製擴增: 第 2 個步驟篩選出與目標物結合的 oligonucleotide 使用 PCR 方式進行增幅出新的 library, 然後再回到第 2 步驟進行篩選。

一般進行 SELEX 篩選 aptamer 需要進行 10~15 個循環, 才能得到親和性最強且專一性最好的 aptamer, 再經由 cloning 及 sequencing 就可以知道確切的 aptamer 序列。

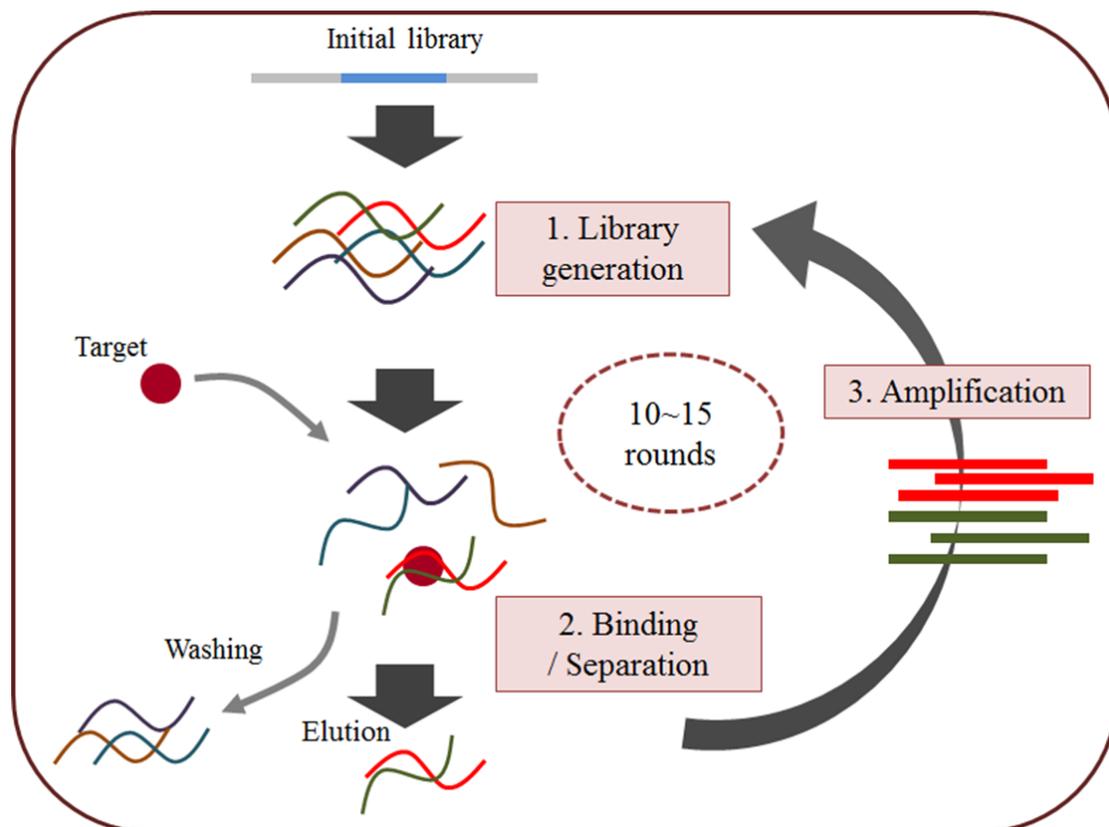


Fig.2 Aptamer 的 SELEX 篩選系統流程簡圖。一般 SELEX 系統裡面包括 3 個步驟: 1. Library 建立、2. 寡核酸與目標物的鍵結與分離 (寡核酸篩選)、3. 使用 PCR 增幅寡核酸。增幅後的寡核酸再度進入第 2 步驟篩選。通常 SELEX 系統需要進行 10 至 15 次循環才能篩選到 aptamer。

## Aptamer 的應用

由於 Aptamer 能夠與特定的目標結合，這個特色與抗體的特色一致，因此抗體能夠進行的應用也可以改用 aptamer 置換。常見的 aptamer 應用包括：

### ELISA

ELISA 是利用抗體與特定抗原的高專一性及親和性所開發出的偵測方法，是主要的臨床檢驗方法之一，也常在一般研究中檢測特定蛋白質。一般 ELISA 的作法是將抗體固定在免疫測定盤底部，再加入待測物讓抗體攔截特定抗原，或是直接將抗原固定在免疫測定盤底部，後續加入帶有 HRP 或 AP 的抗體偵測，以 ELISA reader 讀值判斷其蛋白質濃度。

使用 aptamer 偵測的方式稱為 ALISA (aptamer-linked immobilized sorbent assay)用以與傳統 ELISA 作為區別，不同的是 aptamer 上可以直接合成 biotin，因此抗原是直接固定在免疫測定盤底部後先加入 aptamer 做親和性鍵結，然後再加入 streptavidin-HRP or streptavidin-AP 與 biotin 鍵結，後續一樣以 ELISA reader 偵測讀值。

由於 aptamer 能夠與離子或小分子結合，因此 ALISA 未來性比 ELISA 要更廣。

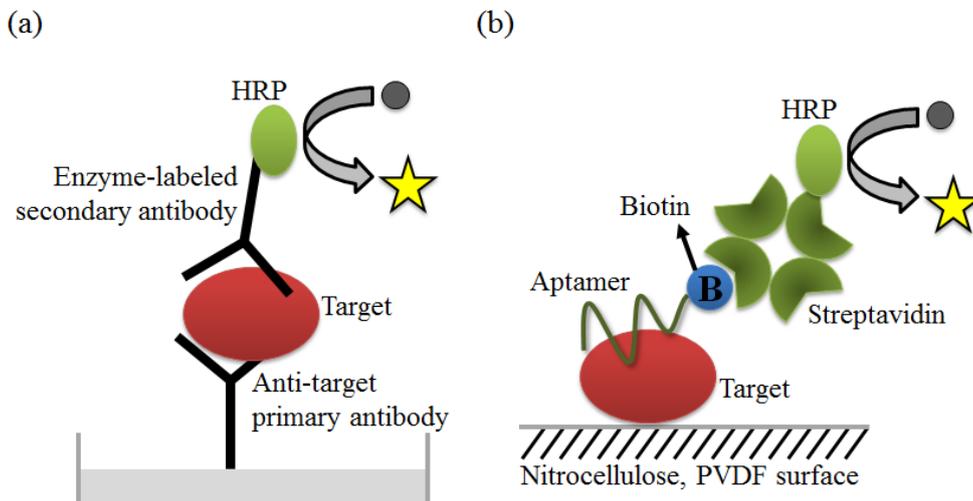


Fig.3 上圖分別是 (a) ELISA 偵測方式與 (b) ALISA 偵測方式。

(a)圖中的 ELISA 是先將第一個抗體固定在底部，放入待測目標，使抗體攔截目標物，再加入帶有 HRP 的第二個抗體辨識目標物並呈色。

(b)圖中 ALISA 是先將目標物固定後，放入標定 Biotin 的 aptamer 與目標物結合，再加入 Streptavidin-HRP 與 Biotin 結合並呈色偵測。

### Western Blot Analysis :

Western Blot 也是蛋白質分析常用的技術，一般使用 western blot 需要 2 種抗體進行標示 (primary Ab & secondary Ab)；在目前 Aptamer 的應用中可以把 Biotin 標定在 aptamer 上後，再使用 Streptavidin-HRP 進行呈色；或者是直接把螢光標定在 aptamer 上，只需要使用一個 aptamer 就能夠進行螢光呈色。

### 蛋白質親和性純化：

傳統的蛋白質親和性純化是使用免疫親和純化（Immunoaffinity purification, IP）的方式進行分離，這也是一般實驗室研究蛋白質間交互作用的技術，使用抗原與抗體親和性的特性，能夠把特定的蛋白質分離純化出來。由於 aptamer 具有抗體的特性，而且分子更小、更容易合成修飾、更容易固定、更加穩定且再現性更高，未來將是發展 IP 的利器。

### 生物影像（Bio-Imaging）：

由於 aptamer 對於特定目標具有專一性及高親和性，因此可以在 aptamer 合成過程中直接合成螢光，用於標定特定的細胞上的 bio-marker，而且 aptamer 是由核酸組成，具有低毒性、低免疫反應、高通透性與精確定位的特性，非常適合用於臨床醫學顯影使用。

### 藥物輸送系統：

由於 Aptamer 能夠與細胞表面受體結合，可作為運送藥物至細胞內的方式。例如前列腺特異性膜抗原 PSMA 是前列腺癌的重要 bio-marker，目前有一種 PSMA 雙 aptamer 探針分別由 A10 aptamer（用於 PSMA(+)前列腺癌細胞）與 DUP-1 aptamer（用於 PSMA(-)前列腺癌細胞）組成，其中在 A10 aptamer 上放入抗癌藥物 doxorubicin，而實驗結果也證實 dual aptamer complex 能夠將 doxorubicin 正確送至前列腺癌細胞。

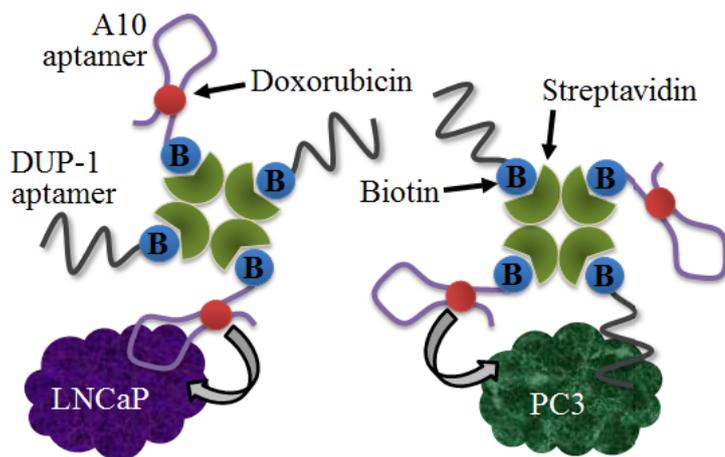


Fig.4 左圖是抗前列腺癌藥物 doxorubicin 透過雙 aptamer 傳遞系統 (A10 aptamer + DUP-1 aptamer)，透過這個雙 aptamer 傳遞系統能夠把 doxorubicin 送到帶有 PSMA(+) 與 PSMA(-) 的前列腺癌細胞並進入細胞。

### 總結：

Aptamer 與抗體一樣針對特定目標物具有高親和性與高專一性，而 aptamer 是由寡核酸所組成，因此比起抗體有更高的熱穩定度。在應用方面，aptamer 可以取代原先抗體相關的應用，包括 Western Blot、ELISA、Flow Cytometer、免疫沈澱分析等等；更由於 aptamer 本身的非免疫性與無毒性，可以應用於生醫領域，可以用於 Bio-sensor、Bio-Imaging、藥物傳遞，甚至 aptamer 也可以做為藥物使用，其應用範圍相較於抗體更加廣泛。

當然 aptamer 也不是完全沒有缺陷。由於 aptamer 本身是由核酸組成，沒有經過修飾的 aptamer 進行體內循環時很容易經核酸酶作用而分解；另一個問題是由於 aptamer 的分子極小，在體內循環時很容易經由腎臟排出體內。即使如此，只要基於 aptamer 本身的特性，在加上未來的相關研究，可以預見 aptamer 在生物醫學領域上的應用潛力無窮。

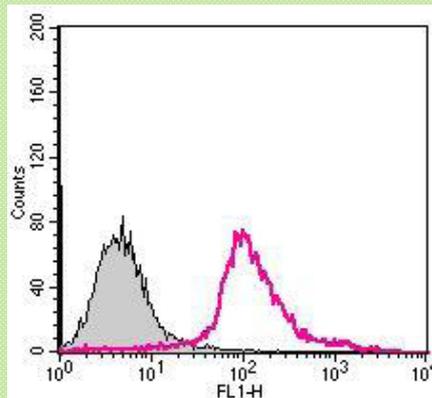
**Aptamer Science Inc.** 位於韓國浦項市，2011 由浦項工科大學生物技術中心技轉成立的生技公司，其核心技术為採用 “Advanced SELEX” 進行 aptamer 篩選，能夠在更短的時間內篩選到親和性更高的分子。目前 Aptamer Science Inc. 已經篩選出 204 種 aptamer 分別能夠與不同的細胞膜蛋白、細胞質蛋白及病毒蛋白結合。

Aptamer Science Inc. 目前已篩選出的 204 種 aptamer 皆已公佈在產品網頁上，包括辨識的目標物與其親和度 (Kd)，由於屬於客製化合成，需要 2 至 4 週的合成時間，且合成的 aptamer 價格會依據核酸合成量與修飾方式而有差異。

Aptamer Science Inc. 也有提供客製化 aptamer 篩選方案，可依據客戶的需求使用 Advanced SELEX 進行篩選，最短能在 4 週內得到篩選到最佳的 aptamer。

## AptoCyto™ Flow Cytometry Aptamers

- 適用於流式細胞儀的 aptamer
- 每個反應最多可辨識  $10^6$  cells
- 2 ~ 8°C 保存長達 12 個月
- 每個包裝皆可做 100 次反應



左圖為流式細胞儀的結果。  
 粉紅色曲線為 FITC-conjugated EGFR aptamer 抓到的 A431 cell line。  
 灰色曲線是沒有使用 aptamer 處理的 A431 細胞（背景值）。

目標蛋白	標定螢光	產品編號
EGFR (ErbB1)	FITC Conjugate	2369FC-FITC
	Cy3 Conjugate	2369FC-Cy3
	Cy5 Conjugate	2369FC-Cy5
	Dy647 Conjugate	2369FC-Dy647
	TAMRA Conjugate	2369FC-TAMRA
ErbB2	FITC Conjugate	1194FC-FITC
	Cy3 Conjugate	1194FC-Cy3
	Cy5 Conjugate	1194FC-Cy5
	Dy647 Conjugate	1194FC-Dy647
	TAMRA Conjugate	1194FC-TAMRA
EphA2	FITC Conjugate	2176FC-FITC
	Cy3 Conjugate	2176FC-Cy3
	Cy5 Conjugate	2176FC-Cy5
	Dy647 Conjugate	2176FC-Dy647
	TAMRA Conjugate	2176FC-TAMRA

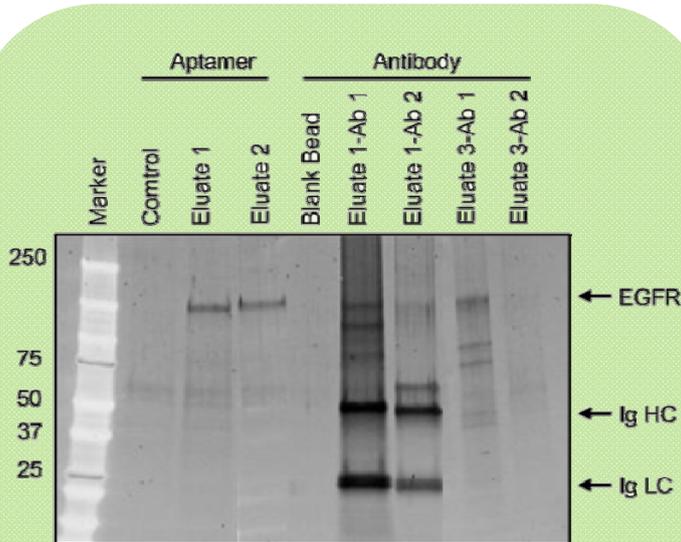
目標蛋白	標定螢光	產品編號
CD81	FITC Conjugate	2015FC-FITC
	Cy3 Conjugate	2015FC-Cy3
	Cy5 Conjugate	2015FC-Cy5
	Dy647 Conjugate	2015FC-Dy647
	TAMRA Conjugate	2015FC-TAMRA
ICAM-2(CD102)	FITC Conjugate	2296FC-FITC
	Cy3 Conjugate	2296FC-Cy3
	Cy5 Conjugate	2296FC-Cy5
	Dy647 Conjugate	2296FC-Dy647
	TAMRA Conjugate	2296FC-TAMRA
HGFR(c-Met)	FITC Conjugate	2308FC-FITC
	Cy3 Conjugate	2308FC-Cy3
	Cy5 Conjugate	2308FC-Cy5
	Dy647 Conjugate	2308FC-Dy647
	TAMRA Conjugate	2308FC-TAMRA

# AptoPrep™ Proteins Precipitation Kit

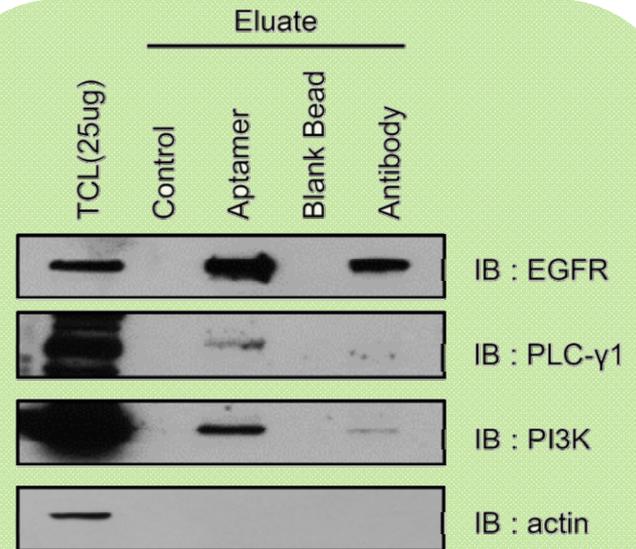
- 分成三種不同應用的蛋白質沈澱套組：

- Direct Magnetic AP Kit： aptamer 接在磁珠上，針對目標蛋白質進行分離
- Indirect Magnetic AP Kit： aptamer 上接 biotin，透過磁珠上的 streptavidin 與 biotin 結合分離目標蛋白質
- Dual Magnetic AP/Co-AP Kit： aptamer 接在磁珠上，透過不同的 buffer 可以進行 AP 或 Co-AP

- 每組可做 40 次反應；保存條件為 2 ~ 8°C 可長達 12 個月



上圖是分別使用 EGFR aptamer 與 EGFR antibody 抓取 A431 cell lysate 內的 EGFR protein 的，並分別以 SDS-PAGE sample Buffer (Elute 1)、high-pH elute buffer (Elute 2) 與 low-pH elute buffer (Elute 2) 結果。使用 4~15% SDS-PAGE gradient gel 分離後，以 SYPRO ruby 染色的結果。

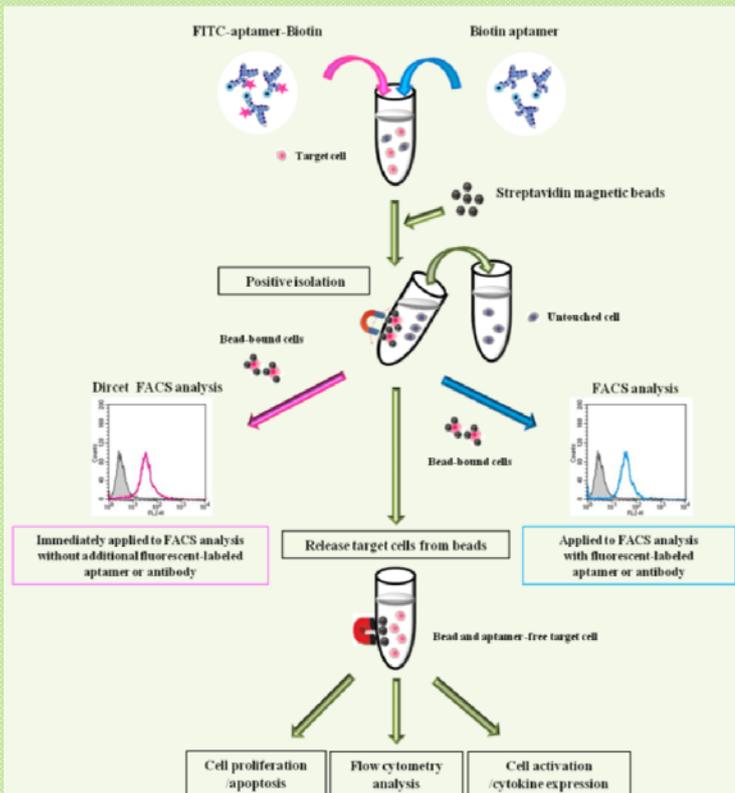


上圖是使用 EGFR aptamer 進行 Co-AP 分離實驗。A431 cell 分別與 EGFR aptamer 及 antiEGFR antibody 混合，並進行後續的蛋白質分離程序。分離純化後的蛋白質以 SDS-PAGE 分離並轉漬至 PVDF，並使用 EGFR、PLC- $\gamma$  1、PI3K 及 actin 的抗體進行 western blot 分析。

目標蛋白	純化蛋白質方式	產品編號
EGFR(ErbB1)	Direct Magnetic AP Kit	EGFR-2369DM
	Dual Magnetic AP/Co-AP Kit	EGFR-2369DDM
	Indirect Magnetic AP Kit	EGFR-2369IM
INSR(Insulin Receptor)	Direct Magnetic AP Kit	INSR-1652DM
	Dual Magnetic AP/Co-AP Kit	INSR-1652DDM
	Indirect Magnetic AP Kit	INSR-1652IM
ErbB2	Direct Magnetic AP Kit	ErbB2-1194DM
	Indirect Magnetic AP Kit	ErbB2-1194IM
EphA2	Direct Magnetic AP Kit	EphA2-2176DM
IGF-1R	Direct Magnetic AP Kit	IGF-1R-2293DM
HGFR(c-Met)	Direct Magnetic AP Kit	HGFR-2308DM
VEGFR2	Direct Magnetic AP Kit	VEGFR2-2041DM
Akt2	Direct Magnetic AP Kit	Akt2-2154DM
	Dual Magnetic AP/Co-AP Kit	Akt2-2154DDM
	Indirect Magnetic AP Kit	Akt2-2154IM

# AptoPrep™ Cell Isolation Kit

- 能將帶有特定抗原的細胞由 total cell 中分離出來
- 依據客戶的使用，分為 Mono labeled (5'-biotin labeled) 以及 Bis-labeled (5'-FITC/3'-biotin dual labeled) 兩種 Kit
- 每組可進行 40 次反應，建議每次反應的細胞量為  $1 \times 10^7$  cells/mL
- 保存條件為 2 ~ 8°C 可長達 12 個月



左圖是使用 AptoPrep™ Cell Isolation Kit 分離帶有特定蛋白質的細胞流程。

AptoPrep™ Cell Isolation Kit 分為 Biotin-labeled aptamer 及 FITC-Biotin-labeled aptamer。如果是使用 Biotin-labeled aptamer 分離細胞，使用 streptavidin 磁珠將特定細胞分離後再進行後續實驗；如果是使用 FITC-Biotin-labeled aptamer 分離細胞，不只可以使用 streptavidin 磁珠分離細胞，也可以直接上 flow cytometer 分離細胞。

分離的細胞，後續可進行•FACS analysis、cell proliferation、apoptosis、cytokine expression 等相關研究。

目標蛋白質	標定形式	產品編號
EGFR	Mono labeled (5'-biotin labeled)	EGFR-2369BCI
	Bis-labeled (5'-FITC/3'-biotin dual labeled)	EGFR-2369FBCI
ERBB2(HER2)	Mono labeled (5'-biotin labeled)	ERBB2-1194BCI
	Bis-labeled (5'-FITC/3'-biotin dual labeled)	ERBB2-1194FBCI
ICAM-2	Mono labeled (5'-biotin labeled)	ICAM-2-2296BCI
	Bis-labeled (5'-FITC/3'-biotin dual labeled)	ICAM-2-2296FBCI
CD31	Mono labeled (5'-biotin labeled)	CD31-2196BCI
	Bis-labeled (5'-FITC/3'-biotin dual labeled)	CD31-2196FBCI
VEGFR2	Mono labeled (5'-biotin labeled)	VEGFR2-2041BCI
	Bis-labeled (5'-FITC/3'-biotin dual labeled)	VEGFR2-2041FBCI
HGFR(c-Met)	Mono labeled (5'-biotin labeled)	HGFR-2308BCI
	Bis-labeled (5'-FITC/3'-biotin dual labeled)	HGFR-2308FBCI