

HRP标记试剂盒

产品编号: 6012-1

活化 HRP 的醛基与 IgG 抗体的氨基反应形成酰胺键, 从而将 HRP 标记到 IgG 抗体上。

本试剂盒提供了能够标记 5x(0.1~2mg)IgG 抗体的试剂。

规格

试剂盒组分

1. 活化 HRP: 1mg 5 支。
2. 标记缓冲液 5ml。
3. 反应增强剂 0.5ml, 1 支。
4. 储存液 1000 μ l。

试剂盒不提供需要自备或单独购买的材料和设备

1. 超滤管 4ml (MWCO=10K) 1 支。

运输、储存和有效期

冷藏运输, 2~8 $^{\circ}$ C 储存, 置于-20 $^{\circ}$ C 可更好保持酶活性, 用前恢复室温。有效期 1 年

操作方法

1. IgG 的准备

1.1. 检查 IgG 是否适合标记, 见考表 1。

表 1. 待标记抗体与标记试剂盒的兼容性及其处理方法

成分	是否适合标记和所需处理
叠氮钠	置换缓冲液 (步骤 1.2) (叠氮钠可使过氧化物酶失活)
甘油	10% 以下, 继续进行步骤 2 (低含量的甘油对标记的影响可以忽略) 大于 10%, 置换缓冲液 (步骤 1.2) (甘油含量过高, 影响标记效率)
Tris	置换缓冲液 (步骤 1.2) (Tris 所含氨基与酶反应, 影响抗体标记)
甘氨酸	置换缓冲液 (步骤 1.2) (甘氨酸所含氨基与酶反应, 影响抗体标记)
BSA 或明胶	4xIgG(μ g 量): 继续进行步骤 2 (杂蛋白控制在一定浓度下标记可以接受) 高于 4xIgG(μ g 量): 不能标记, 需纯化 IgG (杂蛋白含量太高, 严重影响抗体标记)
腹水	不能标记, 需纯化 IgG (杂蛋白含量太高, 严重影响抗体标记)
血清	不能标记, 需纯化 IgG (杂蛋白含量太高, 严重影响抗体标记)
杂交瘤上清	不能标记, 需纯化 IgG (杂蛋白含量太高, 严重影响抗体标记)

抗体的纯度对标记效率有很大影响, 如果是购买的抗体, 请向供应商了解缓冲液成分。高纯度的抗体可获得更好的标记效果。BSA 或明胶低于 4 倍 IgG μ g 量, 甘油不高于 10% 可以直接进行标记。抗体中含有 Tris, 甘氨酸或过多的甘油, 首先要进行缓冲液的置换, 去除这些成分。如果含有的 BSA 或明胶超过 4 倍 IgG 的 μ g 量, 或是血清、腹水和杂交瘤上清液, 需要先纯化 IgG, 可用蛋白 A 亲和层析柱或其他纯化试剂。

抗体的适宜浓度是 1~10mg/ml, 在此浓度范围内, 抗体浓度越高, 标记率越高, 低于此浓度会明显降低标记率, 需要进行浓缩操作。



1.2. 抗体浓缩和液体置换

1.2.1. 在超滤管中加入适量的抗体溶液，离心，超滤管中残留的部分为浓缩抗体。

1.2.2. 如果操作目的是浓缩抗体，继续操作 1.2.3，如果目的是去除干扰标记的分子，加 0.01M pH7.4PBS, 0.15M NaCl 或标记缓冲液于超滤管中，离心，直到抗体浓缩到浓度在 1~10mg/ml。

1.2.3. 在超滤管中加入适量的标记缓冲液，使抗体的浓度为 1~10mg/ml，用移液器不断洗吹膜上的蛋白质使之混匀，注意不要刺到膜。

1.2.4. 将抗体溶液转移到装有活化辣根过氧化物酶的管中。

2. 抗体标记

2.1 使用浓度 1~10mg/ml 抗体进行标记，取抗体 1mg(相当于 100~1000 μ l 如果抗体是冻干的，加入适量的标记缓冲液)于活化 HRP 的管中，混匀，加入 100 μ l 的标记缓冲液。

2.2 室温、避光孵育 3 小时，在摇床上摇动。

2.3 加 1/10 反应体积的反应增强剂到标记反应管中。

2.4 涡旋混匀，室温黑暗孵育 15 分钟。

2.5 加 100 μ 储存液到反应管中。

2.9 涡旋混匀，室温黑暗孵育 15 分钟。

2.10 抗体已标记好，可以直接使用；也可用超滤管进一步纯化。如长期保存，可加等量甘油，混匀后-20 $^{\circ}$ C保存。

注意事项

1. 叠氮钠是 HRP 的抑制剂，因此，避免使用叠氮钠作为缓冲液和 HRP 标记物的防腐剂。

2. 标记操作中，1mg HRP 用于标记 1mg IgG 的摩尔比为 4:1，一般可以得到满意的标记效果。一般情况下，HRP 与 IgG 的摩尔比在 1:1~1:10 可得到不同的标记率，通过增加或减少摩尔比可以增加或降低标记率。

3. 同样量的抗体，减少反应体积（相对增加反应浓度）可以增加反应效率。

4. 标记后通常可以直接使用。HRP 结合物的进一步纯化可以降低非特异反应。非结合 HRP 可以通过凝胶过滤或亲和层析的方法除去。