



# HRP标记试剂盒（微量蛋白质标记）

产品编号：**6012-2**

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。

本试剂盒提供标记 5x (10~100μg)IgG 抗体。

## 规格

### 试剂盒组分

1. 活化 HRP: 100μg 5 支。
2. 标记缓冲液 5ml。
3. 反应增强剂 1 支。
4. 储存液 1000μl。

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 500μl (MWCO=10K) 1 支。

## 运输、储存和有效期

冷藏运输，2~8°C 储存，置于-20°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(μg 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(μg 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，请向供应商了解内含成分。高纯度的抗体可获得比较好的标记效果。BSA 或明胶低于 4 倍 IgG μg 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 μg 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，抗体浓度高，标记率高，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，加反应缓冲液于超滤管中，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 100 $\mu$ g(相当于 10~100 $\mu$ 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 10 $\mu$ l 的标记缓冲液。

2.2 室温、避光孵育 3 小时，间隔涡旋混匀。

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 10 $\mu$  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 HRP 与 IgG 的摩尔比为 4:1，可以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。