

HRP 标记试剂盒产品说明书

可简单、快速地偶联 IgG 抗体和 HRP

仅供研究使用

一. 产品简介

HRP (Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶), 是一种糖蛋白, 广泛分布于植物中, 分子量小, 标记物容易穿透进入细胞内部, 稳定, 纯酶容易制备。HRP 常用于生化检测分析, 免疫类 Elisa 试剂盒, 是多种试剂盒显色体系的关键成分。HRP 快速标记试剂盒可简单、快速地实现抗体与 HRP 的偶联, 偶联试剂盒产品稳定性好, 随用随取, 方便快捷。

二. 试剂盒成分

产品货号	试剂盒成分	规格
TW000020S	预活化 HRP	1 管 (100ug)
	偶联液	1 管 (200ul)
	反应终止液	1 管(0.8mg,干粉)
TW000020M	预活化 HRP	1 管 (300ug)
	偶联液	1 管 (600ul)
	反应终止液	1 管(2.4mg,干粉)
TW000020L	预活化 HRP	1 管 (500ug)
	偶联液	1 管 (1ml)
	反应终止液	1 管(4mg,干粉)

保存和稳定性: 试剂盒采用低温运输, 收到后请置于-20°C保存, 保存时间 12 个月。

三. 标记操作步骤

1. 抗体标记前处理

1.1 抗体保存液分析

进行抗体标记前, 需明确抗体保存液成分, 当抗体保存液中含有 BSA、明胶、Tris、MES 等带-NH₂ 的物质时, 需对抗体进行透析或者超滤, 以去除干扰物质达到最佳标记效果。透析方法为可以采用 1xPBS 透析, 每次透析液用量 4~5L, 每隔 4~5h 换液 1 次, 共换液 3 次。如果抗体保存液中含有叠氮化钠而不含有带-NH₂ 的成分, 理论上叠氮化钠会使得 HRP 失活, 建议可以用 10KD 的超滤管超滤 4 次。

1.2 抗体浓度测定与调整

①对于保存液中不含蛋白的抗体, 可以用 Nanodrop 测定抗体浓度, 如果保存液中含有蛋白, 则可透析后再测定抗体浓

度;

②商品化抗体可以直接按供应商标示的理论浓度进行计算;

③在抗体标记过程中, 抗体浓度在 3~6mg/mL 对标记最有利, 有利于提高标记抗体的检测灵敏度, 如果达不到这个浓度, 可利用超滤管进行超滤浓缩使其浓度达到这个浓度。如果样品量较少, 且只是小样试用, 则要求不用这么严格, 如果是正式生产, 则必须按要 求调整抗体浓度。

2.抗体HRP 标记操作步骤:

以下实验操作以TW000020-100 规格示例, 其他规格可以按照倍数增加进行调整

①取67 μ g~100 μ g 待标记的抗体 (可以根据抗体浓度计算需要取的抗体体积) 加入EP 管

②向每 10 μ L 要标记的抗体液中加入 1 μ L 的偶联液, 漩涡混合均匀;

③将上述抗体液直接加入到100 μ g HRP 瓶中, 手动混匀使固体重复溶解;

④将瓶子于室温下避光反应2h, 中间每隔30min 轻轻晃动瓶子20 次;

⑤在反应结束前 5min 开始配制反应终止液, 向反应终止液粉末试剂瓶中加入 200ul 的 ddH₂O, 充分溶解配置成为 4mg/mL 的硼氢化钠溶液;

⑥向 HRP 反应瓶中加入现配的反应终止液, 每 10ul 的抗体液加入 1 μ L 的反应终止液; 用手轻轻晃动瓶子 20 次, 使溶液充分混匀;

⑦将瓶子于室温下避光反应 1h, 中间每隔30min 轻轻晃动瓶子20 次;

⑧反应后的样品, 如果是小样, 则可不作纯化处理直接使用。如果是生产用的大样, 则需 超滤 3 次更换保存缓冲液后, 加入 50%的甘油, 混合均匀, 再分装保存于-20 $^{\circ}$ C。

四. 注意事项:

1. 抗体缓冲液中不能含有氨基的物质, 例如 BSA、明胶、Tris、MES、甘氨酸等, 抗体 pH 在4.5~10 之间皆可;

2. 终止剂是4mg/ml 的硼氢化钠, 需要现配现用, 不能保存;

3. 标记完毕的酶标记物可暂存4 $^{\circ}$ C,需要长期保存的要加入等体积甘油-20 $^{\circ}$ C保存;

4. 抗体标记量以及体积:

产品编号	HRP 量	可标记抗体量	推荐抗体标记浓度	其他说明
TW000020-100	100ug	67ug-100ug	3~6mg/mL	有关抗体的具体用量需要根据具体要求通过优化实验来决定, 一般情况下, HRP:抗体比例越高, 抗体标记的效率越高, 抗体上标记的 HRP 越多, 灵敏度, 信噪比会越好, 但是标记太多也可能屏蔽抗体的活性位点, 故 HRP:抗体的质量比可以在 0.5:1~2:1 之间调试。
TW000020-300	300ug	201ug-300ug	3~6mg/mL	
TW000020-500	500ug	333ug-500ug	3~6mg/mL	