

## 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 2-8°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-NH<sub>2</sub> 的物质时, 须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-NH<sub>2</sub> 的成分, 理论上叠氮化钠会使得 HRP 失活, 建议可以用 10KD 的超滤管超滤先筛 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 $\mu$ g~100 $\mu$ 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 $\mu$ L 要标记的抗体液中加入 1 $\mu$ L 的偶联液, 漩涡混合均匀;

③将上述抗体液直接加入到 100 $\mu$ 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 ddH<sub>2</sub>O, 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 $\mu$ 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	