

HRP 快速标记试剂盒

货号：PMK2550CG

保存：4℃避光保存 6 个月

规格：0.5mg/1mg/2mg

预期用途：本试剂盒适用于带有游离氨基的物质的 HRP 标记，比如：带有游离氨基（伯胺）的小分子化合物，蛋白或者抗体。

产品简介：

辣根过氧化物酶（HRP）是一种 44,173.9 道尔顿糖蛋白，带有 6 个赖氨酸残基，可以与待标记分子结合。当与适当的底物一起孵育时，会生成带有颜色，荧光或发光衍生物的标记分子偶联体，我们可以对其进行检测和定量分析。HRP 通常用于偶联物中，以确定分子靶标的存在。HRP 具有单体特性，能简便地生成有色物，常用于 ELISA 和免疫组织化学等实验。本试剂盒可直接对蛋白质、多肽及其它含游离氨基的配体上标记 HRP。试剂盒中 HRP 已预先活化，可直接用于偶联实验。

标记原理：采用改良的过碘酸钠法活化辣根过氧化物酶（HRP），经过活化的 HRP 可以与待标记物的游离氨基结合，发生希夫碱反应（Schiff's base reaction），从而实现与蛋白的偶联。

应用举例：直标一抗在免疫实验中无需二抗，免去繁琐的孵育和洗涤步骤，节省时间。

产品内容

试剂盒组分	规格			储存条件
	0.5mg	1mg	2mg	
活化 HRP 溶液 (10mg/mL)	50 μL	100 μL	200 μL	4℃避光保存
标记缓冲液	0.5mL	1mL	2mL	4℃保存
标记终止粉末	粉剂×1 支	粉剂×1 支	粉剂×2 支	4℃避光保存
50KD 超滤管	2 支	2 支	2 支	室温保存

自备耗材

可调节式移液枪及枪头

离心机（离心力可到 12000×g）

1×PBS 7.4，去离子水

样本准备

待标记物不应含有甘油、叠氮钠、氨基物质（包括甘氨酸、BSA、Tris 等），普罗克林（Proclin）等物质。如果含有以上物质，需用 0.01M pH7.4 PBS 缓冲溶液（1×PBS 7.4）进行超滤以除去以上物质保证标记效率。具体方法为：将样本加入 50KD 超滤管中，加入 PBS 补齐至 500 μL，12,000g、4℃离心 10min，弃掉滤液；重复 2-3 次。后取出超滤管内芯，倒置于干净外管中，4,000g，4℃离心 2min，收集置换缓冲液后的样本。若待标记物分子量较小，可自行准备合适分子量的透析袋或超滤管进行充分透析或者超滤管超滤。调整待标记物的浓度至适当的浓度，抗体调整的浓度为 2mg/mL 左右，大于 1mg/mL。

注意：试剂盒中提供的超滤管最大容积为 0.5mL，如果 1 mg 抗体体积大于 0.5 mL，请分多次加入，离心超滤浓缩以后再加入 1×PBS 7.4 补充总体积到 0.5mL，进行超滤除杂。

实验步骤

1. 标记前准备：

1) 从 4℃取出 HRP 快速标记试剂盒，室温条件下平衡 30 分钟。

产品说明书

2) 超滤管浸润: 向干燥的超滤管滤芯中加入 500 μ L 1 \times PBS 7.4, 室温放置 10min 备用, 在加入待标记物之前弃去 PBS 即可 (整个标记过程中超滤管滤芯都应该保持湿润)。

2. 标记反应 (以抗体为例):

待标记样本与 HRP 最佳摩尔比为 1:1 至 1:4。我们建议抗体以约 1:4 的比例进行偶联实验。考虑到分子量 (抗体 160,000: HRP 40,000), 当抗体与 HRP 摩尔比为 1:4 时, 抗体:HRP 质量比为 1: 1。

抗体标记用量参考表:

HRP 酶量	可标记抗体量	最佳标记体系体积
0.5mg	0.5-2mg	0.5mL
1mg	1-4mg	1mL
2mg	2-8mg	2mL
标记摩尔比为 1:1 至 1:4		

将待标抗体加入 1.5mL 离心管中 (抗体大于 1mg 可分 2 管), 向待标抗体溶液中加入 1/10 体积的标记缓冲液, 用移液枪反复吹打几次以充分混匀, 加入对应质量已活化的 HRP 溶液, 用移液枪反复吹打几次以充分混匀, 避免产生气泡。加去离子水补齐至最佳标记体系体积, 如: 1mg 抗体补齐至 1mL。室温避光反应 2h。

注: 若待标记物分子量较小, 可通过预实验确定最佳摩尔比和对应质量比。调整摩尔比时, 可保持 HRP 量不变, 更改待标记样本和缓冲液用量。

3. 终止反应:

向标记终止粉末中加入 1mL 去离子水配成标记终止液, 取适量的标记终止液加入步骤 2 的标记反应液中, 比例为: 每 20 μ L 标记反应液加入 1 μ L 标记终止液。充分混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光静置 2h。

4. 标记物产物收集与保存:

标记物加入 50KD 超滤管中, 加入 PBS 补齐至 500 μ L, 12,000g、4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 弃掉滤液; 重复 4 次。倒置收集溶液 (取出超滤管内芯, 倒置于干净外管中, 4,000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 2min, 收集标记好的抗体) 加入等体积甘油置负 20 $^{\circ}$ C 保存。

注意: 1. 若待标记物分子量较小, 可自行准备合适分子量的透析袋或超滤管进行充分透析或者超滤管超滤。

2. 若上述反应液已超过 1mL, 请分多次加入, 离心超滤浓缩以后再加入 1 \times PBS 7.4 补充总体积到 0.5mL, 进行超滤纯化。

常见问题

1: 由于样本浓度低, 反应体积超过了最佳标记体系?

答: 如果浓缩后样本浓度仍小于 1mg/mL, 可适当调整反应体积, 但最终浓度应大于 0.5 mg/mL。标记缓冲液体积应为最终反应液 10%, 步骤 2 中可不添加去离子水。活化 HRP 溶液和标记终止液需保持不变。

2: 待标记样本分子量大小不同, 如何选择合适的超滤管?

答: 本产品配备的超滤管适用于分子量为 150KD-250KD 的样本。若您需要偶联的样本分子量大于 250KD 或小于 150KD, 为保证偶联最佳效果, 需另行配备大小合适的超滤管。选择的原则为: 超滤管的截留分子量 (MWCO) 通常应小于目标分子大小的 1/3。

3: 待标记样本与 HRP 摩尔比只能在 1:1 和 1:4 之间吗?

答: 不同样本, 最佳摩尔比不同。对于抗体, 建议不要超过 1:4。其它样本, 可以尝试不同比例。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
5. 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

PMK0571 单组份 TMB 显色液 (ELISA HRP 显色用)

PMK058M/S Actin mAb-HRP

PMK-014-091S HRP-Goat anti-Mouse IgG

更多产品详情了解, 请关注公众号:

