

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

EnAb™ 辣根过氧化物酶(HRP)抗体标记试剂盒

产品货号: RE80004p

产品规格: 80 μ g/400 μ g/4mg

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

Web: <https://www.enkilife.cn/>

E-mail: order@enkilife.cn

Tel: 027-87002838

产品简介

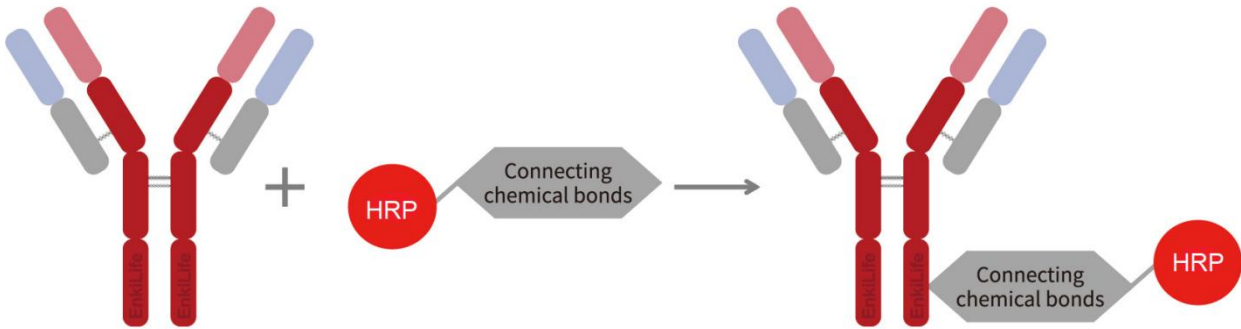
HRP 是一种从辣根（*Armoracia rusticana*）根部提取的氧化还原酶，属于过氧化物酶超家族，其可以催化过氧化氢（ H_2O_2 ）对底物的氧化反应，生成有色或荧光产物，常用于信号放大检测，如 ELISA、WB、原位杂交，分子生物学，生物传感器应用等。区别于常用的偶联方法，本 EnkiLife EnAb™ HRP 抗体标记试剂盒利用抗体上 Fc 区域氨基酸特性和 HRP 上特定氨基酸，采用定向偶联技术将抗体分子与 HRP 酶共价偶联。

产品特点

- ◆ 试剂盒组分齐全，操作简单，只要按照操作步骤进行便可得到高品质偶联抗体。
- ◆ 本试剂盒所配置的 HRP 为高纯度、高活性，针对底物催化效率更高。
- ◆ 本试剂采用定向偶联技术，HRP 和抗体都不会发生自连，保证偶联物的特异性和均一性。
- ◆ 试剂盒所使用的交联剂增加了延长臂，确保不会因为蛋白质位阻而影响应用效果。

标记原理

本试剂盒利用抗体上 Fc 区域氨基酸特性和 HRP 上特定氨基酸位点，采用定向偶联技术将抗体分子与 HRP 共价偶联。



产品组分

产品组分	不同规格组分含量			储存温度
	80 μ g 抗体	400 μ g 抗体	4mg 抗体	
活化的 HRP	1 管	5 管	5 管	-20°C, shading light
标记缓冲液 H	5mL	5mL	5 mL	4°C, shading light
抗体修饰试剂	60 μ L	60 μ L	60 μ L*2 只	-20°C, shading light
50 KD 超滤管*	1 set**	1 set**	1 set**	RT
封闭试剂	300 μ g	300 μ g	300 μ g*4 只	-20°C, shading light
DMSO(溶解封闭试剂)	50 μ L	50 μ L	200 μ L	-20°C, shading light
HRP 标记抗体保存液	1mL	1mL	5mL	2~8°C
建议标记抗体量	每管标记 20~80 μ g, 推荐标记 20 μ g	每管标记 20~80 μ g, 推荐标记 20 μ g	每管标记 200~800 μ g, 推荐标记 200 μ g	

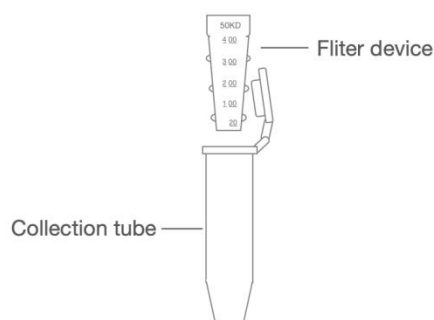
*超滤管使用说明：

若标记同一种生物分子，超滤管膜未破裂前可重复使用数次。

若标记不同生物分子，应更换不同超滤管，避免生物分子交叉污染。

**50 KD 超滤管如需更多数量，请联系我们提供。

***1 set 50 KD 超滤管(0.5 mL)包括 1 个滤芯（Filter device）和 2 个收集管（Collection tube）。



保存条件

未开封试剂盒可在-20℃保存1年，开封后按照储存温度存储，溶解后的HRP或试剂应尽快使用，最长可在-20℃或-80℃保存一周。

操作过程

实验前准备

1. 仔细阅读使用说明书。
2. 提前20分钟从冰箱中取出试剂盒，使试剂盒各组分平衡至室温。（注：不需要用到的试剂组分继续放置在冰箱中）。
3. DMSO在-20℃可能冻结，需要室温放置10分钟左右融化。
4. 超滤管浸润（用于抗体超滤浓缩换液）：向干燥的超滤管滤芯中加入450 μL 标记缓冲液 H，室温放置10分钟备用，在加入待标记物之前弃去标记缓冲液即可（整个标记过程中超滤管滤芯都应该保持湿润）。
5. 抗体准备：待标记抗体纯化除杂，浓度含量测定，请确保抗体样本符合下表标准

组分	试剂盒标记兼容性
叠氮钠<0.1%，甘油<50%，Tris<50mM，甘氨酸<50mM，Proclin <0.5%，EDTA<10mM，海藻糖<5%，蔗糖<5%，或其他小分子添加物	是，执行 抗体样本超滤浓缩换液 ，即标记步骤1.
腹水、血清、细胞培养上清中的抗体	否，执行纯化步骤后再使用本试剂盒
含BSA>0.1%	否，使用BSA去除试剂盒（如RE80028: BSA Removal Kit）纯化抗体后再使用本试剂盒
抗体浓度低于2mg/mL	是，执行 抗体样本超滤浓缩换液 ，即标记步骤1.
抗体浓度≥2mg/mL，且不含BSA（<0.1%），明胶（<0.1%）及小分子添加物等	是，不需要超滤浓缩换液，直接使用标记缓冲液H稀释至1mg/mL

标记步骤（适用于标记1~4mg抗体）

1. **抗体样本超滤浓缩换液**：取待标记抗体如1mg（纯度>90%），于超滤管滤芯中，并加入不超过超滤管滤芯最大体积的标记缓冲液，14000 × g 离心5分钟，弃去滤液；根据抗体中含有添加物情况可以重复此步骤1次，最后一次超滤完成得到60~100 μL，将超滤管滤芯倒置于收集管中，14000 × g 离心1分钟，收集得到的抗体溶液，根据抗体总量适当补足标记缓冲液至抗体浓度为4mg/ml左右。同时再将滤芯中补加适量标记缓冲液，保持湿润。
注：若待标记的抗体浓度大于6mg/mL，且不含杂质成分时（如抗体缓冲液为PBS），直接使用标记缓冲液稀释抗体至4mg/mL；
2. **抗体修饰**：按照1mg抗体加入20 μL **抗体修饰试剂** 比例修饰抗体，轻轻混匀后37℃反应60分钟。
3. **HRP和抗体偶联**：将5管活化的HRP（每管标记200~800 μg抗体）中每管加入50 μL 标记缓冲液，涡

旋混匀溶解后混合一共 250 μ L 直接加入至修饰后的抗体溶液中, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 1.5 小时或 4 $^{\circ}$ C 避光反应过夜。

4. **封闭纯化:** 在 300 μ g 封闭试剂管中加入 30 μ L DMSO 混匀溶解, 后按照 1mg 抗体加 30 μ L 封闭试剂, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 避光反应 30 分钟, 封闭未反应完的活性基团。将标记混合物再转入至 50 KD 超滤管, 使用标记缓冲液超滤 3~5 次后回收 HRP 标记混合物。

5. **保存:** 此时标记反应完成, HRP 标记混合物根据后续应用需求选择性添加 HRP 抗体保存液至合适浓度 (一般要求抗体浓度不小于 0.2mg/mL, 4 $^{\circ}$ C 避光保存, 请勿冻存, 一般可稳定保存半年以上)。

标记步骤 (适用于标记 100 μ g~400 μ g 抗体)

1. **抗体样本超滤浓缩换液:** 取待标记抗体如 100 μ g (纯度>90%), 于超滤管滤芯中, 并加入不超过超滤管滤芯最大体积的标记缓冲液, 14000 $\times$ g 离心 5 分钟, 弃去滤液; 根据抗体中含有添加物情况可以重复此步骤 1 次, 最后一次超滤完成得到 30~50 μ L, 将超滤管滤芯倒置于收集管中, 14000 $\times$ g 离心 1 分钟, 收集得到的抗体溶液, 根据抗体总量适当补足标记缓冲液至抗体浓度为 1mg/ml。同时再将滤芯中补加适量标记缓冲液, 保持湿润。

注: 若待标记的抗体浓度大于 2mg/mL, 且不含杂质成分时 (如抗体缓冲液为 PBS), 直接使用标记缓冲液稀释抗体至 1mg/mL;

2. **抗体修饰:** 按照 100 μ g 抗体加入 2 μ L **抗体修饰试剂** 比例修饰抗体, 轻轻混匀后 37 $^{\circ}$ C 反应 60 分钟。

3. **HRP 和抗体偶联:** 将 5 管活化的 HRP (每管标记 20 μ g~80 μ g 抗体) 每一管加入 10 μ L 标记缓冲液, 涡旋混匀溶解后混合得 50 μ L 直接加入至修饰后的抗体溶液中, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 1.5h 或 4 $^{\circ}$ C 避光过夜反应。

4. **封闭纯化:** 在 300 μ g 封闭试剂管中加入 30 μ L DMSO 混匀溶解, 后按照 100 μ g 抗体加 3 μ L 封闭试剂, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 避光反应 30 分钟, 封闭未反应完的活性基团。将标记混合物再转入至 50 KD 超滤管, 使用标记缓冲液超滤 3~5 次后回收 HRP 标记混合物。

5. **保存:** 此时标记反应完成, HRP 标记混合物根据后续应用需求选择性添加 HRP 抗体保存液至合适浓度 (一般要求抗体浓度不小于 0.2mg/mL, 4 $^{\circ}$ C 避光保存, 请勿冻存, 一般可稳定保存半年以上)。

标记步骤 (适用于标记 20 μ g~80 μ g 抗体)

1. **抗体样本超滤浓缩换液:** 取待标记抗体如 20 μ g (纯度>90%), 于超滤管滤芯中, 并加入不超过超滤管滤芯最大体积的标记缓冲液, 14000 $\times$ g 离心 5 分钟, 弃去滤液; 根据抗体中含有添加物情况可以重复此步骤 1 次, 最后一次超滤完成得到 20~30 μ L, 将超滤管滤芯倒置于收集管中, 14000 $\times$ g 离心 1 分钟, 收集得到的抗体溶液, 根据抗体总量适当补足标记缓冲液至抗体浓度为 1mg/ml。同时再将滤芯中补加适量标记缓冲液, 保持湿润。

注: 若待标记的抗体浓度大于 2mg/mL, 且不含杂质成分时 (如抗体缓冲液为 PBS), 直接使用标记缓冲液稀释抗体至 1mg/mL;

2. **抗体修饰:** 按照 20 μ g 抗体加入 0.5 μ L **抗体修饰试剂** 比例修饰抗体, 轻轻混匀后 37 $^{\circ}$ C 反应 60 分钟。

3. **HRP 和抗体偶联:** 将 1 管活化的 HRP (每管标记 20 μ g~80 μ g 抗体) 加入 10 μ L 标记缓冲液, 移液器吸打或者涡旋混匀溶解后直接加入至修饰后的抗体溶液中, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 1.5h 或 4 $^{\circ}$ C 避光过夜反应。

4. **封闭纯化:** 在 300 μ g 封闭试剂管中加入 30 μ L DMSO 混匀溶解, 后按照 20 μ g 抗体加 0.6 μ L 封闭试剂, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 避光反应 30 分钟, 封闭未反应完的活性基团。将标记混合物再转入至 50 KD 超滤管, 使用标记缓冲液超滤 3~5 次后回收 HRP 标记混合物。

5. **保存:** 此时标记反应完成, HRP 标记混合物根据后续应用需求选择性添加 HRP 抗体保存液至合适浓度 (一般要求抗体浓度不小于 0.2mg/mL, 4 $^{\circ}$ C 避光保存, 请勿冻存, 一般可稳定保存半年以上)。

注意事项

1. 本试剂盒最适合用于标记常规 IgG 类抗体（150kDa），IgM，IgA，IgE，IgY 等抗体也可标记，但按照本试剂盒步骤得到的偶联抗体可能不具有最佳使用效果，标记效率未知。各种重组抗体、抗体片段或纳米抗体等未使用此标记试剂盒进行过测试。
2. 本试剂盒中的活化 HRP 是经真空冷冻干燥处理的，一旦复溶请一次性使用完，溶解后未立即使用的随时间延长效能下降。
3. 封闭剂需现用现配，干粉溶解后不能长期保存。
4. 试剂盒组份在运输过程中可能造成颠倒，会使液体或干粉试剂粘到管壁或瓶盖上。使用前请离心处理，以使附着管壁或瓶盖的液体或干粉试剂沉积到管底。
5. 不同种类的标记试剂盒中的组分请勿混用。
6. 部分化学试剂有轻微毒性，请戴手套操作。

附录 1 超滤管使用说明

1. 本试剂盒配备的 50kD 超滤管，滤芯最大容积 500 μ L，其上有刻度标识，用户如初次使用，可提前加入一定体积标记缓冲液，查看判断刻度和体积的对应关系，增减调整超滤离心时间。
2. 超滤离心时间和蛋白样本或偶联物特性有关，某些抗体的离心浓缩时间需要根据实际情况进行调整，例如超滤浓缩 20 μ g 抗体至 20~30 μ L 时，可适当延长离心时间，使抗体浓度尽量接近 1mg/mL。
3. 超滤膜是超滤管的关键部件，吹打、混匀蛋白液时，注意不要碰到超滤膜。