

产品说明书

产品名称：辣根过氧化物酶偶联试剂盒 (HRP conjugation kit)

产品货号：BCS0005

产品规格：1 个反应

产品组分：

组分	浓度	体积	规格
S-Linker 标记辣根过氧化物酶	4.0 mg/mL	200 μ L	1 管, 棕色管, 棕色盖
L-Linker 标记液	5.0 nmol/ μ L	20 μ L	1 管, 棕色管, 棕色盖
2 \times L-Linker 标记缓冲液	2 \times	500 μ L	1 管, 透明管, 蓝色盖
1 \times 稀释缓冲液	1 \times	1mL	1 管, 透明管, 白色盖
10 \times 终止反应液	10 \times	100 μ L	1 管, 透明管, 红色盖
10K, 500 μ L 超滤管	/	/	1 个

储存条件：-20 $^{\circ}$ C 避光保存，有效期见外包装。

产品介绍

辣根过氧化物酶偶联试剂盒 (HRP conjugation kit) 包含已被 S-Linker 标记的辣根过氧化物酶。使用本试剂盒中的 L-Linker 对目标蛋白或抗体进行标记后, 即可直接与已被 S-Linker 标记的辣根过氧化物酶偶联, 得到辣根过氧化物酶标记的蛋白或抗体

整个过程步骤简洁, 操作简便快捷。本试剂盒可用于标记 50~200 μ g 的蛋白质, 所有试剂仅可进行 1 次标记。

蛋白质预处理

本试剂盒可以兼容低浓度的甘油 (终浓度<10%) 和 Tris (终浓度<20mM), 但不兼容甘氨酸和稳定蛋白。如需对商品化蛋白质进行标记, 建议联系供应商以确认蛋白质溶液的浓度, 以及是否含有稳定剂等信息。

蛋白性稳定剂可能会影响最终标记效果, 建议先进行纯化, 除去蛋白性稳定剂后再进行标记。

如需除去蛋白质溶液中的非蛋白性稳定剂 (如甘油、Tris、甘氨酸), 可使用试剂盒中的超滤管和 1 \times 稀释缓冲液进行缓冲溶液置换。操作步骤如下:

- 1、将适量蛋白质溶液加至超滤管中, 注意移液枪头不要触碰超滤膜。最大速率 (14,000~16,000 \times g) 离心 2 min, 使液体全部流入收集管, 去除收集管中的液体。
- 2、将等体积的 1 \times 稀释缓冲液加至超滤管中, 注意移液枪头不要触碰超滤膜。最大速率 (14,000~16,000 \times g) 离心 2 min, 使液体全部流入收集管, 去除收集管中的液体。重复清洗 2~3 次。
- 3、添加适当体积的 1 \times 稀释缓冲液至超滤管中, 使最终的蛋白质浓度不少于 1 mg/mL。小心吹吸缓冲液以重悬蛋白质, 注意移液枪头不要触碰超滤膜。
- 4、将上述超滤管倒放至新的离心管中, 12,000 \times g 离心 2 min, 收集离心管中的液体, 将其转移至干净的 EP 管中待用。

L-Linker 标记步骤

- 1、从 -20 $^{\circ}$ C 取出试剂盒中的所有组分, 恢复至室温后, 短暂离心, 使液体集中在离心管底部。
- 2、依据蛋白质/抗体的初始浓度计算需加入反应体系的体积, 依据下表将反应体系中的各组分进行混合 (50 μ L 反应体系):

组分	体积 (μ L)
L-Linker 标记液	2
2 \times L-Linker 标记缓冲液	25

本产品仅用于科研

www.nvcbiotech.com
Tel: 0512-67298826
Email: order@nvcbiotech.com

蛋白质/抗体 (100 µg)	X
ddH ₂ O	补足至 50

- 3、在室温避光摇晃反应 1 h 后，向反应体系中加入 1/10 体积的 10× 终止缓冲液，室温避光孵育 30 min，以终止反应。
- 4、取出 1 个干净的超滤管，加入 100 µL 1× 稀释缓冲液，平衡 5min，最大速率 (14,000~16,000×g) 离心 2 min，使液体全部流入收集管，去除收集管中的液体。
- 5、将上步的反应液全部转移至超滤管中，最大速率 (14,000~16,000×g) 离心 2 min，使液体全部流入收集管，去除收集管中的液体。
- 6、向上步的超滤管中加入 100 µL 1× 稀释缓冲液，小心重悬蛋白质/抗体后，最大速率 (14,000~16,000×g) 离心 2 min，使液体全部流入收集管，去除收集管中的液体。重复洗涤 2~3 次，直至残余的未结合 Linker 完全洗脱。
- 7、向上步的超滤管中加入适量的 1× 稀释缓冲液，使最终的蛋白质/抗体浓度不少于 1 mg/mL。小心吹吸缓冲液以重悬蛋白质/抗体，注意移液枪头不要触碰超滤膜。
- 8、将上步的超滤管倒置在新的收集管中，12,000×g 离心 2 min，收集离心管中的液体，将其转移至干净的 EP 管中。

辣根过氧化物酶-蛋白质/抗体偶联步骤

- 1、将已被 S-Linker 标记的辣根过氧化物酶与 L-Linker 标记的蛋白质/抗体以 1:1 的摩尔比混合，在室温避光摇晃反应 4 h。(必要时也可在 4°C 反应过夜，以提高偶联效果。)
- 2、偶联后的蛋白质/抗体可直接使用，如需长期保存，则需另加入适量的稳定剂后，存放于 -20°C。

注意事项：

- ①10K 超滤膜的截留分子量约为 10kDa，因此适用于对分子量大于 10kDa 的生物分子进行脱盐纯化，不能用于对小于此分子量的生物分子进行脱盐纯化。
- ②蛋白质在标记反应体系中的终浓度高于 1 mg/mL 时，标记效率较高。因此如进行标记前，蛋白质的初始浓度较低时，也可使用超滤管进行浓缩，使其初始浓度高于 2 mg/mL。
- ③当反应体系的 pH 为弱碱性时，标记效率较高。因此进行标记前，蛋白质溶液的 pH 呈酸性或强碱性时，可先使用试剂盒中的超滤管和 1× 稀释缓冲液对蛋白质溶液进行置换。
- ④试剂盒中的超滤管可一次性容纳的最大样本体积为 500 µL，可浓缩的最小体积为 20 µL，膜上的滞留体积小于 5 µL。使用时应避免移液枪头触碰超滤膜，以免撕裂或穿刺超滤膜，导致蛋白质损失。