

一. 概述

辣根过氧化物酶 (POD) 和碱性磷酸酶 (ALP) 由于其与底物反应特异性高、稳定性好、在化学修饰中活性损失非常小，且有比色法、荧光法、化学发光法等多种选择，因此是酶联免疫分析 (EIA) 中最常用的酶。一般来说POD或ALP标记抗原、抗体等后，进行抗原-抗体反应。POD或ALP和靶分子上的氨基或巯基部位结合，形成一种稳定结合的标记体。

Peroxidase Labeling Kit和Alkaline Phosphatase Labeling Kit是可以在靶分子的氨基或巯基上标记POD或ALP的试剂盒。由于POD和ALP已经通过修饰琥珀酰亚胺酯基、马来酰亚胺基而活化，只需与靶分子混合就可得到标记体。整个反应过程在1支过滤管中进行，3小时内就可得到目的标记体。

本章介绍用Peroxidase Labeling Kit和Alkaline Phosphatase Labeling Kit的标记方法。

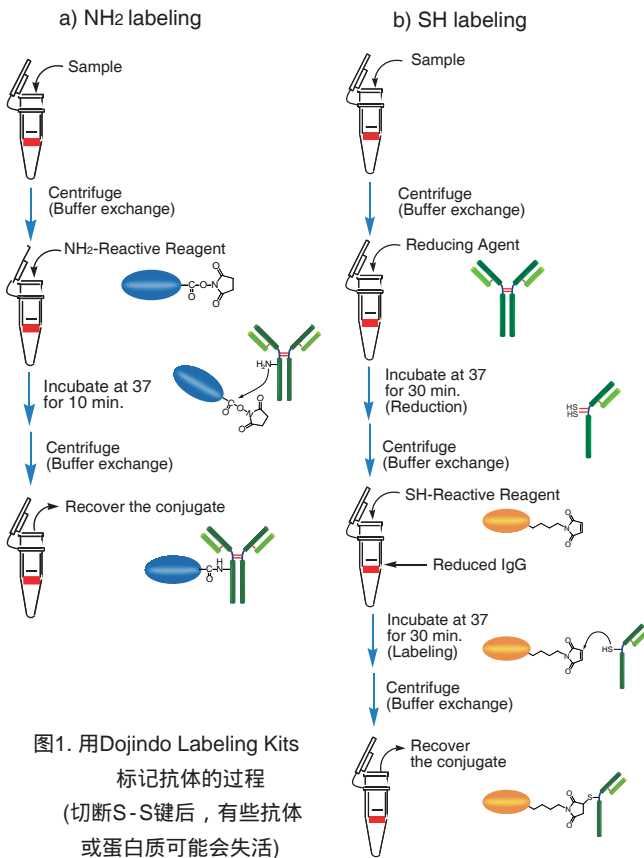


图1. 用Dojindo Labeling Kits 标记抗体的过程 (切断S-S键后，有些抗体或蛋白质可能会失活)

二. 用Peroxidase Labeling Kit-NH₂在氨基上标记POD (货号：LK11, LK51)

. 试剂盒内含

3 samples (1个sample可以标记50-200 μg的靶分子) :
 NH₂-Reactive Peroxidase 100 μg × 3管
 Reaction Buffer 200 μl × 1管
 Washing Buffer 4 ml × 1瓶

Storage Buffer 4 ml × 1瓶
 过滤管 3支

1 mg (可以标记1 mg的靶分子) :

NH₂-Reactive Peroxidase 1 mg × 1管
 Reaction Buffer 1.2 ml × 1管
 过滤管 1支
 Washing Buffer 10 ml × 1瓶
 Storage Buffer 10 ml × 1瓶
 15 ml Tube 1支

. 所需的设备和材料

3 samples : 微型离心机, 10 μl 和50-200 μl移液器, 37 培养箱, 微量管

1 mg : 适用15 ml离心管的离心机, 50-200 μl以及1 ml的移液器, 37 培养箱, 小试管

. 储存条件

试剂盒在0-5 保存。如NH₂-Reactive Peroxidase开封后需要封入氮气，并在-20 保存。

. 注意事项

1. 所需标记的较大的蛋白质的分子量要>50,000。
2. 所需标记的较小的氨基化合物的分子量要<5,000。
3. 标记过程中，标记前后的IgG总是在过滤管的滤膜上。
4. 如果IgG溶液含有其它分子量超过10,000的蛋白质，如BSA或凝胶，在使用该试剂盒标记前请先纯化IgG溶液。IgG溶液能够使用IgG Purification Kits来纯化(不包含于此试剂盒中)。
5. 如果IgG溶液中含有小的不溶物，离心后提取上清液来标记。

. 标记IgG操作步骤 (以LK11 3 samples为例)



1 将100 μl Washing Buffer以及含有50-200 μg IgG的样品溶液加入到过滤管中。^{a)}



2 在8,000-10,000 × g离心10 min后，加入100 μl Washing Buffer再离心一次。^{b)}



3 将10 μ l Reaction Buffer加入到NH₂-Reactive Peroxidase中并用移液器吹打使其溶解。



4 将含有NH₂-Reactive Peroxidase的溶液转移到IgG所集中的过滤管的滤膜上。



5 用移液器吸取溶液吹吸净整个滤膜表面，然后将过滤管放入培养箱中，在37 $^{\circ}$ C培养2 h。



6 将100 μ l Washing Buffer加入到过滤管中。如果滤液的体积超过300 μ l，在进行步骤7前需要先去弃滤液。



7 在8,000-10,000 \times g离心10 min。^{b)}



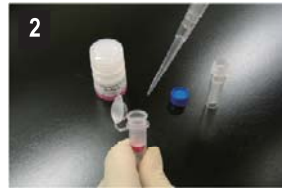
8 加入200 μ l Storage Buffer并用移液器吹打10-15次来回收标记产物。^{c)} 将溶液转移至微量管中，并储存于0-5 $^{\circ}$ C下。^{d)}

- a) 推荐的IgG的量为100 μ g，样品溶液的体积不应超过100 μ l。如果抗体浓度低于0.5 mg/ml，重复步骤1和2直至总的IgG聚积量达到50-200 μ g。如果在聚积过程中，滤液体积达到或超过了400 μ l，则需在进行下一步离心前将滤液除去。
- b) 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- c) 标记产物的浓度为0.5-1.3 mg/ml。在进行后续的酶免疫、免疫印迹、免疫转染实验前先将标记后的IgG稀释至适当的浓度。每个IgG分子上会被标记上1-3个辣根过氧化物酶分子。没有被结合的辣根过氧化物酶不会干扰正常的免疫实验。如果一定要纯化的话，可以使用凝胶渗透柱或亲和柱。
- d) 通常辣根过氧化物酶标记后的IgG在Storage Buffer中，0-5 $^{\circ}$ C下至少能够保存2个月，如果需要保存更久，可以添加等量的丙三醇（终浓度：50%），并在-20 $^{\circ}$ C下存放。但是还要注意样品自身是否稳定。

标记小分子操作步骤：



1 用Reaction Buffer制备50 μ l，1 mM的氨基化合物溶液，^{a)}并将该溶液加入到NH₂-Reactive Peroxidase管中。吹打数次使其充分混合，然后置于37 $^{\circ}$ C下培养1 h。



2 将100 μ l Washing Buffer加入到反应液中并将整个溶液全部移入过滤管中。



3 在8,000-10,000 \times g离心10 min，^{b)}弃滤液，向管中加入200 μ l Washing Buffer。再重复该过程一次，然后再在8,000-10,000 \times g离心10 min。^{b)}



4 加入200 μ l Storage Buffer并用移液器吹打10-15次来回收抗体。^{c)} 将此溶液转移至一支微量管中，并储存于0-5 $^{\circ}$ C下。^{d)}

- a) 如果氨基化合物无法在水溶液中溶解，可以用DMSO使其溶解，制备成10 mM的溶液，取5 μ l与45 μ l Reaction Buffer混合。
- b) 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- c) 标记产物的浓度大约为400-500 μ g/ml (10-12.5 μ M)。1-2个靶分子能够和1个辣根过氧化物酶分子结合。
- d) 标记后的小分子在0-5 $^{\circ}$ C下能够存放至少6个月。

三. 用Peroxidase Labeling Kit - SH在SH基上标记POD (货号：LK09，LK53)

. 试剂盒内含

- 3 samples (1个sample可以标记50-200 μ g的靶分子)：
- SH- Reactive Peroxidase 100 μ g \times 3管
 - Reducing Agent 3管
 - Solution A 4 ml \times 1瓶
 - Solution B 1 ml \times 1管
 - Reaction Buffer 200 μ l \times 1管
 - Storage Buffer 4 ml \times 1瓶
 - 过滤管 3支
- 1 mg (可以标记1 mg的靶分子)：
- SH- Reactive Peroxidase 1 mg \times 1管
 - Reducing Agent 1管
 - Solution A 10 ml \times 1瓶
 - Solution B 4 ml \times 1瓶

P-34 如何用辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶标记抗体

Reaction Buffer 0.6 ml × 1管
 Storage Buffer 10 ml × 1瓶
 过滤管 1支
 15 ml Tube 1支

所需的设备和材料

3 samples: 微型离心机, 50-200 μl移液器, 37 °C 培养箱, 微量管

1 mg: 适用15 ml离心管的离心机, 50-200 μl以及1 ml的移液器, 37 °C 培养箱, 小试管

储存条件

试剂盒在0~5 °C 保存。如SH-Reactive Peroxidase开封后, 在-20 °C 保存。

注意事项

1. 所需标记的较大的蛋白质的分子量要>50,000。
2. 所需标记的较小的氨基化合物的分子量要<5,000。
3. 标记过程中, 标记前后的IgG总是在过滤管的滤膜上。
4. 如果IgG溶液含有其它分子量超过10,000的蛋白质, 如BSA或凝胶, 在使用该试剂盒标记前请先纯化IgG溶液。IgG溶液能够使用IgG纯化试剂盒来纯化(不包含于此试剂盒中)。
5. 如果IgG溶液中含有小的不溶物, 离心后提取上清液来标记。

标记IgG操作步骤 (以LK09 3 samples为例)



1 将100 μl Solution A以及含有50-200 μg IgG的样品溶液加入到过滤管中。^{a)}



2 用移液器使溶液混合, 在8,000-10,000 × g离心10 min。^{b)}



3 将150 μl Solution A加入到Reducing Agent中并用移液器吹打使其溶解。



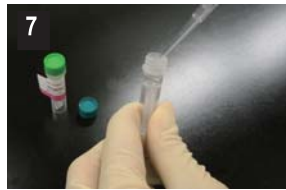
4 将100 μl步骤3所得溶液转移到IgG所集中的过滤管的滤膜上。



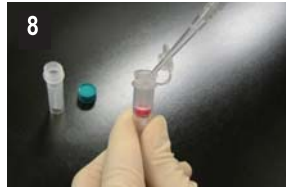
5 用移液器吹打数次, 然后在37 °C 下培养30 min。



6 将100 μl Solution B加入到过滤管中, 在8,000-10,000 × g离心10 min。除去滤液, 加入200 μl Solution B, 再离心一次。^{b)}



7 将50 μl Reaction Buffer加入到SH-Reactive Peroxidase中并用移液器吹打使其溶解。



8 将SH-Reactive Peroxidase溶液移到被还原的IgG所集中的过滤管的滤膜上。



9 用移液器吹打数次, 然后在37 °C 下培养1 h。



10 将100 μl Solution A加入到试管中, 在8,000-10,000 × g离心10 min。^{b)}



11 加入200 μl Storage Buffer并吹打10-15次来回收标记产物。^{c)}将此溶液转移至一支微量管中, 并储存于0-5 °C。^{d)}

- a) 推荐的IgG的量为100 μg, 样品溶液的体积不应超过100 μl。如果抗体浓度低于0.5 mg/ml, 重复步骤1和2直至总的IgG聚积量达到50-200 μg。如果在聚积过程中, 滤液体积超过了400 μl, 则需在进行下一步离心前将滤液除去。
- b) 如果溶液在离心后仍然残留在膜上, 可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- c) 标记产物的浓度为0.5-1.3 mg/ml。在进行后续的酶免疫、免疫印迹、免疫转染实验前先将标记后的IgG稀释至适当的浓度。每个还原后的IgG分子上会被标记上1-2个辣根过氧化物酶分子。没有被结合的辣根过氧化物酶不会干扰正常的免疫实验。如果一定要纯化的话, 可以使用凝胶渗透柱或亲和柱。

P-34 如何用辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶标记抗体

d) 通常辣根过氧化物酶标记后的还原型IgG在Storage Buffer中，0-5 °C下至少能够保存2个月，如果需要保存更久，可以添加等量的丙三醇（终浓度：50%），并在-20 °C下存放。但是还要注意样品自身是否稳定。

标记小分子操作步骤：



1 用Reaction Buffer制备50 μ l，1 mM的巯基化合物溶液，^{a)}并将该溶液加入到SH-Reactive Peroxidase管中。吹打数次使其充分混合，然后置于37 °C下培养1 h。



2 将100 μ l Solution A加入到反应液中并将整个溶液全部移入过滤管中。



3 在8,000-10,000 \times g离心10 min，^{b)}弃滤液，向管中加入200 μ l Solution A。再重复该过程一次，然后再在8,000-10,000 \times g离心10 min。^{b)}



4 加入200 μ l Storage Buffer并用移液器吹打10-15次来回收抗体。^{c)}将此溶液转移至一支微量管中，并储存于0-5 °C下。^{d)}

- 如果巯基化合物无法在水溶液中溶解，可以用DMSO使其溶解，制备成10 mM的溶液，取5 μ l与45 μ l Reaction Buffer混合。
- 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- 标记产物的浓度大约为400-500 μ g/ml (10-12.5 μ M)。1-2个靶分子能够和1个辣根过氧化物酶分子结合。
- 标记后的小分子在0-5 °C下能够存放至少6个月。

四. 用Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH₂在氨基上标记ALP (货号：LK12, LK59)

试剂盒内含

3 samples (1个sample可以标记50-200 μ g的靶分子)：

NH ₂ -Reactive ALP	100 μ g \times 3管
Washing Buffer	4 ml \times 1瓶
Reaction Buffer	200 μ l \times 1管
Storage Buffer	4 ml \times 1瓶
过滤管	3支

1 mg (可以标记1 mg的靶分子)：

NH ₂ -Reactive ALP	1 mg \times 1管
Washing Buffer	10 ml \times 1瓶
Reaction Buffer	1.2 ml \times 1管
Storage Buffer	10 ml \times 1瓶

过滤管	1支
15 ml Tube	1支

* ALP : Alkaline Phosphatase

所需的设备和材料

3 samples：微型离心机，10 μ l和50-200 μ l移液器，37 °C培养箱，微量管

1 mg：适用15 ml离心管的离心机，50-200 μ l以及1 ml的移液器，37 °C培养箱，小试管

储存条件

试剂盒在0-5 °C保存。如NH₂-Reactive Alkaline Phosphatase开封后，在-20 °C保存。

注意事项

- 所需标记的较大的蛋白质的分子量要>50,000。
- 所需标记的较小的氨基化合物的分子量要<5,000。
- 标记过程中，标记前后的IgG总是在过滤管的滤膜上。
- 如果IgG溶液含有其它分子量>10,000的蛋白质，如BSA或凝胶，在使用该试剂盒标记前请先纯化IgG溶液。IgG溶液能够使用IgG纯化试剂盒来纯化（不包含于此试剂盒中）。
- 如果IgG溶液中含有小的不溶物，离心后提取上清液来标记。

标记IgG操作步骤 (以LK12 3 samples为例)



1 将100 μ l Washing Buffer以及含有50-200 μ g IgG的样品溶液加入到过滤管中。^{a)}



2 在8,000-10,000 \times g离心10 min后，加入100 μ l Washing Buffer再离心一次。^{b)}



3 将10 μ l Reaction Buffer加入到NH₂-Reactive ALP中并用移液器吹打使其溶解。



4 将含有NH₂-Reactive ALP的溶液转移到IgG所集中的过滤管的滤膜上。



5 用移液器吸取溶液吹洗净整个滤膜表面，然后将过滤管放入培养箱中，在37 °C培养2 h。



6 加入190 µl Storage Buffer 并吹打10-15次来回收标记产物。将溶液转移至微量管中，并储存于0-5 °C下。

- a) 推荐的IgG的量为100 µg，样品溶液的体积不应超过100 µl。如果抗体浓度低于0.5 mg/ml，重复步骤1和2直至总的IgG聚积量达到50-200 µg。
- b) 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- c) 标记后共轭物的浓度为0.5-1.3 mg/ml。在进行后续的酶免疫、免疫印迹、免疫转染实验前先将标记的IgG稀释至适当的浓度。每个IgG分子上会被标记上1-3个碱性磷酸酶分子。没有被结合的碱性磷酸酶不会干扰正常的免疫实验。如果一定要纯化的话，可以使用凝胶渗透柱或亲和柱。
- d) 通常碱性磷酸酶标记的IgG在Storage Buffer中，0-5 °C下至少能够保存2个月，如果需要保存更久，可以在-20 °C下存放。但还要注意样品自身是否稳定。

标记小分子操作步骤：



1 用Reaction Buffer制备50 µl，1 mM的氨基化合物溶液，并将该溶液加入到NH₂-Reactive ALP管中。吹打数次使其充分混合，然后置于37 °C培养1 h。



2 将100 µl Washing Buffer加入到反应液中并将整个溶液全部移入过滤管中。



3 在8,000-10,000 × g离心10 min，^{b)}弃滤液，向管中加入200 µl Washing Buffer。再重复该过程一次，然后再在8,000-10,000 × g离心10 min。^{b)}



4 加入200 µl Storage Buffer并用移液器吹打10-15次来回收抗体。将此溶液转移至微量管中，并储存于0-5 °C下。

- a) 如果氨基化合物无法在水溶液中溶解，可以用DMSO使其溶解，制备成10 mM的溶液，取5 µl与45 µl Reaction Buffer混合。

- b) 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- c) 标记产物的浓度大约为400-500 µg/ml (10-12.5 µM)。1-2个靶分子能够和1个碱性磷酸酶分子结合。
- d) 标记后的小分子在0-5 °C下能够存放至少6个月。

五. 用Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH在SH基上标记ALP (货号：LK13, LK61)

. 试剂盒内含

- 3 samples (1个sample可以标记50-200 µg的靶分子)：
- SH-Reactive ALP 100 µg × 3管
 - Reducing Agent 3管
 - Solution A 4 ml × 1瓶
 - Solution B 1 ml × 1管
 - Reaction Buffer 200 µl × 1管
 - Storage Buffer 4 ml × 1瓶
 - 过滤管 3支
- 1 mg (可以标记1 mg的靶分子)：
- SH-Reactive ALP 1 mg × 1管
 - Reducing Agent 1管
 - Solution A 10 ml × 1瓶
 - Solution B 4 ml × 1管
 - Reaction Buffer 0.6 ml × 1管
 - Storage Buffer 10 ml × 1瓶
 - 过滤管 1支
 - 15 ml Tube 1支

. 所需的设备和材料

- 3 samples：微型离心机，50-200 µl移液器，37 °C培养箱，微量管
- 1 mg：适用15 ml离心管的离心机，50-200 µl以及1 ml的移液器，37 °C培养箱，小试管

. 储存条件

试剂盒在0-5 °C保存。NH₂-Reactive Peroxidase开封后，在-20 °C保存。

. 注意事项

- 1. 所需标记的较大的蛋白质的分子量要>50,000。
- 2. 所需标记的较小的巯基化合物的分子量要<5,000。
- 3. 标记过程中，标记前后的IgG总是在过滤管的滤膜上。
- 4. 如果IgG溶液含有其它分子量超过10,000的蛋白质，如BSA或凝胶，在使用该试剂盒标记前请先纯化IgG溶液。IgG溶液能够使用IgG Purification Kits来纯化(不包含于此试剂盒中)。
- 5. 如果IgG溶液中含有小的不溶物，离心后提取上清液来标记。

标记IgG操作步骤 (以LK13 3 samples为例)



1 将100 μ l Solution A以及含有50-200 μ g IgG的样品溶液加入到过滤管中。^{a)}



2 用移液器使溶液混合，在8,000-10,000 \times g离心10 min。^{b)}



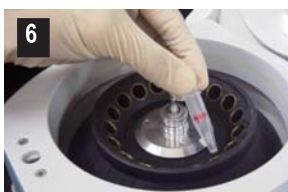
3 将150 μ l Solution A加入到Reducing Agent中并用移液器吹打使其溶解。



4 将100 μ l步骤3所得溶液转移到IgG所集中的过滤管的滤膜上。



5 用移液器吹打数次，然后在37 $^{\circ}$ C下培养30 min。



6 将100 μ l Solution B加入到过滤管中，在8,000-10,000 \times g离心10 min。除去滤液，加入200 μ l Solution B，再离心一次。^{b)}



7 将50 μ l Reaction Buffer加入到SH-Reactive ALP中并用移液器吹打使其溶解。



8 将SH-Reactive ALP溶液移到被还原的IgG所集中的过滤管的滤膜上。



9 用移液器吹打数次，然后在37 $^{\circ}$ C下培养1 h。



10 加入150 μ l Storage Buffer并吹打10-15次来回收标记产物。^{c)} 将此溶液转移至一支微量管中，将其储存在0-5 $^{\circ}$ C。^{d)}

- a) 推荐的IgG的量为100 μ g，样品溶液的体积不应超过100 μ l。如果抗体浓度低于0.5 mg/ml，重复步骤1和2直至总的IgG聚积量达到50-200 μ g。
- b) 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- c) 标记产物的浓度为0.5-1.3 mg/ml。在进行后续的酶免疫、免疫印迹、免疫转染实验前先将标记的IgG稀释至适当的浓度。每个还原后的IgG分子上被标记上1-2个碱性磷酸酶分子。没有被结合的碱性磷酸酶不会干扰正常的免疫实验。如果一定要纯化的话，可以使用凝胶渗透柱或亲和柱。
- d) 通常碱性磷酸酶标记的还原型IgG在Storage Buffer中，0-5 $^{\circ}$ C下至少能够保存2个月，如果需要保存更久，可以在-20 $^{\circ}$ C下存放。但还要注意样品自身是否稳定。

标记小分子操作步骤：



1 用Reaction Buffer制备50 μ l，1 mM的巯基化合物溶液，^{a)}并将该溶液加入到SH-Reactive ALP管中。吹打数次使其充分混合，然后置于37 $^{\circ}$ C下培养1 h。



2 将100 μ l Solution A加入到反应液中并将整个溶液全部移入过滤管中。



3 在8,000-10,000 \times g离心10 min，^{b)}弃滤液，向管中加入200 μ l Solution A。再重复该过程一次，然后再在8,000-10,000 \times g离心10 min。^{b)}



4 加入200 μ l Storage Buffer并用移液器吹打10-15次来回收抗体。^{c)} 将此溶液转移至微量管中，并储存于0-5 $^{\circ}$ C。^{d)}

- a) 如果巯基化合物无法在水溶液中溶解，可以用DMSO使其溶解，制备成10 mM的溶液，取5 μ l与45 μ l Reaction Buffer混合。
- b) 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- c) 标记产物的浓度大约为400-500 μ g/ml (10-12.5 μ M)。1-2个靶分子能够和1个碱性磷酸酶分子结合。
- d) 标记后的小分子在0-5 $^{\circ}$ C下能够存放至少6个月。