

抗体的标记修饰

抗体可以通过不同的化学试剂交联到酶（辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶）、荧光染料（FITC、PE、APC等）、生物素（Biotin）、胶体金等。

抗体/蛋白的辣根过氧化物酶(HRP)标记

抗体标记HRP最为经典的方法为 NaIO_4 氧化法，先将HRP糖基氧化成醛基，醛基与抗体的 $-\text{NH}_2$ 反应生成希夫氏碱，抗体分子与HRP分子形成稳定结构。标记的时候一般按照抗体分子与HRP分子摩尔比1:4的比例进行标记，此时两者的质量约为1:1。

SOP34 抗体/蛋白的HRP标记（ NaIO_4 氧化法）

1. 抗体/蛋白的处理

（1）待标记抗体/蛋白在50mM碳酸盐缓冲液（0.015M Na_2CO_3 ，0.035M NaHCO_3 ，pH9.6）中透析，其间换液两次，抗体/蛋白浓度调整为2mg/ml；或者将高浓度的抗体用0.5M碳酸盐缓冲液（0.15M Na_2CO_3 ，0.35M NaHCO_3 ，pH9.6）稀释到2mg/ml，如果原抗体/蛋白溶液中含有Tris、 NH_4^+ 等游离氨基的试剂，必须透析除去。

2. HRP酶的氧化

（1）称取2mg HRP干粉（Frdbio）溶于100 μl ddH₂O中。
（2）称取 NaIO_4 21mg，溶于1ml的ddH₂O中，吸取100 μl NaIO_4 溶液与100 μl 的HRP溶液缓慢混合，4 $^\circ\text{C}$ 下静置

30min，此时溶液为深绿色。

注意：此后的操作均在避光条件下进行。

（3）吸取2 μl 乙二醇缓慢加入氧化后的HRP溶液，室温避光静置30min，此时溶液为褐色。

3. 抗体的标记

（1）将氧化好的HRP溶液直接加入到已处理好的抗体/蛋白溶液中，室温反应2h。

（2）称取0.4mg的 NaBH_4 ，溶解于20 μl 的ddH₂O中，全部加入上步反应液中，4 $^\circ\text{C}$ 静置2h，每30min摇动一次。

（3）PBS(pH7.2)透析过夜，标记液中加入体积比30%~50%的甘油，混匀后置于-20 $^\circ\text{C}$ 保存。

抗体/蛋白的HRP标记（戊二醛法）

参照多肽与载体偶联相关“SOP 12 GA(Glutaraldehyde,戊二醛)介导多肽与载体偶联”。

抗体/蛋白的FITC标记

SOP35 抗体/蛋白的FITC标记

1. 将待标记的抗体/蛋白（浓度 $\geq 1\text{mg/ml}$ ）对标记反应液（90mM NaHCO_3 ，10mM Na_2CO_3 ，126mM NaCl ，pH9.0）于4 $^\circ\text{C}$ 透析三次。

2. 将FITC(Frdbio)溶于DMSO中，浓度为20mg/ml。

每次交联使用的FITC均应新鲜配制，避光。

3. （抗体/蛋白质：FITC）=1mg:150 μg 的比例将FITC缓慢加入于抗体溶液中，边加边轻轻摇动使其与抗体混合均匀，避光4 $^\circ\text{C}$ 反应8h。

4. 加入5M的 NH_4Cl 至终浓度50mM，4 $^\circ\text{C}$ 终止反应2h。

5. 将标记产物在PBS中透析四次以上，至透析液清亮。

6. 交联物的鉴定

蛋白浓度(mg/ml)=[$A_{280}-0.31 \times A_{495}$]/1.4

抗体/蛋白质：FITC比例= $3.1 \times A_{495}/(A_{280}-0.31 \times A_{495})$ ，该值应介于2.5~6.5之间。

7. FITC标记的蛋白应置于pH7.4的磷酸盐缓冲液中，加入0.1% NaN_3 、1% BSA，30%甘油，短期保存于4 $^\circ\text{C}$ 避光，长期应该-20 $^\circ\text{C}$ 避光保存。

抗体/蛋白的生物素（Biotin）标记

一般每个抗体可以标记3~5个生物素，标记时，生物素与抗体的比率受抗体浓度影响，对于10 mg/ml的抗体溶液来说，生物素应超过蛋白12倍（摩尔数），对于2 mg/ml的抗体溶液应超过20倍，生物素也可以直接以粉末的形式加入蛋白溶液中。

待标蛋白样品不得含有叠氮钠、BSA、甘氨酸、Tris或其他任何含有自由氨基的添加物。

SOP36 抗体/蛋白的生物素 (Biotin) 标记

1. 抗体/蛋白的前处理:

- (1) 选择适当分子量截留的超滤柱中加入400μl 标记反应溶液 (0.1M PBS pH 7.2), 加入1mg抗体, 混匀。
- (2) 4℃, 6,000rpm, 离心2min, 弃滤液; 于超滤柱中再加入200μl 标记反应溶液, 混匀。4℃, 6,000rpm, 离心2min。
- (3) 重复步骤(2) 6~7次。
- (4) 混匀超滤柱中的残留的液体, 室温静置1min; 将超滤柱反转倒置于一新的超滤管中, 4℃, 6,000rpm离心2min, 收集液体。
- (5) 取50μl PBS于超滤柱中混匀, 静置1min。倒置超滤柱, 4℃, 6,000rpm离心2min, 收集液体。

(6) 步骤(4) 与步骤(5) 的收集的滤液合并, 用标记反应溶液调节抗体浓度到2mg/ml, 4℃放置备用。

抗体/蛋白前处理亦可用透析完成。

2. 生物素的标记:

(7) 将生物素溶解在合适的溶剂中 (请参照所选购生物素的说明书, 不同的生物素其溶剂不同), 浓度为20mg/ml, 按照生物素与抗体分子摩尔比1:20的比例加入抗体溶液, 室温反应1h。

(8) 葡聚糖凝胶分离纯化/透析袋或者超滤管去除游离生物素及其他试剂。

(9) 将标记抗体于合适的抗体保存液-20℃保存备用。

进行抗体标记的时候, 需要对抗体性质、交联剂和标记物的性质非常了解, 否则很难标记出高品质的抗体; 标记量低, 导致信号值低; 标记量太高, 不但容易造成背景, 并且还容易由于标记物的聚集造成信号拮抗, 反而降低或者淬灭信号值。标记物的种类繁多, 不同类型的标记物其性质完全不一样, 标记物很难选择和把握, 建议初学者使用专业化的试剂盒进行标记, 或者直接委托专业化公司标记。福因德生物提供以下抗体标记相关产品, 同时可以提供抗体/蛋白标记服务。

货号	产品名称	规格	产品描述
ARL0010K	Frdbio® HRP标记试剂盒	0.2/0.5/1/5ml	快速标记HRP, 简单易行, 标记效率高。
ARL0021K	Frdbio® FITC快速标记试剂盒	0.5/4.0/15ml	快速标记FITC, 简单易行, 标记效率高。
ARL0020SK	Frdbio® 超级生物素快速标记试剂盒	0.5/4.0/15ml	长臂生物素快速标记。
ARL0020K	Frdbio® 生物素标记试剂盒	0.5/4.0/15ml	生物素快速标记。
IMR0203	Frdbio® HRP标记抗体保存液	50ml/100ml	用于HRP抗体标记物保存, 即保证酶活又保证抗体活性。
IMR0200	Frdbio® 通用型抗体标记物保存液	50ml/100ml	用于保存标记物, 同时保证抗体和标记物活性。
IMR0205	Frdbio® Biotin标记抗体保存液	50ml/100ml	用于保存Biotin标记物, 同时保证抗体和标记物活性。
IMR0205	Frdbio® FITC标记抗体保存液	50ml/100ml	用于保存FITC标记物, 同时保证抗体和标记物活性。
SAB00100	Frdbio® HRP标记链霉亲和素 HRP-conjugated Streptavidin	100μl/500μl	配合抗体的生物素标记使用, 生物素与链霉亲和素系统亲和力比抗原抗体结合高得多。
ARL0010	Frdbio® HRP酶	5mg/50mg/500mg	酶活性高,RZ>3.0
ARL0021	Frdbio® 异硫氰酸荧光素 (FITC)	5mg/50mg/500mg	氨基反应荧光试剂, 可与抗体/蛋白结合反应。
ARL0020	Frdbio® 生物素 (Biotin)	5mg/50mg/500mg	水溶性生物素, 可以与抗体蛋白氨基反应。
ARL0020S	Frdbio® 超级生物素 (SuperBiotin)	5mg/50mg/500mg	水溶性长臂生物素, 可以与蛋白/抗体氨基反应, 加长臂避免位阻, 标记效果更好。

更多信息, 请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

服务编号	服务名称	服务描述
BCS0010	抗体标记服务	根据抗体性质和客户要求进行抗体标记, 可标记FITC,HRP,Biotin等, 具体请垂询。

更多信息, 请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

对于抗体的标记方面, 在此就不多赘述, 我们将另开专题《生物标记》专门介绍, 我们将系统介绍更多标记物以及标记方法, 适用于不同研究领域。