

# 实验七 辣根过氧化物酶标记抗体

## 一 教学要求

- 学习免疫标记技术的种类及应用
- 学习应用辣根过氧化物酶标记抗体的操作

## 二 实验原理

### (1) 免疫标记技术

免疫标记技术是将一些既易测定又具有高度敏感性的物质标记到特异性抗原或抗体分子上，通过这些标记物的增强放大效应来显示反应系统中抗原或抗体的性质与含量。常用的标记物包括荧光素、酶和放射性核素等，用这3种标记物进行标记的免疫检测技术被称为3大免疫标记技术。目前，使用的免疫标记物还有化学发光物质、铁蛋白和胶体金等。

## (2) 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体的原理

### a. 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP )

HRP广泛分布于植物界，它是由无色的酶蛋白和棕色的铁卟啉结合而成的糖蛋白，糖含量18%。HRP由多个同工酶组成，分子量为40,000,等电点为pH3~9，酶催化的最适PH因供氢体不同而稍有差异，但多在pH5左右。酶溶于水和58%以下的硫酸铵溶液。HRP的辅基和酶蛋白最大吸收光谱分别为403nm和275nm，一般以OD403nm / OD275nm的比值RZ(德文Reinheit Zahl)表示酶的纯度。


HRP的催化反应需要底物过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和供氢体(DH<sub>2</sub>)。供氢体多为无色的还原型染料，通过反应可生成有色的氧化型染料(D)。



## b. 辣根过氧化物酶标记方法

酶标记抗体的制备方法主要有两种，即戊二醛交联法和过碘酸盐氧化法。

辣根过氧化物酶的标记常用过碘酸盐氧化法，这种方法只适用于含糖量较高的酶。过碘酸钠将HRP分子表面的多糖氧化为醛基，醛基与抗体分子上的氨基形成Schiff碱而结合。后者可进一步用 $\text{NaBH}_4$  (或乙醇胺)还原生成稳定的酶标记抗体。

A nighttime photograph of a cityscape with a fountain in the foreground. The sky is dark blue, and the city lights are visible in the background. The fountain is illuminated, and its water is spraying upwards. The overall scene is dark and atmospheric.

在酶标过程中一般都混有未结合的酶和抗体。游离酶理论上不影响最终的显色。但游离的抗体则不同，它会与酶标抗体竞争固相抗原，从而减少了结合到固相上的酶标抗体的量。因此需要对制备的酶结合物进行纯化，去除游离的酶和抗体。纯化的方法很多，硫酸铵盐析法最为简便，但效果并不理想。用离子交换层析、分子筛法可得到最佳的分离效果，但费用较贵。

# 三 材料与器材（略）

厦门大学生命科学国家级实验教学示范中心



## 四 操作步骤

- (1) 称取5mgHRP溶解于0.5ml蒸馏水中。
- (2) 向溶液中加入0.5ml新配的0.1M  $\text{NaIO}_4$  溶液，混匀，4℃静置30分钟。
- (3) 加入0.16M乙二醇水溶液0.5ml，混匀，静置30分钟。
- (4) 加入含5mg抗体的水溶液1ml，混匀装入透析袋，pH9.5碳酸盐缓冲液透析，4℃过夜。

(5) 加0.2 mL 新配的5 mg/mL  $\text{NaBH}_4$  液，混匀，再置4 °C, 2h。

(6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置4 °C 1h。

(7) 3000 r/min 离心半小时，弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次，最后沉淀物溶于少量0.15mol/L pH7.4 的PBS中。

(8) 将上述溶液装入透析袋中，对0.15 mol/L pH7.4 的PB缓冲盐水透析，去除铵离子后(用萘氏试剂检测)，10,000 r/min 离心30 min 去除沉淀，上清液即为酶结合物，分装后，冰冻保存。



## 五 注意事项

- (1) 为提高标记效率，应严格掌握整个反应体系中的抗体含量。
- (2) 碘酸钠要新鲜配制。

# 六 思考题

试分析比较各种免疫标记技术的优缺点