PD-1[生物素化] : PD-L1抑制剂筛选试剂盒

（酶联免疫分析法）

【产品名称】

PD-1[生物素化] : PD-L1抑制剂筛选试剂盒(酶联免疫分析法)

【规格】

96 Tests

【货号】

EP-101

【检测原理】

本试剂盒应用ELISA竞争法。将Human PD-L1包被于微孔板上，样本中的PD-1抑制剂与微孔板上固定的Human PD-L1特异性竞争Human PD-1-Biotin，最后加入Streptavidin-HRP，用底物显色，随后用终止液终止，板孔中溶液会由蓝色变为黄色。使用酶标仪在450 nm和630 nm处测定样品吸光度值（$OD_{450\,nm}$ 、$OD_{630\,nm}$），OD值与样本中的PD-1抑制剂含量呈负相关。

【产品组份】

表1.产品组份

ID	组份名称	规格 (96 T)	物理状态	存储条件	
				未开启	已开启
EP101-C01	High-bind Plate	1 plate	固体	2-8℃	2-8℃
EP101-C02	Human PD-L1	25 µg	固体	2-8℃	-70℃
EP101-C03	Anti-PD-1 Neutralizing Antibody	20 µg	固体	2-8℃	-70℃
EP101-C04	Human PD-1-Biotin	5 µg	固体	2-8℃	-70℃
EP101-C05	Streptavidin-HRP	10 µg	固体	2-8℃，避光	-70℃，避光

US and Canada: Tel: +1 800-810-0816
Asia and Pacific: Tel: +86 400-682-2521
Web: http://www.acrobiosystems.com
E-mail: order@acrobiosystems.com

EP101-C06	Coating Buffer	12 mL	液体	2-8℃	2-8℃
EP101-C07	10xWashing Buffer	50 mL	液体	2-8℃	2-8℃
EP101-C08	Blocking Buffer	50 mL	液体	2-8℃	2-8℃
EP101-C09	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8℃，避光	2-8℃，避光
EP101-C10	Stop Solution	7 mL	液体	2-8℃	2-8℃

【运输和储存条件】

1. 未开封：试剂盒保存于2-8℃，试剂盒自生产之日起有效期为12个月，有效期见外包装盒标签。
2. 已开封：试剂盒开封后各组分按照表1存贮条件保存，有效期自开封之日起为30天，未使用完的微孔板条需与干燥剂一起密封保存。

注：不要使用过期试剂。

【需要但未提供的实验仪器与耗材】

1. 单道、多道微量移液器和移液器吸头：需满足10 μL、300 μL、1000 μL加样需求
2. 恒温培养箱
3. 酶标仪，含450 nm/630 nm波长
4. 离心管：1.5 mL，10 mL
5. 计时器
6. 试剂瓶
7. 超纯水或去离子水

【试剂准备】

使用前将所有试剂恢复至室温 (20℃-25℃)。如果溶液中有晶体形成，需平衡溶液至晶体完全溶解（可将溶液放置于恒温培养箱37℃平衡10-15 min）。

按照表2建议，用PBS将所提供的冻干品配制成存储溶液，在室温下溶解15至30分钟，轻轻吹吸混匀，避免剧烈摇动或涡旋。重构的存储液应在-70℃保存，建议冻融次数不要超过3次，冻融规格不低于5 μg。

US and Canada: Tel: +1 800-810-0816
Asia and Pacific: Tel: +86 400-682-2521
Web: http://www.acrobiosystems.com
E-mail: order@acrobiosystems.com

注：**Streptavidin-HRP存储液应避光保存。**

表2. 配制方法

ID	组份名称	规格 (96 T)	存储液浓度.	重构液体积Vol.
EP101-C02	Human PD-L1	25 μg	250 μg/mL	100 μL 1xPBS
EP101-C03	Anti-PD-1 Neutralizing Antibody	20 μg	250 μg/mL	80 μL 1xPBS
EP101-C04	Human PD-1-Biotin	5 μg	100 μg/mL	50 μL 1xPBS
EP101-C05	Streptavidin-HRP	10 μg	50 μg/mL	200 μL 1xPBS

【检测流程】

1. 工作液配制

1.1 配制1xWashing Buffer：

取50 mL 10xWashing Buffer，用超纯水/去离子水稀释并定容至500 mL，轻轻混匀。

1.2 配制Dilution Buffer：

将Blocking Buffer(EP101-C08) 用1xWashing Buffer以1:3比例稀释。例：10 mL Blocking Buffer加入30 mL 1xWashing Buffer。

2. 包被微孔板

2.1 用 Coating Buffer(EP101-C06)将 Human PD-L1 存储液(250 μg/mL)稀释至 2 μg/mL, 配制成 Human PD-L1 包被工作液。

2.2 请保留数个不加包被工作液的空白对照孔(只加 Coating Buffer)作 No-Coating Ctrl.（表 3）。

2.3 在 High-bind Plate(EP101-C01)相应板孔中加入 100 μL Human PD-L1 包被工作液，用封板膜封板，在 4℃条件下孵育过夜或孵育 15 小时。

3. 洗板

小心揭开封板膜，弃去孔中液体，每孔加入 300 μL 1xWashing Buffer，浸泡 10 s，共洗板 3 次。每次洗板后，需在吸水纸上拍干，也可选择机洗。

4. 封闭

在每个孔中加入 300μL Blocking Buffer(EP101-C08)，用封板膜封板，在 37℃条件下孵育 1.5

US and Canada: Tel: +1 800-810-0816
Asia and Pacific: Tel: +86 400-682-2521
Web: http://www.acrobiosystems.com
E-mail: order@acrobiosystems.com

小时。

5. 洗板

重复步骤 3 洗板。

6. 加样

6.1 根据实验需要对样本进行系列稀释。

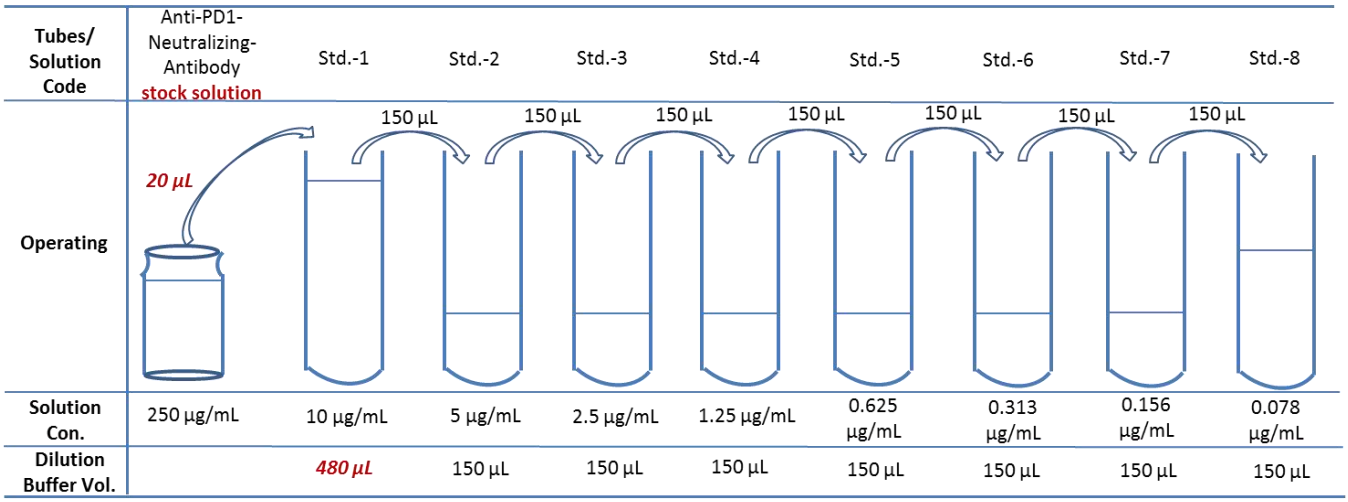
6.2 若使用试剂盒内的 Anti-PD-1 Neutralizing Antibody(EP101-C03)作为参考品，请按照图 1 进行稀释处理。

6.3 配制 Human PD-1-Biotin 工作液：

用 Dilution Buffer 将 Human PD-1-Biotin 存储液(100 μg/mL)稀释至 0.4 μg/mL。

注：Human PD-1-Biotin 工作液应在实验前准备，不可保存。

图 1 Anti-PD-1 Neutralizing Antibody 参考品工作液的制备



6.4 根据实验需要进行微孔板加样设计，

若使用试剂盒进行定量实验，微孔板设计可参考图 2；

若使用试剂盒进行定性实验，微孔板设计可参考图 3。

根据实验设计，在对应板孔内加入 50 μL 梯度稀释后的待测样本和参考品。Positive Ctrl、No-Coating Ctrl.和 No.Binding Ctrl.孔加入 50 μL Dilution Buffer。

图 2. 定量实验微孔板设计参考

US and Canada: Tel: +1 800-810-0816
Asia and Pacific: Tel: +86 400-682-2521
Web: http://www.acrobiosystems.com
E-mail: order@acrobiosystems.com

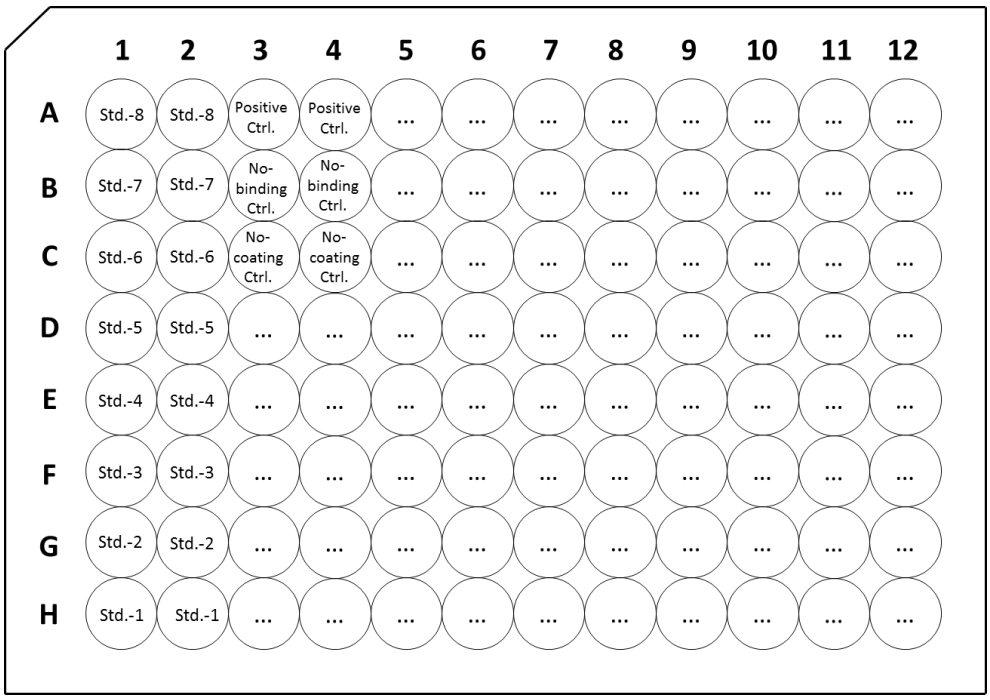
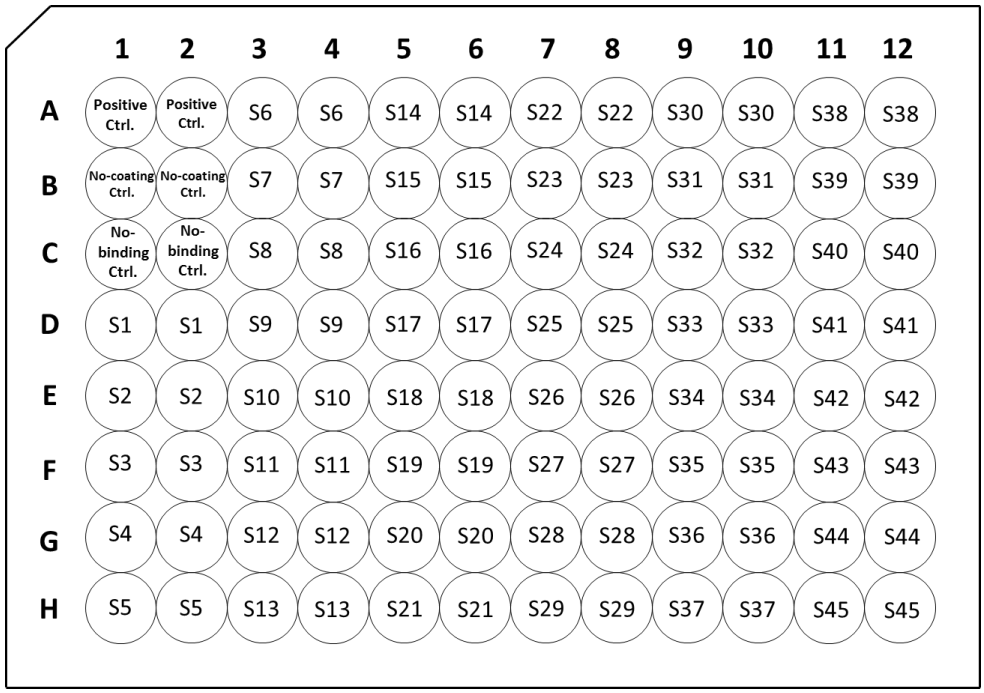


图 3. 定性实验微孔板设计参考



6.5 除 No.Binding Ctrl.孔外，每孔加入 50 μL Human PD-1-Biotin 工作液。轻轻震荡微孔板使溶液混匀，用封板膜封板，在 37℃下孵育 1.0 h。

US and Canada: **Tel**: +1 800-810-0816
Asia and Pacific: **Tel**: +86 400-682-2521
Web: http://www.acrobiosystems.com
E-mail: order@acrobiosystems.com

注：6.4 步骤和 6.5 步骤需连续加样，Human PD-1-Biotin 工作液需现用现配。

7. 洗板

重复步骤 3 洗板。

8. 加 Streptavidin-HRP 工作液

8.1 用 Dilution Buffer 将 Streptavidin-HRP 存储液(50 μg/mL)稀释至 0.4 μg/mL，配制为 Streptavidin-HRP 工作液，该工作液现用现配，避光保存。

8.2 在所有孔内加入 100 μL Streptavidin-HRP 工作液，用封板膜封板，在 37℃下孵育 1.0 h。

9. 洗板

重复步骤 3 洗板。

10. 显色

将微孔板拍干，每孔加入 100 μL Substrate Solution。用封板膜封板，放置 37℃恒温培养箱避光孵育 20 min。

11. 终止

每孔加入 50 μL Stop Solution，轻轻震荡酶标板至混合均匀。

注: 孔中液体由蓝色变为黄色。

12. 读数

用酶标仪测定各孔在 450 nm 和 630 nm 波长的吸光值，请在终止后 3 分钟内读数。

注:各孔$OD_{450\ nm}$扣除$OD_{630\ nm}$读值可降低背景干扰。

表3 实验操作规程

Steps Code	Steps	Reagents & Instruments	Reaction Conditions	Samples	No-binding Ctrl.	No-coating Ctrl.	Positive Ctrl.
1	Working fluid preparation	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Coating	Human PD-L1 Working Solution	4℃ for overnight	100 μL	100 μL	—	100 μL
3	Washing	1×Washing Buffer	Wash for 3 times	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL

US and Canada: Tel: +1 800-810-0816
Asia and Pacific: Tel: +86 400-682-2521
Web: http://www.acrobiosystems.com
E-mail: order@acrobiosystems.com

4	Blocking	Blocking Buffer	37℃ for 1.5 h	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL
5	Washing	1×Washing Buffer	Wash for 3 times	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL
6	Add Samples	Samples	—	50 μL	—	—	—
		Dilution Buffer		—	50 μL+50 μL	50 μL	50 μL
7	Binding	Human PD-1-Biotin Working Solution	Mix by gentle tapping, incubate at 37℃ for 1.0 h	50 μL	—	50 μL	50 μL
8	Washing	1×Washing Buffer	Wash for 3 times	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL
9	Streptavidin-HRP	Streptavidin-HRP Working Solution	37℃ for 1.0 h	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
10	Washing	1×Washing Buffer	Wash for 3 times	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL
11	Substrate Reaction	Substrate Solution	37℃ for 20 min	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
12	Termination	Stop Solution	Mix by gentle tapping	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
13	Data Recording	UV/Vis spectrophotometer	Measure absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 630 nm				

注:

1. Samples: 您感兴趣的样本.
2. No-binding Ctrl.: 不加Human PD-1-Biotin反应的微孔。OD $_{450\ nm}$在0.05左右（或小于0.1）。
3. No-coating Ctrl.: 包被时未加Human PD-L1的微孔. OD $_{450\ nm}$在0.05左右（或小于0.1）。
4. Positive Ctrl.: 样本中不含抑制剂时OD $_{450\ nm}$的最大值。
5. 建议所有样本、对照品及参考品复孔点样。

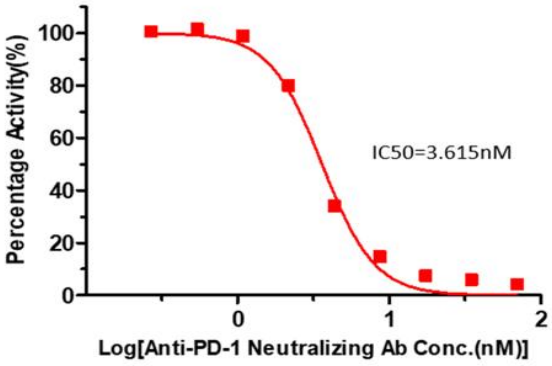
【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用，不能用于治疗和诊断。
2. 请严格按使用说明进行操作。
3. 不同批号的试剂不能混用。不可与其他厂家试剂混用。
4. 使用前各组份需平衡至室温，保证溶液晶体全部溶解。请在无尘洁净的环境下进行操作使用。
5. 试剂盒请在 2-8℃保存，请勿使用过有效期的试剂盒。
6. 请根据实验需要配制各组分工作液，除 1xWashing Buffer 以外，工作液即配即用，不可保存。

【典型数据】

每次实验，每块酶标板都需要设置标准曲线，以下标准曲线数据仅供参考。

US and Canada: Tel: +1 800-810-0816
Asia and Pacific: Tel: +86 400-682-2521
Web: http://www.acrobiosystems.com
E-mail: order@acrobiosystems.com



Anti-PD-1 Neutralizing Antibody Ab Con.(ug/ml)	Anti-PD-1 Neutralizing Antibody Ab Con.(nM)	Mean Abs.(OD450)	Percentage Activity(%)
0	0.000	2.380	100.00
0.078	0.544	2.361	99.20
0.156	1.088	2.353	98.87
0.313	2.176	1.903	79.96
0.625	4.352	0.811	34.08
1.25	8.704	0.353	14.83
2.5	17.407	0.181	7.61
5	34.814	0.141	5.92
10	69.628	0.102	4.29

US and Canada: **Tel**: +1 800-810-0816
Asia and Pacific: **Tel**: +86 400-682-2521
Web: http://www.acrobiosystems.com
E-mail: order@acrobiosystems.com