

## CD47[生物素标记] : SIRP alphaV2抑制剂筛选试剂盒

(酶联免疫分析法)

### 【产品名称】

CD47[生物素标记] : SIRP alphaV2抑制剂筛选试剂盒(ELISA)

### 【规格】

96 Tests

### 【货号】

EP-152

### 【检测原理】

本试剂盒应用ELISA竞争法。将Human SIRP alphaV2包被于微孔板上，样本中的CD47抑制剂与微孔板上固定的Human SIRP alphaV2特异性竞争Human CD47-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<sub>450 nm</sub>、OD<sub>630 nm</sub>），OD值与样本中的CD47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
EP152-C01	High-bind Plate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
EP152-C02	Human SIRP alphaV2	20 µg	固体	2-8°C	-70°C
EP152-C03	Anti-CD47 Neutralizing Antibody	20 µg	固体	2-8°C	-70°C
EP152-C04	Human CD47-Biotin	10 µg	固体	2-8°C	-70°C

EP152-C05	Streptavidin-HRP	10 µg	固体	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
EP152-C06	Coating Buffer	12 mL	液体	2-8°C	2-8°C
EP152-C07	10xWashing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
EP152-C08	Blocking Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
EP152-C09	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
EP152-C10	Stop Solution	7 mL	液体	2-8°C	2-8°C

### 【运输和储存条件】

1. 未开封：试剂盒保存于2-8°C，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存储条件保存，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°C-25°C)。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°C平衡10-15 min）。

按照表2建议，用超纯水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°C保存，建议冻融次数不要超过2次，冻

融规格不低于5 µg。

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.	重构水体积Vol.
EP152-C02	Human SIRP alphaV2	20 µg	200 µg/mL	100 µL, water
EP152-C03	Anti-CD47 Neutralizing Antibody	20 µg	200 µg/mL	100 µL, water
EP152-C04	Human CD47-Biotin	10 µg	100 µg/mL	100 µL, water
EP152-C05	Streptavidin-HRP	10 µg	100 µg/mL	100 µL, water

## 【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(EP152-C08) 用1xWashing Buffer进行4倍稀释。例：10 mL Blocking Buffer加入30 mL 1xWashing Buffer。

### 2. 包被微孔板

**2.1** 用 Coating Buffer(EP152-C06)将 Human SIRP alphaV2 存储液(200 µg/mL)稀释至 1.0 µg/mL，配制成 Human SIRP alphaV2 包被工作液。

**2.2** 请保留数个不加包被工作液的空白孔(只需加 Coating Buffer)作 No-Coating Ctrl. (表 3)。

**2.3** 在 High-bind Plate(EP152-C01)每个板孔中加入 100 µL Human SIRP alphaV2 包被工作液，用封板膜封板，在 4°C 条件下孵育过夜 (或孵育 16 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 300  $\mu\text{L}$  Blocking Buffer(EP152-C08)，用封板膜封板，在 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 1.5 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-CD47 Neutralizing Antibody (EP152-C03)作为参考品，请按照图 1 进行稀释处理。

6.3 配制 Human CD47-Biotin 工作液：

用 Dilution Buffer 将 Human CD47-Biotin 存储液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )稀释至 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

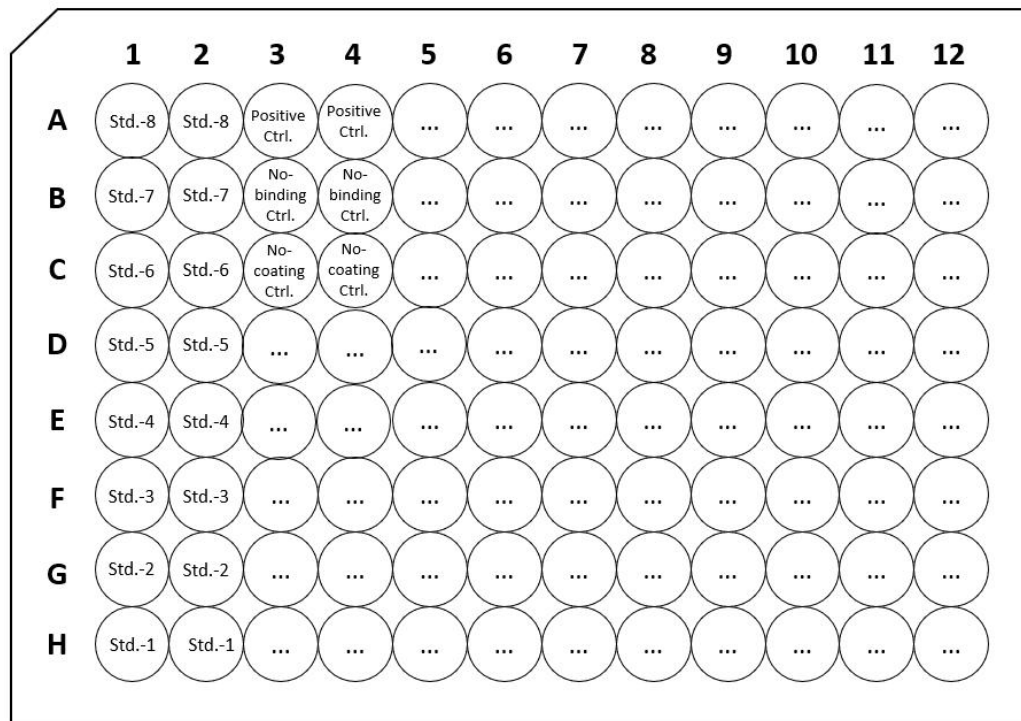
注：Human CD47-Biotin工作液应在使用前准备，不可保存。

图 1 Anti-CD47 Neutralizing Antibody 参考品工作液的制备

Tubes/ Solution Code	Anti-CD47 Neutralizing Antibody stock solution	Std.-1	Std.-2	Std.-3	Std.-4	Std.-5	Std.-6	Std.-7	Std.-8
Operating									
Solution Conc.	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.313 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.156 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.078 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Dilution Buffer Vol.		270 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$

6.4 根据实验需要或参考图 2 进行微孔板加样设计，在对应板孔内加入 50  $\mu\text{L}$  梯度稀释后的标准品和待测样本。No-Coating Ctrl.和 No.Binding Ctrl.孔加入 50  $\mu\text{L}$  Dilution Buffer。

图 2. 微孔板设计参考



**6.5** 除 No.Binding Ctrl.孔外，每孔加入 50  $\mu$ L Human IL-5-Biotin 工作液。轻轻震荡微孔板使溶液混匀，用封板膜封板，在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1.0 h。

## 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(100  $\mu$ g/mL)稀释至 0.05  $\mu$ g/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  $\mu$ L Streptavidin-HRP 工作液，用封板膜封板，在 37 $^{\circ}$ C 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  $\mu$ L Substrate Solution。用封板膜封板，放置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱避光孵育 20 min。

## 11. 终止

每孔加入 50  $\mu$ L 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<sub>450 nm</sub>扣除OD<sub>630 nm</sub>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 SIRP alphaV2 Working Solution	4°C for overnight	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	—	100 $\mu$ L	
3	Washing	1xWashing Buffer	Wash for 3 times	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	
4	Blocking	Blocking Buffer	37°C for 1.5 hours	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	
5	Washing	1xWashing Buffer	Wash for 3 times	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	
6	Add Samples	Samples	Incubate at 37°C for 1 hour	50 $\mu$ L	—	—	—	
		Dilution Buffer		—	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	
7	Binding	Biotinylated Human CD47 Working Solution		50 $\mu$ L	—	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	
		Dilution Buffer		—	50 $\mu$ L	—	—	
8	Washing	1xWashing Buffer		Wash for 3 times	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L
9	Streptavidin-HRP	Streptavidin-HRP Working Solution		37°C for 1 hours	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
10	Washing	1xWashing Buffer	Wash for 3 times	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	
11	Substrate Reaction	Substrate Solution	37°C for 20 minutes	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	
12	Termination	Stop Solution	Mix by gentle tapping	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	
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 CD47-Biotin反应的微孔。OD<sub>450 nm</sub>在0.05左右（或小于0.1）。
3. No-coating Ctrl.: 包被时未加Human SIRP alphaV2的微孔。OD<sub>450 nm</sub>在0.05左右（或小于0.1）。
4. Positive Ctrl.: 样本中不含抑制剂时OD<sub>450 nm</sub>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 and 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份工作液，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。

