

## TL1A[生物素标记] : DR3抑制剂筛选试剂盒(ELISA)

### 【产品名称】

TL1A[生物素标记] : DR3抑制剂筛选试剂盒(ELISA)

### 【规格】

96 Tests

### 【货号】

EP-168

### 【检测原理】

本试剂盒应用ELISA竞争法。将Human DR3包被于微孔板上，样本中的TL1A抑制剂与微孔板上固定的Human DR3特异性竞争Human TL1A-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TL1A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
EP168-C01	High-bind Plate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
EP168-C02	Human DR3	100 µg	固体	2-8°C	-70°C
EP168-C03	Biotinylated Human TL1A	6 µg	固体	2-8°C	-70°C
EP168-C04	Anti-Human TL1A Neutralizing Antibody	100 µg	固体	2-8°C	-70°C
EP168-C05	Streptavidin-HRP	5 µg	固体	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
EP168-C06	Coating Buffer	12 mL	液体	2-8°C	2-8°C

EP168-C07	20xWashing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
EP168-C08	Blocking Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
EP168-C09	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
EP168-C10	Stop Solution	7 mL	液体	2-8°C	2-8°C

## 【储存条件】

1. 未开封：试剂盒保存于2-8°C，有效期见外包装标签。
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.
EP168-C02	Human DR3	100 µg	200 µg/mL	500 µL, water
EP168-C03	Biotinylated Human TL1A	6 µg	60 µg/mL	100 µL, water
EP168-C04	Anti-Human TL1A Neutralizing Antibody	100 µg	200 µg/mL	500 µL, water
EP168-C05	Streptavidin-HRP	5 µg	50 µg/mL	100 µL, water

## 【检测流程】

### 1. 工作液配制

#### 1.1 配制1×Washing Buffer:

取25 mL 20×Washing 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(EP168-C08) 用1×Washing Buffer进行4倍稀释。例: 10 mL Blocking Buffer加入30 mL 1×Washing Buffer。

### 2. 包被微孔板

2.1 用 Coating Buffer(EP168-C06)将 Human DR3 存储液(200 µg/mL)稀释至 10 µg/mL, 配制成 Human DR3 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(EP168-C01)每个板孔中加入 100 µL Human DR3 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 1×Washing 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 µL Blocking Buffer(EP168-C08), 用封板膜封板, 在 37°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-TL1A Neutralizing Antibody (EP168-C04)作为参考品, 请按照图 1 进行稀释处理。

6.3 配制 Human TL1A-Biotin 工作液: 用 Dilution Buffer 将 Human TL1A-Biotin 存储液(60 µg/mL) 稀释至 0.4µg/mL。

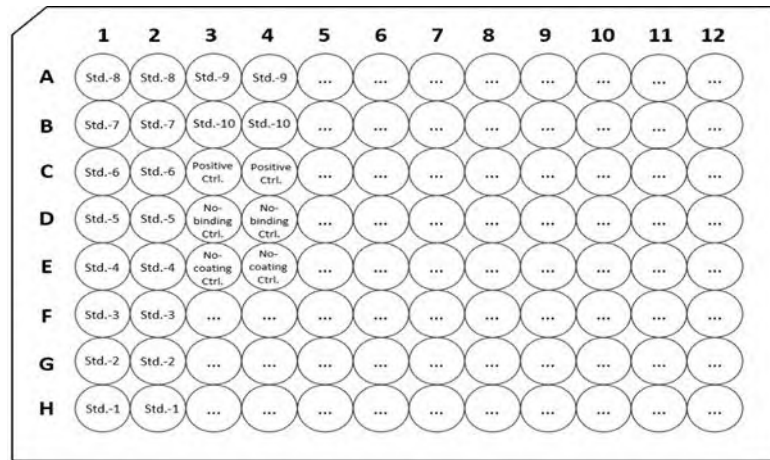
注: Human TL1A-Biotin工作液应在使用前准备, 不可保存。

图 1 Anti-TL1A Neutralizing Antibody 参考品工作液的制备

Tubes/ Solution Code	Anti-TL1A Neutralizing Antibody stock solution	Std.-1	Std.-2	Std.-3	Std.-4	Std.-5	Std.-6	Std.-7	Std.-8	Std.-9	Std.-10
Operating	40 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Solution Con.	200µg/mL	20 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	2.5 µg/mL	1.25 µg/mL	0.625 µg/mL	0.3125 µg/mL	0.15625 µg/mL	0.078125 µg/mL	0.0390625 µg/mL
Dilution Buffer Vol.		360 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	400 µL

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 µL 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 µL 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 TL1A-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(50  $\mu$ g/mL)稀释至 0.1  $\mu$ 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 DR3 Working Solution	4°C 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
4	Blocking	Blocking Buffer	37°C for 1.5 hours	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	Incubate at 37°C for 1 hour	50 µL	—	—	—
		Dilution Buffer		—	50 µL	50 µL	50 µL
7	Binding	Biotinylated Human TL1A Working Solution		50 µL	—	50 µL	50 µL
		Dilution Buffer		—	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°C for 1 hours	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°C for 20 minutes	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：

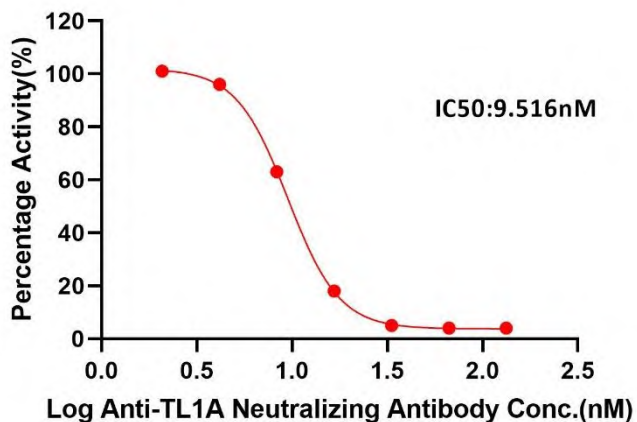
1. Samples: 您感兴趣的样本。
2. No-binding Ctrl.: 不加Human TL1A-Biotin反应的微孔。OD<sub>450 nm</sub>在0.05左右（或小于0.1）。
3. No-coating Ctrl.: 包被时未加Human DR3的微孔。OD<sub>450 nm</sub>在0.05左右（或小于0.1）。
4. Positive Ctrl.: 样本中不含抑制剂时OD<sub>450 nm</sub>的最大值。
5. 建议所有样本、对照品及参考品复孔点样。

## 【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，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。



Anti-TL1A Neutralizing Antibody( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Anti-TL1A Neutralizing Antibody.(nM)	Mean Abs.(OD450)	Percentage Activity(%)
0.000	0.000	2.334	100%
0.313	2.083	2.350	101%
0.625	4.167	2.234	96%
1.250	8.333	1.470	63%
2.500	16.667	0.419	18%
5.0	33.333	0.127	5%
10	66.667	0.093	4%
20	133.333	0.082	4%