

## Add&Read Human CD40/CD40L Kit

DD2212



Nanjing Vazyme Biotech Co.,Ltd.

Web: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)  
Tel: +86-400-600-9335  
Sales: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)  
Support: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)



---

使用说明书  
Version 23.1

# 目录 Contents

01/产品概述 .....	02
02/产品组分 .....	02
03/保存条件 .....	02
04/适用范围 .....	03
05/自备材料 .....	03
06/注意事项 .....	03
07/实验流程 .....	03
07-1/试剂配制 .....	03
07-2/样品准备 .....	04
07-3/反应体系 .....	05
08/数据处理 .....	05

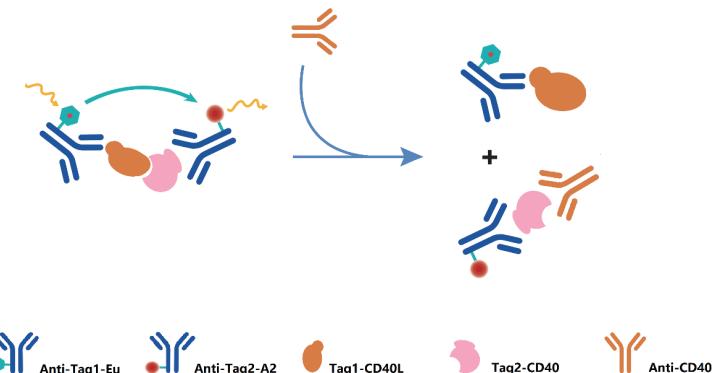
\*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

## 01/产品概述

Human CD40/CD40L Kit用于检测CD40和CD40L的结合，可快速、高通量筛选CD40和CD40L的抑制剂。

试剂盒中有Tag1-CD40和Tag2-CD40L两种蛋白，以及两株抗体，分别为：Anti-Tag1(标记荧光供体Eu, Anti-Tag1-Eu); Anti-Tag2(标记荧光受体A2, Anti-Tag2-A2)。

当CD40和CD40L发生相互作用时，Anti-Tag1-Eu和Anti-Tag2-A2距离靠近，可发生荧光共振能量转移(FRET)。使用320 nm的激发光激发Eu，供体发射620 nm的光，此620 nm的光激发荧光受体A2，受体发射出665 nm的光。加入抑制剂会阻断CD40/CD40L的相互作用从而破坏FRET形成，抑制强度和FRET信号(665/620)成反比。



## 02/产品组分

组分	DD2212-01(500 tests)	DD2212-02(5,000 tests)
Tag1-CD40L	40 µl	400 µl
Tag2-CD40	40 µl	400 µl
Standard	200 µl	500 µl
Anti-Tag1-Eu	40 µl	400 µl
Anti-Tag2-A2	40 µl	400 µl
Diluent	20 ml	55 ml
Detection buffer	7 ml	55 ml

## 03/保存条件

试剂盒-85 ~ -65°C保存，使用后可按照各组分对应的储存条件进行保存，避免反复冻融；干冰运输。

## 04/适用范围

细胞上清、纯化后蛋白

## 05/自备材料

96/384浅孔板

酶标仪(配置HTRF/TR-FRET模块)

## 06/注意事项

- Anti-Tag1-Eu与Anti-Tag2-A2建议在储存液条件下(50 ×)分装于-30 ~ -15°C保存，避免反复冻融。
- Tag1-CD40L与Tag2-CD40建议在储存液条件下(50 ×)分装于-85 ~ -65°C保存，避免反复冻融。
- Standard分装于-85 ~ -65°C保存，避免反复冻融。
- Tag1-CD40L和Tag2-CD40在加样之前禁止混合。

## 07/实验流程

### 07-1/试剂配制

- Anti-Tag1-Eu和Anti-Tag2-A2工作液配制(储存液为50 ×)  
96/384浅孔板的反应体积为20 μl，建议每20 μl体系各加入4 μl Anti-Tag1-Eu和Anti-Tag2-A2工作液。在配制之前计算所需的Anti-Tag1-Eu和Anti-Tag2-A2体积：V=(孔数 × 4/50) μl。

Anti-Tag1-Eu工作液配制：

- 将Anti-Tag1-Eu从冰箱中取出，室温放置使其溶解，为50 ×储存液。
- 向1体积Anti-Tag1-Eu (V μl)中加入49体积Detection buffer (49V μl)，混合均匀。

Anti-Tag2-A2工作液配制：

- 将Anti-Tag2-A2从冰箱中取出，室温放置使其溶解，为50 ×储存液。
  - 向1体积Anti-Tag2-A2 (V μl)中加入49体积Detection buffer (49V μl)，混合均匀。
- ▲ Anti-Tag1-Eu与Anti-Tag2-A2建议在储存液条件下(50 ×)分装于-30 ~ -15°C保存，避免反复冻融。

- Tag1-CD40L和Tag2-CD40工作液配制(储存液为50 ×)

96/384浅孔板的反应体积为20 μl，建议每20 μl体系加入4 μl Tag1-CD40L和Tag2-CD40工作液。在配制之前计算所需的Tag1-CD40L和Tag2-CD40体积：V=(孔数 × 4/50) μl。

Tag1-CD40L工作液配制：

- 将Tag1-CD40L从冰箱中取出，室温放置使其溶解，为50 ×储存液。
- 向1体积Tag1-CD40L (V μl)中加入49体积Diluent (49V μl)，混合均匀。

Tag2-CD40工作液配制：

- 将Tag2-CD40从冰箱中取出，室温放置使其溶解，为50 ×储存液。
  - 向1体积Tag2-CD40 (V μl)中加入49体积Diluent (49V μl)，混合均匀。
- ▲ Tag1-CD40L与Tag2-CD40建议在储存液条件下(50 ×)分装于-85 ~ -65°C保存，避免反复冻融。

- Standard配制

96/384浅孔板的反应体系为20 μl/孔，每一个孔需要Standard 4 μl，在配制之前计算所需的Standard体积。

按照以下步骤配制方式可获得20 μl Standard。

- 将Standard从冰箱中取出，室温放置使其溶解，为Std 11。
- 取20 μl Std 11，加入20 μl Diluent，混合均匀，获得Std 10。
- 以同样方式2倍稀释，获得Std 9-Std 1。

Standard	稀释方式	Standard 工作浓度 nM	Standard 终浓度 nM
Std 11	-	800	160
Std 10	20 μl Std 11 + 20 μl Diluent	400	80
Std 9	20 μl Std 10 + 20 μl Diluent	200	40
Std 8	20 μl Std 9 + 20 μl Diluent	100	20
Std 7	20 μl Std 8 + 20 μl Diluent	50	10
Std 6	20 μl Std 7 + 20 μl Diluent	25	5
Std 5	20 μl Std 6 + 20 μl Diluent	12.5	2.5
Std 4	20 μl Std 5 + 20 μl Diluent	6.25	1.25
Std 3	20 μl Std 4 + 20 μl Diluent	3.125	0.625
Std 2	20 μl Std 3 + 20 μl Diluent	1.563	0.313
Std 1	20 μl Std 2 + 20 μl Diluent	0.781	0.156
Std 0	20 μl Diluent	0	0

▲ Standard分装于-85 ~ -65°C保存，避免反复冻融。

### 07-2/样品准备

样品使用Diluent或者新鲜配制的含0.5% BSA，pH 7.0 的buffer进行稀释。

### 07-3/反应体系

#### 1. 加样

96/384浅孔板反应体积为20  $\mu$ l，按照下表实验分组及反应体系进行样品加样。

	Standard/样品	阳性对照	阴性对照	Eu对照	Buffer对照
Standard/样品	4 $\mu$ l	-	-	-	-
Tag1-CD40L	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	-	-	-
Tag2-CD40	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	-	-	-
Anti-Tag1-Eu	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	-
Anti-Tag2-A2	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	-	-
Diluent	-	4 $\mu$ l	12 $\mu$ l	12 $\mu$ l	12 $\mu$ l
Detection buffer	-	-	-	4 $\mu$ l	8 $\mu$ l

#### 2. 试剂添加顺序为：

- 向96/384孔板中加入4  $\mu$ l Standard/样品。
- 加入4  $\mu$ l Tag1-CD40L，用移液器在加样孔内轻柔混合两次。
- 加入4  $\mu$ l Tag2-CD40，用移液器在加样孔内轻柔混合两次。
- 将Anti-Tag1-Eu和Anti-Tag2-A2以体积1:1混合均匀，向反应体系加入8  $\mu$ l，用移液器在加样孔内轻柔混合两次。

▲ Tag1-CD40L和Tag2-CD40在加样之前禁止混合。

室温或者25°C孵育2 h，用酶标仪(配置HTRF/TR-FRET模块)检测，激发光为320 nm，检测两个波长(665 nm和620 nm)的发射光。

### 08/数据处理

将665 nm的荧光值除以620 nm的荧光值，获得665/620值。以 $\log_{10}$  [样品终浓度]为横坐标，665/620的值为纵坐标，曲线拟合进行曲线的制作。

Std No.	[Standard], nM	665/620
Std 11	160	0.0803
Std 10	80	0.0796
Std 9	40	0.0815
Std 8	20	0.0828
Std 7	10	0.5713
Std 6	5	1.2403
Std 5	2.5	1.6280
Std 4	1.25	1.8678
Std 3	0.625	1.9561
Std 2	0.313	2.0302
Std 1	0.156	2.0112
Positive control	0	2.1146
Negative control	-	0.1029

