



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

IDO1抑制剂筛选试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P2548S	IDO1抑制剂筛选试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天研发的IDO1抑制剂筛选试剂盒(IDO1 Inhibitor Screen Kit), 即Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 Inhibitor Screening Kit, 是一种通过吸光度检测, 简单、灵敏地对IDO1抑制剂进行高通量筛选的试剂盒。
- 吲哚胺2,3-双加氧酶1 (Indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1)是体内L-色氨酸(L-tryptophan)分解代谢中的一种关键酶。在哺乳动物中, IDO1与另外两个含有血红素的酶(Heme-containing enzymes), Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2)和Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), 通过犬尿氨酸途径(Kynurenine pathway)催化L-色氨酸氧化为N-甲酰基犬尿氨酸(N-formylkynurenine, NFK), 该反应是L-色氨酸分解代谢的第一步, 也是限速步骤[1]。
- IDO1在几种淋巴和非淋巴器官(包括淋巴结、脾脏、扁桃体、肺和肠)、免疫细胞(包括巨噬细胞和树突状细胞)和内皮细胞中广泛表达[2]。IDO1活性增加所引起的犬尿氨酸代谢产物的积累会导致T细胞受到抑制, 从而导致肿瘤细胞逃避免疫系统的监测和清除[1]。许多临床前研究也支持IDO1过表达与大多数癌症的不良预后有关, 因此, IDO1作为一种在癌症免疫治疗中具有巨大潜力的治疗靶点而获得了广泛的关注。对开发IDO1抑制剂进行了大量的研究, 并报道了许多小分子IDO1抑制剂, 其中一些如Epacadostat (INCB024360)、BMS-986205、Indoximod和PF-06840003等, 目前正在进行临床试验研究[3]。此外, ‘蛋白水解靶向嵌合物’(Proteolysis targeting chimera, PROTAC)技术也被用于设计IDO1的降解剂[4]。
- 本试剂盒的检测原理请参考图1。在IDO1的催化作用下, L-色氨酸和氧气(O_2)发生氧化反应生成N-甲酰基犬尿氨酸, N-甲酰基犬尿氨酸在321nm有特征吸收($\epsilon=3750M^{-1}cm^{-1}$), 通过检测反应产物在321nm的吸光度来计算IDO1的活性, 反应产物N-甲酰基犬尿氨酸的吸光度与IDO1的活性成正比。如果加入的化合物可以抑制IDO1的酶活性, 就会影响N-甲酰基犬尿氨酸的生成, 进而影响321nm的吸光度, 从而反映出抑制剂的抑制效果。



图1. 碧云天IDO1抑制剂筛选试剂盒(P2548)的原理图。

- 本试剂盒组分齐全, 含INCB024360阳性对照, 使用便捷。本试剂盒提供10X Assay Buffer、10X Substrate and Antioxidant Mix、L-Ascorbic acid和IDO1 (1mg/ml), 阳性对照 (INCB024360)是IDO1的一种强效高选择性抑制剂, 体外实验中, INCB024360抑制纯化的IDO1的 IC_{50} 约为71.8nM。使用本试剂盒检测INCB024360对IDO1的抑制效果请参考图2。

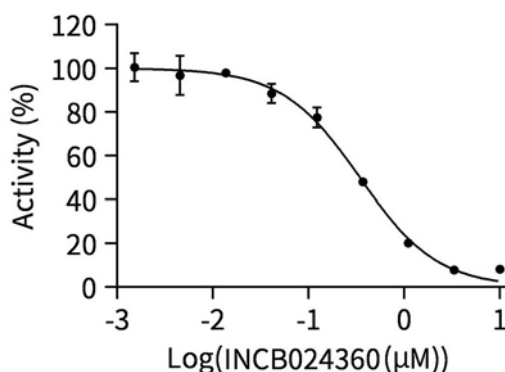


图2. 碧云天IDO1抑制剂筛选试剂盒(P2548)检测INCB024360抑制IDO1活性的效果图。图中INCB024360抑制IDO1的 IC_{50} 约为340nM。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒检测速度快。相较于商业化的荧光法IDO1活性检测试剂盒(整个检测过程超过5小时), 本试剂盒的检测速度更快, 整个检测过程约3.5小时即可完成。
- 按照使用说明操作, 用于96孔板检测时, 本试剂盒可以进行100次检测。如果使用微孔板、384孔板或微量比色皿, 一个小包装的本试剂盒可以进行更多次数的检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2548S-1	10X Assay Buffer	3ml

P2548S-2	10X Substrate and Antioxidant Mix	2ml
P2548S-3	L-Ascorbic acid	1管
P2548S-4	IDO1	1管
P2548S-5	INCB024360	1管
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃保存，一年有效。10X Substrate and Antioxidant Mix建议避光保存。

注意事项：

- 须自备可以测定OD₃₂₁的酶标仪或分光光度计。
- 酶使用时宜存放在冰盒内或冰浴上，使用完毕后立即放置于-80℃保存。
- 稀释后的酶请尽快使用，并且避免反复使用。如遇反应速率过慢的情况，也可加大酶浓度。
- L-Ascorbic acid易被氧化，配制好的溶液建议分装后置于-20℃或-80℃保存。
- 配制好的INCB024360溶液建议分装后置于-80℃保存。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 试剂盒的准备。

根据实际用量配制下列试剂。

- 配制1X Assay Buffer。将10X Assay Buffer室温解冻并平衡至室温，混匀后瞬时离心。使用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)将适量10X Assay Buffer稀释10倍，混匀即得1X Assay Buffer。
注意：建议取0.5ml 10X Assay Buffer，加入4.5ml超纯水，混匀后即为1X Assay Buffer，用于后续INCB024360的配制以及IDO1的稀释。此处至少保留2ml 10X Assay Buffer用于反应体系的设置。
- 配制200mM L-Ascorbic acid溶液。取试剂盒中提供的L-Ascorbic acid粉末，溶解于2.2ml Ultrapure Water，0.22μm滤膜过滤后备用。
注：L-Ascorbic acid易氧化，配制好的溶液建议分装后置于-20℃或-80℃保存。
- 配制40μg/ml IDO1。取试剂盒中提供的IDO1干粉，溶解于60μl Ultrapure Water，即为1mg/ml IDO1。用1X Assay Buffer将1mg/ml IDO1稀释25倍，即得40μg/ml IDO1。
- 配制10mM INCB024360溶液。试剂盒中提供的INCB024360粉末，高速离心数秒以沉淀粉末，加入456μl DMSO，充分溶解并混匀。分装后于-20℃或-80℃冻存。

2. 样品测定。

以试剂盒中提供的阳性对照INCB024360为例。

- 参考下表配制不同浓度的INCB024360抑制剂溶液。

Group	Volume of 1X Assay Buffer	Volume of 10mM INCB024360	Final Concentration
A	49μl	1μl	200μM
B	20μl	从A管取10μl	66.7μM
C	20μl	从B管取10μl	22.2μM
D	20μl	从C管取10μl	7.41μM
E	20μl	从D管取10μl	2.47μM
F	20μl	从E管取10μl	0.82μM
G	20μl	从F管取10μl	0.27μM
H	20μl	从G管取10μl	0.09μM
I	20μl	从H管取10μl	0.03μM
J	20μl	0μl	0μM

- 参考下表配制200μl反应体系。

Reagent	Blank		Positive Control		Test Inhibitor	
	Volume	Final Concentration	Volume	Final Concentration	Volume	Final Concentration
Ultrapure Water	124μl	-	124μl	-	124μl	-
10X Assay Buffer	16μl	1X	16μl	1X	16μl	1X
10X Substrate and Antioxidant Mix	20μl	1X	20μl	1X	20μl	1X

200mM L-Ascorbic acid	20μl	20mM	20μl	20mM	20μl	20mM
INCB024360 (Diluted)	-	-	-	0μM	10μl	≤10μM
1X Assay Buffer	20μl	-	10μl	-	-	-
40μg/ml IDO1	-	-	10μl	2μg/ml	10μl	2μg/ml
Total Volume	200μl	-	200μl	-	200μl	-

注1：可将表格中除INCB024360 (Diluted)、1X Assay Buffer和40μg/ml IDO1以外的组分先配制预混液(建议多配制1-2个反应)，混匀后向96孔板(FPT010/FPT011)每孔加入180μl预混液，再参考表格加入不同浓度的INCB024360抑制剂溶液、1X Assay Buffer和40μg/ml IDO1蛋白溶液。

注2：若同时筛选多个小分子，可在首轮筛选中统一设置成相同浓度，筛选出具有抑制作用的小分子，再在第二轮筛选中设置小分子浓度梯度，以比较不同小分子抑制IDO1的IC₅₀数值。

注3：如果保存时间偏长发现Positive Control组和Blank组的吸光度差异偏小，可以适当加大IDO1的浓度，本试剂盒额外多提供了50%的IDO1的量。

- c. 反应体系混匀后，将96孔板置于25℃孵育2小时，然后用酶标仪检测OD₃₂₁。
- d. 抑制剂抑制IDO1的IC₅₀的计算方法如下。
 - (a) 用Positive Control和Test Inhibitor组的数据减去Blank组的数据，即得到ΔOD₃₂₁。
 - (b) 用Test Inhibitor组的ΔOD₃₂₁/Positive Control的ΔOD₃₂₁，即得到不同INCB024360浓度下的Activity (%)。
 - (c) 使用软件拟合Log (INCB024360 (μM)) Vs. Activity (%)，即得到IC₅₀数值。

3. 其它用途可以参考适当的文献资料进行。

参考文献：

1. Yan D, Lin YW, Tan X. Metallomics. 2017. 9(9):1230-1240.
2. Hornyák L, Dobos N, Koncz G, Karányi Z, Páll D, et al. Front Immunol. 2018. 9:151.
3. Peng X, Zhao Z, Liu L, Bai L, Tong R, et al. Drug Des Devel Ther. 2022. 16:2639-2657.
4. Hu M, Zhou W, Wang Y, Yao D, Ye T, et al. Acta Pharm Sin B. 2020. 10(10):1943-1953.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
FPT010	96孔板(平底, 带盖)	1个/袋
FPT011	96孔板(平底, 带盖)	100个/箱
P2375	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1)	50μg/200μg/1mg
P2548S	IDO1抑制剂筛选试剂盒	100次
ST038	DMSO	100ml/500ml
ST876	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml/500ml
ST1434	L-抗坏血酸(维生素C) (≥99.0%, Reagent grade)	25g/100g/500g
ST1520	L-色氨酸(99.0-101.0%, BioPremium)	50g/250g/1kg/5kg