

## 人PD-L1双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00074  
规格: 96T  
灵敏度: 0.04 ng/mL  
检测范围: 0.156 - 10 ng/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及细胞裂解液中人PD-L1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

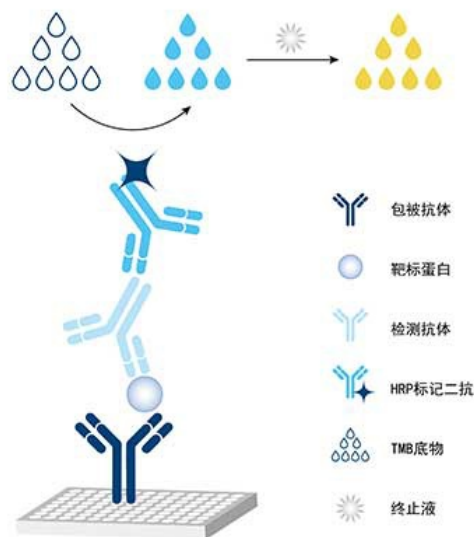
# 目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	4
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	9
十：参考文献	9

## 一：背景信息

程序性细胞死亡配体1 (PD-L1, 也称为CD274或B7-H1) 是一个由290个氨基酸构成的I型跨膜蛋白。PD-L1在T细胞、B细胞、树突状细胞、巨噬细胞、间充质干细胞和培养的骨髓源性肥大细胞上组成性表达。此外, PD-L1还表达于许多非造血细胞类型上, 包括血管内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、肝细胞、胰岛细胞、脑星形胶质细胞、胎盘合体滋养细胞、以及角膜、虹膜-睫状体和视网膜上的细胞。PD-L1在多种实体瘤中常出现表达上调, 包括黑色素瘤、卵巢癌、肺癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌和胰腺癌。PD-L1和PD-L2是PD-1的两个配体。PD-1与PD-L1或PD-L2的结合可传递抑制信号, 抑制T细胞增殖、细胞因子产生和细胞溶解功能。T细胞的功能调节在耐受、自身免疫和感染过程中至关重要。除了膜结合形式的PD-L1外, 还存在可溶性PD-L1 (sPD-L1), sPD-L1可以通过蛋白水解的方式从膜上脱落产生, 也可由mRNA的选择性剪接翻译产生。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

按操作顺序形成抗体夹心结构后, 加入TMB底物, 板孔液体由无色变成蓝色, 再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

## 三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法), 如: Origin, ELISA Calc等。

## 四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	20 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody (100×)	检测抗体浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
HRP-conjugated antibody (100×)	HRP标记二抗浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Sample Diluent PT 1-ef	样本稀释液 PT 1-ef (用于细胞上清样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 3-ef	样本稀释液 PT 3-ef (用于人血清、血浆和细胞裂解液样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Extraction Reagent	裂解液	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张
<b>储存条件：</b> 1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8°C存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

\* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

\*\* 开盖前请离心

## 五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

## 六：样本准备

6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融（注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测）。

6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

6.4 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8°C)的1×PBS洗3次，500×g离心5 min。细胞计数，离心弃上清；加PMSF至细胞裂解液中，终浓度为1 mM；按每 $1 \times 10^7$ 个细胞，加入1 mL细胞裂解液(含PMSF)，冰上裂解30 min，其间上下颠倒使裂解更充分，超声波破碎处理，8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80°C存放，并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度，避免反复冻融。

## 七：试剂准备

### 7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出，37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×)，加入570 mL 超纯水或去离子水，得到洗涤液 (1×)。

### 7.2 检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔)，实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL 检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

### 7.3 HRP 标记二抗 (1×)：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔)，实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记二抗浓缩液 (100×) 加 990 μL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

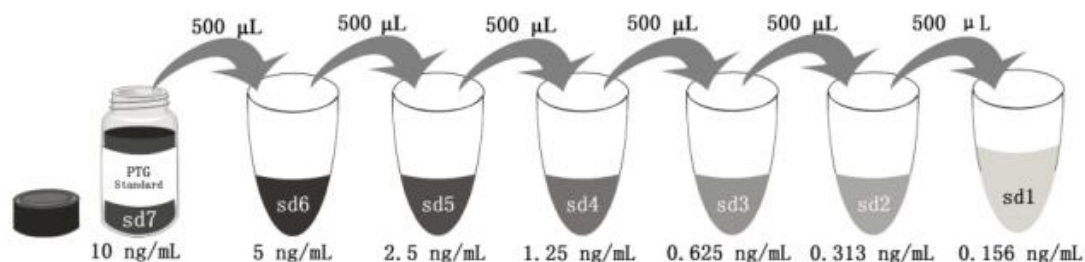
### 7.4 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：人血清和血浆样本1:2或1:4稀释；细胞上清样本1:2或1:4稀释；细胞裂解液样本1:2或1:4稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

### 7.5 梯度稀释的标准品：

检测细胞上清样本，使用2 mL PT 1-ef 样本稀释液复溶标准品；检测人血清、血浆以及细胞裂解液样本，使用2 mL PT 3-ef 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



Add # $\mu\text{L}$ of Standard diluted in the previous step	—	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
# $\mu\text{L}$ of Sample Diluent PT 1-ef or PT 3-ef	2000 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

## 八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30 min (检测抗体 浓缩液、HRP标记二抗浓缩液不需要平衡室温，即用即取)；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽；

8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C，并于一周之内用完；

8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100  $\mu\text{L}$ ，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu\text{L}$ /孔，注意不要产生气泡 (建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样)；

8.3 酶标板盖上覆膜，37°C孵育1 h；

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜 (动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔)，弃液体，拍干；

2) 洗涤液 (1 $\times$ ) 洗涤板条，每孔350-400  $\mu\text{L}$ ，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；

8.5 每孔加100  $\mu\text{L}$  检测抗体 (1 $\times$ ) (参照试剂准备部分7.2)，盖上封板膜，37°C孵育1 h；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 每孔加 100  $\mu\text{L}$  HRP标记二抗 (1 $\times$ ) (参照试剂准备部分7.3)，盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.8 重复步骤8.4；

8.9 显色：每孔加TMB显色液100  $\mu\text{L}$ ，37°C避光显色 15-20 min (如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用)；

8.10 终止：每孔加终止液100  $\mu\text{L}$ ，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致； (注意：眼睛和皮肤避免接触终止液)

8.11 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm 波长，也可直接使用450 nm 波长读数；

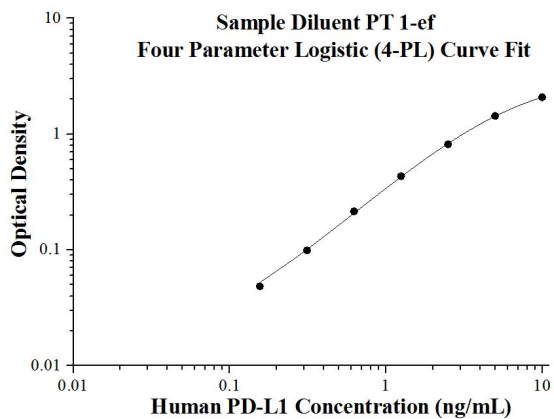
8.12 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用专业软件 (如Origin、ELISACalc等) 进行四参数拟合 (4-PL)，根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

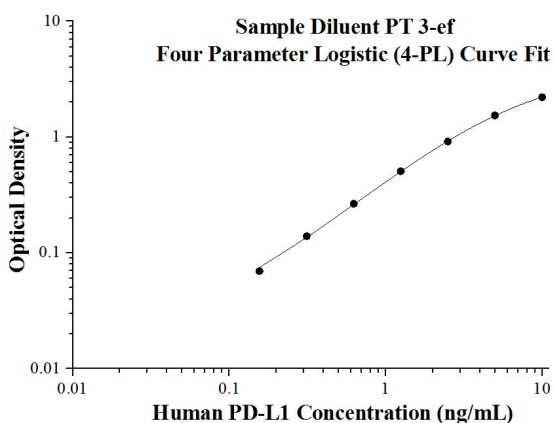
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 $\mu$ L	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记二抗 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 $\mu$ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
5	终止液	100 $\mu$ L	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.02 0.024	0.022	-
0.156	0.072 0.069	0.0705	0.0485
0.313	0.123 0.119	0.121	0.099
0.625	0.242 0.232	0.237	0.215
1.25	0.466 0.444	0.455	0.433
2.5	0.851 0.824	0.8375	0.8155
5	1.49 1.422	1.456	1.434
10	2.117 2.084	2.1005	2.0785



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.025 0.023	0.024	-
0.156	0.096 0.091	0.0935	0.0695
0.313	0.167 0.16	0.1635	0.1395
0.625	0.275 0.304	0.2895	0.2655
1.25	0.524 0.536	0.53	0.506
2.5	0.969 0.906	0.9375	0.9135
5	1.604 1.514	1.559	1.535
10	2.267 2.188	2.2275	2.2035

## 9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	8.26	0.64	7.8
2	20	2.02	0.14	6.8
3	20	0.49	0.02	4.6

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	7.43	0.38	5.1
2	24	1.90	0.12	6.1
3	24	0.47	0.03	7.0

## 9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人PD-L1的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
人血浆	1:2	92	74-125
	1:4	95	75-120
细胞上清	1:2	108	95-127
	1:4	102	87-127
细胞裂解液	1:2	102	79-126
	1:4	98	74-116

## 9.4 样本值

应用本试剂盒，检测64份健康人的血清和血浆样本的人PD-L1的浓度。其中60个样品的测值低于标曲最低点0.156 ng/mL，4个样品的测值在0.25 ng/mL至2 ng/mL之间。

样本类型	检测浓度 (ng/mL)
Jurkat细胞裂解液 ( $1 \times 10^7$ cells)	1.6

## 9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人PD-L1的灵敏度为 0.04 ng/mL。



## 9.6 线性

人血浆、细胞上清、细胞裂解液加入高浓度的人PD-L1蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下：

(人血浆样本预先稀释4倍，细胞上清样本预先稀释4倍，细胞裂解液样本预先稀释4倍)

稀释倍数		人血浆 (样本稀释液 PT3-ef)	细胞上清 (样本稀释液 PT1-ef)	细胞裂解液 (样本稀释液 PT3-ef)
1:2	均值 (%)	79	108	94
	范围 (%)	76-82	91-124	79-109
1:4	均值 (%)	86	110	101
	范围 (%)	78-95	98-127	86-116
1:8	均值 (%)	84	107	100
	范围 (%)	75-97	96-121	86-114
1:16	均值 (%)	94	108	101
	范围 (%)	86-106	100-120	91-110

## 十：参考文献

1. Sharpe AH, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Nat Immunol. 8(3):239-45 (2007).
2. Keir ME, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 26:677-704 (2008).
3. Riley JL, et al. PD-1 signaling in primary T cells. Immunol Rev. 229(1):114-25 (2009).
4. Takeuchi M, et al. Soluble PD-L1 with PD-1-binding capacity exists in the plasma of patients with non-small cell lung cancer. Immunol Lett. 196:155-160 (2018).