

## Human PD-L1/B7-H1 ELISA 试剂盒

货号: BN50201

规格: 48T;96T

适用于人血清、血浆或细胞培养上清液等样本

### 简介

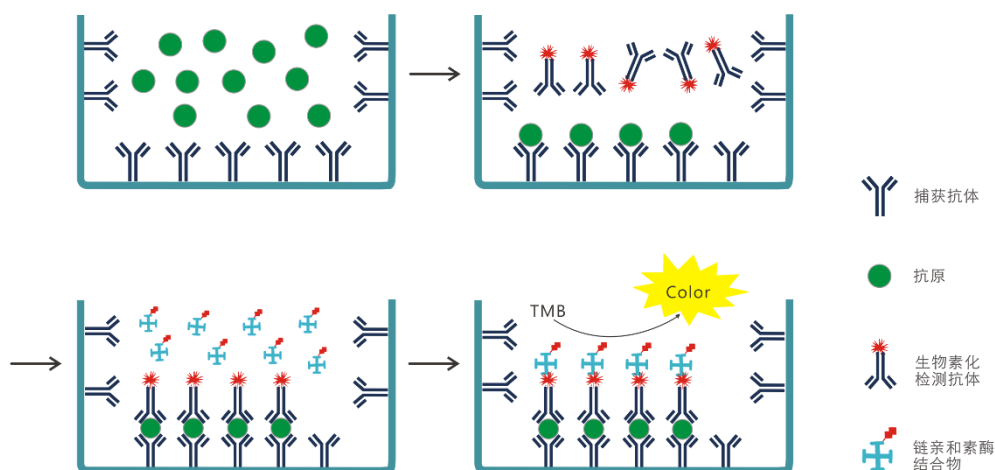
PD-1 是 T 细胞上的跨膜受体属于免疫球蛋白 B7-CD28 家族中的一员, 相对分子质量为 55000, 由胞外段、疏水性跨膜区及胞内段三者组成, 编码基因为第 2 号染色体的 PDCD1 基因, 胞内段的酪氨酸残基构成了 2 个基序, 即免疫受体酪氨酸抑制基序及转换基序两部分。PD-1 的表达主要存在于以下细胞的膜表面: (1) 绝大部分机体免疫细胞; (2) 多种癌细胞。

现已证实, B7 家族中的 PD-L1 (CD274) 和 PD-L2 (CD273) 是 PD-1 的 2 个配体, 二者具有 37% 的同源序列, 但表达不同。虽然 PD-L2 与 PD-1 相互作用的亲和力强于 PD-L1, 但 PD-L2 通常处于低表达状态且表达范围局限, 故目前认为 PD-1 的主要配体为 PD-L1。

T 细胞通过双重信号的刺激发挥免疫效应, 在信号传导过程中需要协同刺激分子的作用, 而协同刺激分子又分为正性和负性 2 种, 正常生理状态下二者保持平衡。然而, 在肿瘤患者中, 肿瘤细胞会为自身打造出适合自身生长的肿瘤微环境, 通过各种机制异常上调负性协同刺激分子, 高表达 PD-L1, 从而抑制 T 细胞的活化与增殖, 并使 T 细胞杀伤肿瘤细胞的作用减弱, 甚至丧失。基于此, 肿瘤可躲避机体的细胞免疫作用, 发生免疫逃逸, 进一步出现肿瘤的发生、发展。PD-1/PD-L1 信号通路参与肿瘤免疫逃逸机制错综复杂, 有研究发现, 其可能还与诱导 T 细胞的凋亡、促进上皮细胞间质化等相关。

### 检测原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗人 PD-L1/B7-H1 单克隆抗体预包被酶标板, 加入适度稀释的样本和标准品, 其中的 PD-L1/B7-H1 会与其单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗人 PD-L1/B7-H1 抗体, 抗人 PD-L1/B7-H1 抗体与结合在单抗上的人 PD-L1/B7-H1 结合而形成免疫复合物, 洗去游离的成分; 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 洗去未结合的酶结合物; 加入显色剂, 若反应孔中有 PD-L1/B7-H1, 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色; 加终止液变黄。在 450nm 下测 OD 值, PD-L1/B7-H1 浓度与 OD450 值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线计算出标本中 PD-L1/B7-H1 浓度。



检测原理示意图

### 试剂盒组分

| 试剂盒组分  | 96 孔 | 48 孔 | 配制       |
|--------|------|------|----------|
| 1a 标准品 | 2 支  | 1 支  | 按说明书进行稀释 |

本产品仅用于科研

|               |      |     |           |
|---------------|------|-----|-----------|
| 1b 标准品和标本稀释液  | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 2a 浓缩生物素化抗体   | 2 支  | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 2b 生物素化抗体稀释液  | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 3a 浓缩酶结合物（避光） | 2 支  | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 3b 酶结合物稀释液    | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 4 浓缩洗涤液 20×   | 1 瓶  | 1 瓶 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 显色剂（避光）       | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 终止液           | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 抗体包被板条        | 8×12 | 8×6 | 即用型       |
| 封板胶纸          | 4 张  | 2 张 | 即用型       |
| 说明书           | 1 份  | 1 份 |           |

### 储存条件

|             |  |
|-------------|--|
| 未启封的试剂盒     | 4℃保存，请于保质期内使用。                               |
| 已启封或重新溶解的试剂 | 1b 标准品和标本稀释液                                 |
|             | 2a 浓缩生物素化抗体（100×）                            |
|             | 2b 生物素化抗体稀释液                                 |
|             | 3a 浓缩酶结合物（避光 100×）                           |
|             | 3b 酶结合物稀释液                                   |
|             | 4 浓缩洗涤液 20×                                  |
|             | 显色剂（避光）                                      |
|             | 终止液  |
| 标准品         | 重溶后分装，-20℃存放一个月，避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃，不得重复使用。 |
| 抗体包被板条      | 实验中不用的板条应立即放回包装袋中，密封干燥 4℃保存。                 |

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

### 其他实验材料（不提供，但可协助购买）：

1. 酶标仪(450nm)
2. 高精度可调移液器及吸头：0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 $\mu$  l；一次检测样品较多时，最好用多通道移液器。
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37℃温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

### 注意事项

1. 试剂盒保存在2-8℃，除复溶后的标准品，其它成分不可冷冻。
2. 浓缩生物素化抗体(2a)、浓缩酶结合物(3a)装量极少，运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
4. 终止液和显色剂具腐蚀性，避免皮肤及粘膜直接接触，一旦接触到这些液体，请尽快用大量水冲洗。

- 使用干净的塑料容器配制洗涤液，使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
- 洗涤酶标板时应充分拍干，不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
- 不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分，不同批号的试剂盒组份不能混用，请在有效日期内使用本产品。
- 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔，加入试剂的顺序应一致，以保证所有反应孔孵育的时间一样。
- 充分混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
- 避免操作过程中酶标板干燥，干燥会使酶标板上生物成分迅速失活，影响实验结果。
- 适当的稀释样品，使样品值落在标准曲线范围内，根据待测因子含量高、中、低的不同，建议采用1:100, 1:10, 1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准，适当增加稀释度并重复检测。
- 标准品稀释液、操作人、移液方式、洗涤方法、孵育时间及温度、试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
- 此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。
- 不同批号试剂不可混用。

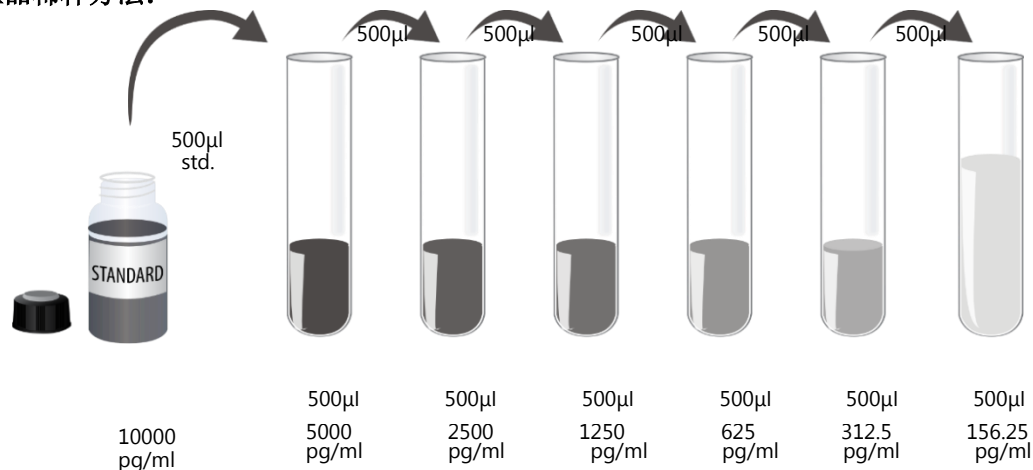
### 样本收集处理及保存方法

- 血清:** 使用不含热原和内毒素的试管，收集血液后，室温凝血30min， $1000\times g$ 离心10min，小心分离血清。
- 血浆:** 用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆，收集后30min内以 $1000\times g$ 离心15min去除颗粒。
- 细胞上清液:**  $1000\times g$ 离心10min去除颗粒和聚合物。
- 保存:** 若样品不立即检测，请将其按一次用量分装， $-20^{\circ}\text{C}$ ~ $-70^{\circ}\text{C}$ 保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒，检测前先离心或过滤去除；室温下解冻，请勿于 $37^{\circ}\text{C}$ 或更高的温度加热解冻。
- 稀释:** 可根据实际情况，将标本做适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数)。

### 试剂准备

- 提前30min从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
- 洗涤缓冲液:** 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，这属于正常现象，加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回 $4^{\circ}\text{C}$ 。
- 标准品:** 加入标准品/标本稀释液(1b) 1.0 ml至冻干标准品(1a)中，待彻底溶解后，静置15分钟混匀(浓度为 $10000\text{pg/ml}$ )，然后根据需要进行稀释，见下图(建议标准曲线使用以下浓度： $10000$ 、 $5000$ 、 $2500$ 、 $1250$ 、 $625$ 、 $312.5$ 、 $156.25$ 、 $0\text{pg/ml}$ )。稀释的标准品不得重复使用，未用完的标准品应按照一次用量分装后，将其放在 $-20^{\circ}\text{C}$ ~ $-70^{\circ}\text{C}$ 贮存，一次性使用，避免反复冻融。

#### 标准品稀释方法:



- 生物素化抗体工作液:** 根据每孔需要 $100\mu\text{l}$ 来计算总的用量，多配制 $100$ ~ $200\mu\text{l}$ 。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a) (1:100)。最好现用现配。(稀释方法参照下表)

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗体    |   | 生物素化抗体稀释液     |
|-------|-------------|---|---------------|
| 12    | 110 $\mu$ L | + | 10890 $\mu$ L |
| 10    | 90 $\mu$ L  | + | 8910 $\mu$ L  |
| 8     | 70 $\mu$ L  | + | 6930 $\mu$ L  |
| 6     | 50 $\mu$ L  | + | 4950 $\mu$ L  |
| 4     | 33 $\mu$ L  | + | 3267 $\mu$ L  |
| 2     | 17 $\mu$ L  | + | 1683 $\mu$ L  |
| 1     | 9 $\mu$ L   | + | 891 $\mu$ L   |

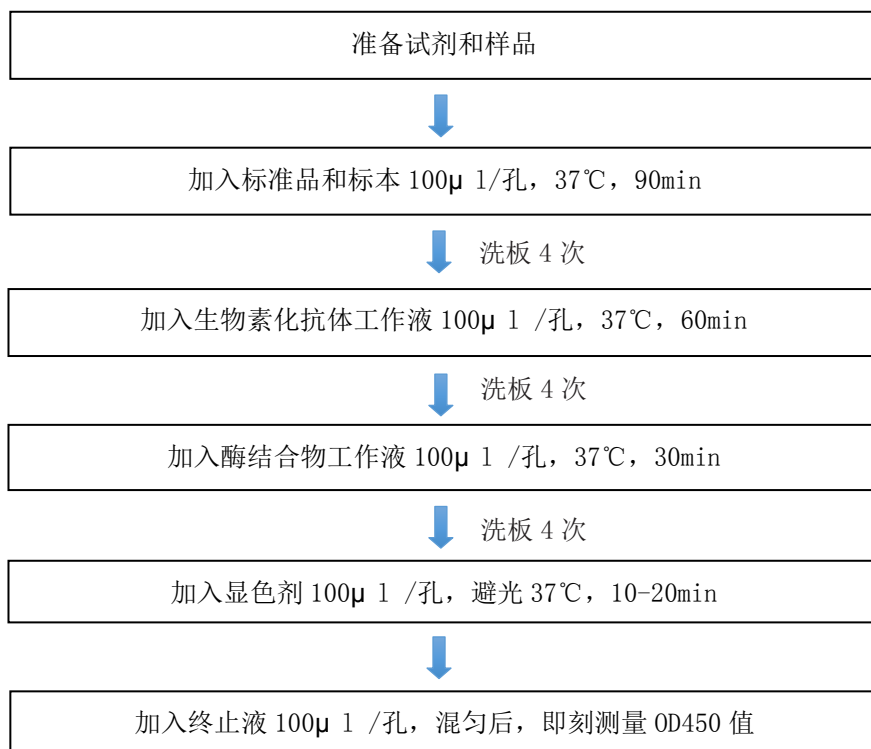
5. **酶结合物工作液**：以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a) (1:100)。最好现用现配。  
 (稀释方法参照下表)

| 所用板条数 | 浓缩酶结合物      |   | 酶结合物稀释液       |
|-------|-------------|---|---------------|
| 12    | 110 $\mu$ L | + | 10890 $\mu$ L |
| 10    | 90 $\mu$ L  | + | 8910 $\mu$ L  |
| 8     | 70 $\mu$ L  | + | 6930 $\mu$ L  |
| 6     | 50 $\mu$ L  | + | 4950 $\mu$ L  |
| 4     | 33 $\mu$ L  | + | 3267 $\mu$ L  |
| 2     | 17 $\mu$ L  | + | 1683 $\mu$ L  |
| 1     | 9 $\mu$ L   | + | 891 $\mu$ L   |

### 操作步骤

- 按照上述准备工作配制好各种溶液。
- 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数，并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100 $\mu$  l /孔)加入相应孔中(零孔只加标准品/样本稀释液)，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育90分钟(空白对照孔除外)。
- 洗板4次：(1)自动洗板机：要求注入的洗涤液为350 $\mu$  l，注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加洗涤液350 $\mu$  l，静置30秒后甩尽液体，在厚透吸水纸上拍干。
- 加入生物素化抗体工作液(100 $\mu$  l /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育60分钟(空白对照孔除外)。
- 洗板4次。
- 加入酶结合物工作液(100 $\mu$  l /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育30分钟(空白对照孔除外)。
- 洗板4次。
- 加入显色剂100 $\mu$  l /孔，避光，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育10-20分钟。
- 加入终止液100 $\mu$  l /孔，混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

### 操作流程



### 操作要点提示

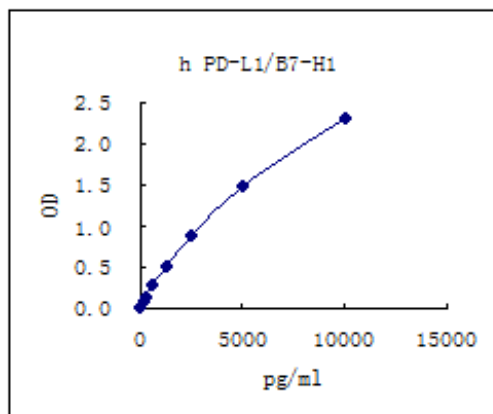
1. 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
2. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

### 结果判断

1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值，如果做复孔，求其平均值。
2. 使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y)，相应的PD-L1/B7-H1标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品的PD-L1/B7-H1含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。
3. 若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数算标本含量。
4. 参考数据：

| 标准品浓度 (pg/ml) | OD值1  | OD值2  | 平均值   | 矫正值   |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| 0             | 0.030 | 0.029 | 0.030 | ---   |
| 156.25        | 0.104 | 0.107 | 0.106 | 0.076 |
| 312.5         | 0.155 | 0.154 | 0.155 | 0.125 |
| 625           | 0.292 | 0.303 | 0.298 | 0.268 |
| 1250          | 0.511 | 0.516 | 0.514 | 0.484 |
| 2500          | 0.894 | 0.899 | 0.897 | 0.867 |
| 5000          | 1.534 | 1.414 | 1.474 | 1.444 |
| 10000         | 2.312 | 2.272 | 2.292 | 2.262 |

数据仅供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

### 结果重复性

板间，板内变异系数均<10%。

### 灵敏度

最低检测人 PD-L1/B7-H1 剂量小于 78pg/ml。最低检出量测定方法：20 个零标准的平均 OD 值增加两个标准差，再计算相应的浓度。

### 特异性

此试剂盒可检测天然和重组的人PD-L1/B7-H1，以50ng/ml平行做特异性试验，均不与下列细胞因子及蛋白反应。

| 重组人细胞因子          | 重组小鼠细胞因子         | 重组大鼠细胞因子        |
|------------------|------------------|-----------------|
| B7-1/Fc Chimera  | B7-H1/Fc Chimera | B7-1/Fc Chimera |
| B7-2/Fc Chimera  |                  |                 |
| B7-H2/Fc Chimera |                  |                 |
| B7-H3            |                  |                 |
| B7-H4            |                  |                 |
| B7-H6/Fc Chimera |                  |                 |
| PD-L2/Fc Chimera |                  |                 |