

EliKine™ 人程序性死亡配体1/PD-L1 ELISA定量试剂盒

Cat #: KTE6036

Size: 48 T/96 T

	人程序性死亡配体 1/PD-L1 ELISA 定量试剂盒		
REF	货号: KTE6036	LOT	批号: 见产品标签
	检测范围: 12.5 pg/mL-800 pg/mL		灵敏度: 6.25 pg/mL
	精密性: 板内变异系数<10%, 板间变异系数<12%		回收率: 范围从 98%到 116%, 平均回收率 106%
	特异性: 检测具有高灵敏度和优良的特异性。未观察到和人程序性死亡配体 1/PD-L1 类似物之间的显著交叉反应或干扰。		
	适用样本: 血清 (浆)、细胞培养上清		
	保质期: 4°C, 避光保存 12 个月		

原理

程序性死亡配体 1/PD-L1 (PD-L1) 是一种 I 型跨膜蛋白, 由 290 个氨基酸组成。PD-L1 广泛表达于抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APCs)中, 激活 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、胎盘滋养细胞、心肌内皮细胞和胸腺皮质上皮细胞。PD-L1 是 PD-1 的配体。与 PD-1 结合后, 通过免疫受体酪氨酸基开关基序(ITSM)招募酪氨酸磷酸酶 SHP-2, 使 TCR 信号通路中的多个关键分子去磷酸化, 抑制 CD4T 和 CD8T 细胞的增殖和活性, 负向调节机体的免疫应答过程。在健康机体中, 激活 PD-1/PD-L1 信号通路可将免疫反应对周围组织的损害降至最低, 避免自身免疫性疾病的发生。EliKine™ 人程序性死亡配体 1/PD-L1 ELISA 定量试剂盒采用双抗体夹心法来定量样品中的人程序性死亡配体 1/PD-L1。用抗人程序性死亡配体 1/PD-L1 的特异性抗体包被于酶标板上, 将样品或标准品加入酶标板的孔中, 其中的人程序性死亡配体 1/PD-L1 会与包被在板上的固相抗体结合。未结合的成分被洗去, 然后将 HRP 偶联的抗人程序性死亡配体 1/PD-L1 特异性抗体加入孔中。在洗涤去除任何未结合的 HRP 偶联抗体试剂后, 加入显色底物(TMB), TMB 在 HRP 催化下呈现蓝色, 加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值, 人程序性死亡配体 1/PD-L1 浓度与 OD450 值之间呈正比。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Human PD-L1 Microplate	48 wells	96 wells	4°C
Human PD-L1 Standard (lyophilized)	1	2	4°C
Sample Diluent (5×)	3.5 mL	7 mL	4°C
Assay Buffer (5×)	3.5 mL	7 mL	4°C
HRP-conjugated Human PD-L1 Detect Antibody (100×)	60 µL	120 µL	4°C

HRP Substrate (TMB)	5 mL	10 mL	4°C, 避光保存
Stop Solution	5 mL	10 mL	4°C
Wash Buffer (20×)	25 mL	50 mL	4°C
Plate Covers	1	2	室温

自备耗材

- 酶标仪（能测 450 nm 处的吸光度）
- 多通道移液器或自动洗板机
- 恒温箱、低温离心机
- 可调节式移液枪及枪头
- 去离子水

试剂准备

1×Sample Diluent: 使用前，平衡到室温，用去离子水按 1: 5 的比例稀释 Sample Diluent (5×)得到 1×Sample Diluent，轻轻混合以避免起泡。4°C保存，此溶液可稳定保存 30 天。1×Sample Diluent 用于稀释标准品，血清和血浆样品。

1×Assay Buffer: 使用前，平衡到室温，用去离子水按 1: 5 的比例稀释 Assay Buffer (5×)得到 1×Assay buffer，轻轻混合以避免起泡。4°C保存，此溶液可稳定保存 30 天。1×Assay buffer 用于稀释 HRP-conjugated Human PD-L1 Detect Antibody (100×)。

Human PD-L1 Standard: 加入 1 mL 1×Sample Diluent 复溶 Human PD-L1 Standard 得到 800 pg/mL 标准品。在进行稀释之前，将标准品至少放置 15 min 并轻轻晃动。

1×HRP-conjugated Human PD-L1 Detect Antibody: 稀释前充分混合。根据标准品和样品所需要的量，在干净的塑料管中用 1×Assay buffer 对 HRP-conjugated Human PD-L1 Detect Antibody (100×) 进行 1:100 稀释。1×HRP-conjugated Human PD-L1 Detect Antibody 应在稀释后 30 min 内使用。

HRP Substrate (TMB): 即用型；使用前，平衡到室温；4°C避光保存。

Stop Solution: 即用型；使用前，平衡到室温；4°C保存。

1×Wash Buffer: 使用前平衡到室温，Wash Buffer (20×)用去离子水进行 1:20 稀释得到 1×Wash buffer。轻轻混合以避免起泡，室温保存，此溶液可稳定保存 30 天。

标准曲线设置: 按下表所示，用 1×Sample Diluent 将 800 pg/mL 标准品稀释为 800、400、200、100、50、25、12.5 和 0 pg/mL 的 Human PD-L1 标准品。

序号	标准品体积	1×Sample Diluent 体积 (μL)	标准品浓度 (pg/mL)
Std.1	1,000 μL of 800 pg/mL	0	800
Std.2	500 μL of Std.1 (800 pg/mL)	500	400
Std.3	500 μL of Std.2 (400 pg/mL)	500	200
Std.4	500 μL of Std.3 (200 pg/mL)	500	100
Std.5	500 μL of Std.4 (100 pg/mL)	500	50
Std.6	500 μL of Std.5 (50 pg/mL)	500	25
Std.7	500 μL of Std.6 (25 pg/mL)	500	12.5
Std.8	0	500	0

注意：每次实验都需要新配制标准品。

样本制备

1. 细胞培养上清：离心除去颗粒，立即测定或分装-20°C保存，避免反复冻融。

2. 血清：使用血清分离管，让样品在室温下凝结 30 min，然后 1,000 g 离心 15 min。取上层血清立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。

3. 血浆：使用 EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂收集血浆。在收集后 30 min 内 1,000 g 离心 15 min。立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。

注意：不要使用严重溶血或脂血的标本。如果样品要在 24 h 内使用，则可以将其储存在 2 至 8℃，避免反复冻融。测定前，应将冷冻样品缓慢升至室温并轻轻混合。

实验步骤

1. 从板框上取下多余的板条，将它们放回装有干燥剂包的铝箔袋中，然后重新密封。
2. 除去每孔中的液体并洗涤，重复该过程总共洗涤三次。使用多通道移液器或自动清洗机每孔加入 250 μL 1×Wash buffer 进行洗涤，然后静置 1-2 min。在每个步骤中完全去除液体对于获得良好性能至关重要。最后一次洗涤后，倒置酶标板并用干净的纸巾吸干以除去任何剩余的 1×Wash buffer。
3. 每孔加入 100 μL 稀释的标准品或样品。建议所有标准品和样品做复孔。给酶标板覆膜，在室温下孵育 2 h。
4. 重复步骤 2 中的洗涤。
5. 每孔加入 100 μL 稀释的 1×HRP-conjugated Human PD-L1 Detect Antibody。给酶标板覆膜，在室温下孵育 1 h。
6. 重复步骤 2 中的洗涤 5 次。
7. 每孔加入 100 μL HRP Substrate (TMB)。给酶标板覆膜，并在室温下避光孵育 15 min。
8. 每孔加入 50 μL Stop Solution，Stop Solution 应按照与 TMB 相同的顺序加到板中。孔中的颜色应从蓝色变为黄色。如果孔中的颜色为绿色或颜色变化不均匀，请轻轻敲击板以确保彻底混合。
9. 在 30 min 内，测定每孔 450 nm 处的吸光值。

结果计算

1. 计算每个标准品和样品的复孔平均 OD 值，并减去零浓度 (Std.8) 平均 OD 值。
 2. 标准曲线的绘制：以标准品浓度为 x 轴，各标准品的平均吸光度为 y 轴，绘制标准曲线。可以使用作图软件来创建标准曲线。
- 注意：**如果样品被稀释，从标准曲线读取的浓度必须乘以稀释系数。

结果展示

典型标准曲线 ($R^2 \geq 0.99$)

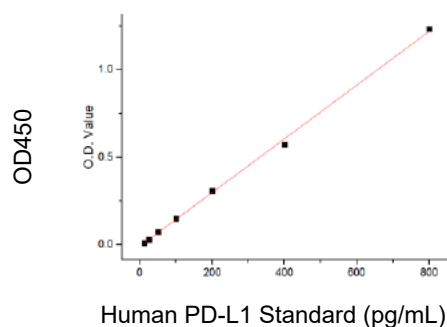


Figure1. 96 孔板分析的 Human PD-L1 标准曲线。数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线

注意事项

1. 如果 Sample Diluent (5×) 和 Assay Buffer (5×) 出现颜色变黄，少量沉淀等现象，是因为试剂中含有血清导致，离心去掉沉淀即可，不影响正常使用。
2. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
3. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。
4. 为确保准确的结果，在孵育步骤中必须正确粘附板贴。
5. Stop Solution 有一定的腐蚀性，操作时请做好防护措施。

常见问题

问题	原因	解决建议
标准曲线非线性	加样不准	检查移液器
	稀释不当	开管前轻柔搅拌和旋转标准品保存管使粉末完全溶解
信号过低	样本孵育时间过短	确保足够的孵育时间；标准/样品孵育时间增加到 2 或 3 小时
	试剂体积不足或稀释不当	检查移液器并确保准备充分
	TMB 孵育时间过短	加 Stop Solution 之前，确保有足够的孵育时间，直到出现蓝色
高背景/CV 值过高	洗板不充分	仔细检查清洗步骤。如果使用洗板机，检查所有接口
	Wash Buffer 被污染	准备新鲜的 Wash Buffer
低灵敏度	试剂盒保存不当	复溶的标准品-20℃保存（避免反复冻融），其他组分 4℃保存，TMB 注意避光
	终止问题	测量读数前需在所有空中加入 Stop solution 终止
稀释液沉淀	稀释液中有沉淀或凝结	稀释液缓慢加热至 37℃，沉淀可以复溶

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTE6035	EliKine™ 人程序性细胞死亡蛋白 1/PD-1 ELISA 定量试剂盒

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。