

PD-L1 TN-cyclon™ ELISA キット 操作マニュアル

目次

- ・ セット内容 p 3
- ・ セット以外に必要な試薬・機器 p 4
- ・ 背景と測定原理 p 5
- ・ 試薬の調製方法 p 6
- ・ アッセイプロトコル p 8
- ・ 測定例 p11

セット内容 (96 ウェルプレート 1枚分)

表示名	試薬の形状	容量	保存温度	危険表記および取扱い上の注意
96 ウェルプレート	-	1 プレート	常温	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体への接触を避けるよう十分に配慮してください。酵素サイクリング試薬 4*についてはウェブサイトのSDSを参照してください。
プレートシール	-	5 枚	常温	
捕捉抗体	液体	20 μ L 1 本 (20 μ g 相当)	冷凍 (-70℃以下) 融解後冷蔵 (2~8℃)	
検出抗体溶液	液体	10 μ L 1 本 (5 μ g 相当)	冷蔵 (2~8℃)	
標準抗原	液体	20 μ L 1 本 (0.2 μ g 相当)	冷凍 (-70℃以下) 融解後冷蔵 (2~8℃)	
捕捉抗体固相化バッファー	液体	20 mL 1 本	常温	
洗浄液 (20 倍濃縮)	液体	50 mL 1 本	常温	
標準抗原希釈液	液体	20 mL 1 本	冷蔵 (2~8℃)	
ブロッキング溶液	液体	40 mL 1 本	冷蔵 (2~8℃)	
検出抗体希釈液	液体	30 mL 1 本	冷蔵 (2~8℃)	
酵素サイクリング試薬 1	粉末	2.8 mg 4 本 (100 mM 溶液、 40 μ L 相当)	冷凍 (-30~-20℃)	
酵素サイクリング試薬 2	粉末	20.4 mg 1 本 (100 mM 溶液、 300 μ L 相当)	冷凍 (-30~-20℃)	
酵素サイクリング試薬 3	粉末	4.0 mg 1 本 (比活性 40 U/mg、1,000 U/mL 溶液、160 μ L 相当)	冷凍 (-30~-20℃)	

 【PD-L1 TN-cyclon™ ELISA キット】 一般研究用キット

 お問い合わせ先 (株)BioPhenoMA : info@biophenoma.com

酵素サイクリング試薬 4	粉末	2.3 mg 1 本 (50 mM 溶液、 120 μL 相当)	冷凍 (-30~-20℃)
酵素サイクリング試薬調製 液 1	液体	20 mL 1 本	冷蔵 (2~8℃)
酵素サイクリング試薬調製 液 2 (Thio-NAD 溶解液)	液体	1 mL 1 本	冷蔵 (2~8℃)
操作マニュアル	-	1 部	-

※ バッファー類に析出が見られる場合は、温浴で結晶を溶解させてからよく攪拌してご使用ください。

※ 酵素サイクリング試薬 4 は 17β-Methoxy-5β-androstan-3α-ol 3-phosphate (A3P) が原材料となります。SDS は弊社ウェブサイトからダウンロードしてください。

<https://www.biophenoma.com/pdl1kit>

《使用期限》：製造日より2ヶ月

セット以外に必要な試薬・機器等

- ・ 超純水
- ・ 100 μL – 1000 μL シングルチャンネルピペット、チップ
- ・ 10 μL – 200 μL シングルチャンネルピペット、チップ
- ・ 1 μL – 10 μL シングルチャンネルピペット、チップ
- ・ 50 μL – 200 μL マルチチャンネルピペット、チップ
- ・ リザーバーまたは分注する際に試薬を入れる容器
- ・ 1.5 mL チューブおよび 15 mL、50 mL の遠沈管
- ・ ペーパータオル
- ・ 恒温機能付き吸光マイクロプレートリーダー
(温度：37℃、測定波長：405 nm)
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 卓上遠心機
- ・ メスシリンダー
- ・ プレートシェイカー
- ・ プレートウォッシャー
- ・ メタノール（試薬特級）

背景と測定原理

PD-L1 は、その受容体である PD-1 と結合することにより T 細胞の活性を抑制もしくは停止させる免疫抑制機能を有するタンパク質分子です。通常、PD-L1 は抗原提示細胞の表面上に発現していますが、腫瘍細胞や腫瘍微小環境に存在する非形質転換細胞の細胞表面上においても発現することが知られています。免疫チェックポイント阻害剤による PD-1 との結合の遮断は腫瘍細胞の増殖を阻害することも明らかにされており、腫瘍組織における PD-L1 の発現量、ならびにそれが血中に放出されたものが、有用な効果予測バイオマーカーの候補とされています。

PD-L1 は血清中（可溶性 PD-L1）、ならびにエクソソームにも存在しています。がんにおけるエクソソームは水平伝播として利用され、それが「がん転移」の機構の重要な一端を担っています。また、健常者の血清中にも僅かながら PD-L1 は存在しますので、健常者からがん患者に変わるときに PD-L1 がどのように量的変化するかを理解も重要となります。これらの解明により、免疫チェックポイントの重要性が再認識され、その阻害剤の奏効率の向上にも一役買うこととなります。

しかしながら、そもそもエクソソームは量が少なく、健常者では血清中の PD-L1 も少ないため、健常者から早期がん患者への移行判別においては PD-L1 の極微量測定が必要となります。

本キットによる PD-L1 の測定は、サンドイッチ ELISA 法と酵素サイクリング法を組み合わせた独自技術である TN-cyclon™^{1), 2)}に基づいて行います（図 1）。本手法により、血清またはエクソソームを含むサンプル中のヒト PD-L1 を高感度に定量することができます。

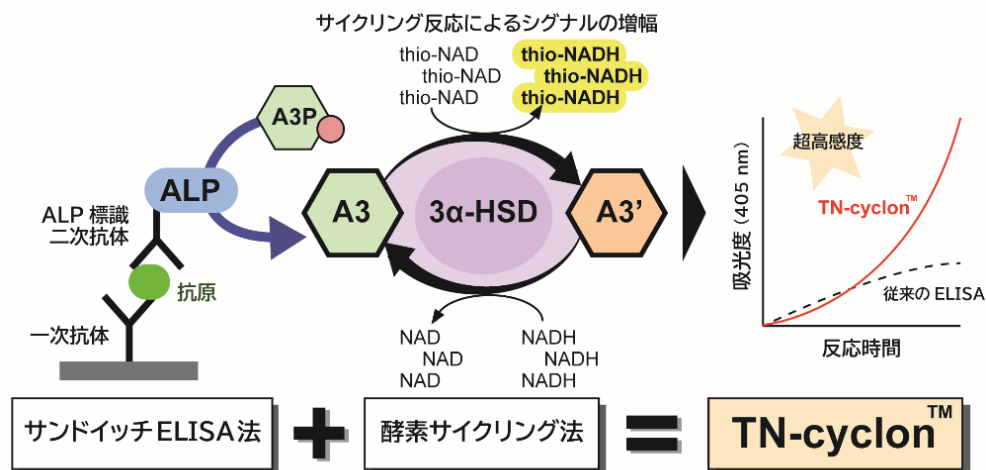


図 1 TN-cyclon™の原理

(TN-cyclon™はサンドイッチ ELISA 法と酵素サイクリング法を組み合わせたシグナル増幅手法です。)

(A3P (酵素サイクリング試薬 4) は弊社独自の基質となります。)

(原理 (簡易版) は以下の通りです。一次抗体 (補足抗体)、二次抗体 (検出抗体) を用いて抗原をサンドイッチ方式で挟み込みます。二次抗体はアルカリホスファターゼ (ALP) で標識されていますので、そこにリン酸基がついた基質 (A3P) を作用させると、ALP の働きによって、A3P からリン酸基が外れます (A3 に変化します)。次に、その

A3 を酵素サイクリング法で増幅します。サイクリングでは水酸化ステロイド脱水素酵素（ 3α -HSD）が中心の酵素となり、それ以外に NADH や Thio-NAD を補酵素として加えておくことで、サイクリング中に Thio-NADH が溜まってきます。この Thio-NADH の吸光極大波長の変化（405 nm）を測定することで、もとの抗原濃度が測定できます。（詳細は参考文献等をご参照ください。）

《対象》：ヒト

《検体》：血清またはエクソソームを含むサンプル

《測定項目》：PD-L1 の測定

※ 本キットは、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。本操作マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

試薬の調製方法

・洗浄液の調製

洗浄液（20 倍濃縮）を超純水で 20 倍希釈します。

例）プレート 1 枚分では 900 mL 以上要します。900 mL 作製する場合、洗浄液（20 倍濃縮）45 mL に超純水 855 mL を加え混合します。

・捕捉抗体の調製

捕捉抗体（1,000 倍濃縮）を捕捉抗体固相化バッファーで 1,000 倍希釈します。調製量に応じて、1.5 mL チューブや 15 mL 遠沈管、50 mL 遠沈管を使用してください。

※ 捕捉抗体はタッピングなどによりやさしく攪拌してください。ボルテックスミキサーによる強い攪拌は避けてください。攪拌後は卓上遠心機でスピンドウンしてから使用してください。

例）捕捉抗体（1,000 倍濃縮）10 μ L と捕捉抗体固相化バッファー 9,990 μ L を 15 mL 遠沈管もしくは 50 mL 遠沈管で混合します。

・標準抗原の調製

標準抗原（10 μ g/mL）と標準抗原希釈液を混合して希釈系列を作製します。調製量に応じて、1.5 mL チューブや 15 mL 遠沈管、50 mL 遠沈管を使用してください。

※ 標準抗原希釈液は室温に戻してから使用してください。

※ 標準抗原はタッピングなどによりやさしく攪拌してください。ボルテックスミキサーによる強い攪拌は避けてください。攪拌後は卓上遠心機でスピンドウンしてから使用してください。

例）標準抗原（10 μ g/mL）2 μ L と標準抗原希釈液 198 μ L を 1.5 mL チューブで混合して

100倍希釈し、100 ng/mL 溶液 (Dil1 とします) を作製します。

次に、下表のように 1.5 mL チューブを用いて調製します。

標準抗原希釈液	-	98 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L
添加するもの	-	Dil1	Dil2	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	-
添加する量	-	2 μ L	100 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	-
抗原濃度 (pg/mL)	10,000 [Dil1]	200 [Dil2]	40 [Std1]	20 [Std2]	10 [Std3]	5 [Std4]	2.5 [Std5]	1.25 [Std6]	0.625 [Std7]	0 [Blank]

※ Dil1 は用事調製してください。

・検出抗体の調製

検出抗体 (2,500 倍濃縮) を検出抗体希釈液で 10 倍希釈し、検出抗体 250 倍濃縮液を作製します。次に、検出抗体 250 倍濃縮液を検出抗体希釈液で 250 倍希釈します。調製量に応じて、1.5 mL チューブや 15 mL 遠沈管、50 mL 遠沈管を使用してください。

※ 検出抗体希釈液は室温に戻してから使用してください。

※ 検出抗体 250 倍濃縮液は用事調製してください。

※ 検出抗体はタッピングなどによりやさしく攪拌してください。ボルテックスミキサーによる強い攪拌は避けてください。攪拌後は卓上遠心機でスピンドウンしてから使用してください。

例) 検出抗体 (2,500 倍濃縮) 5 μ L と検出抗体希釈液 45 μ L を 1.5 mL チューブで混合し、検出抗体 250 倍濃縮液を 20 μ L 作製します。検出抗体 250 倍濃縮液 40 μ L と検出抗体希釈液 9,960 μ L を 50 mL 遠沈管で混合します。

・酵素サイクリング試薬

下表のとおり、酵素サイクリング試薬のチューブに溶媒を添加して溶解します。

酵素サイクリング試薬 (フタの色)	試薬 1 (青)	試薬 2 (黄)	試薬 3 (緑)	試薬 4 (ピンク)
添加する溶媒	酵素サイクリング試薬調製液 1	酵素サイクリング試薬調製液 2	酵素サイクリング試薬調製液 1	メタノール (試薬特級)
添加する量	100 μ L	300 μ L	160 μ L	160 μ L

※ 酵素サイクリング試薬調製液 1 および 2 は室温に戻してから使用してください。

※ 溶解直後の酵素サイクリング試薬 1 溶液は無色透明ないし薄い黄色ですが、保存期間中に黄色みが強くなり変色する場合があります。変色した溶液は使用せず、新たに調製してください。

※ 溶解後の酵素サイクリング試薬 2 は、遮光できるサンプルボックスなどに入れて保管してください。

※ 酵素サイクリング試薬 1、2、4 を溶解する際は、ボルテックスミキサーで攪拌してください。溶けづらいときはピペティングも併用してください。攪拌後は卓上遠心機でスピンドウンしてから使用してください。

- ※ 酵素サイクリング試薬 3 を溶解する際は、タッピングなどによりやさしく攪拌してください。ポルテックスミキサーによる強い攪拌は避けてください。攪拌後は卓上遠心機でスピンドウンしてから使用してください。
- ※ 溶解後の試薬はすべて冷蔵（2～8℃）にて保存してください。

<サンプルの調製>

【血清の場合】:

- ・血清を標準抗原希釈液で 100 倍希釈してください。

【エクソソームの場合】:

- ・トリス緩衝生理食塩水（pH7.5）などに懸濁したエクソソームを標準抗原希釈液に添加してください。必要に応じて、Triton™ X-100 などの界面活性剤を終濃度 1%となるように標準抗原希釈液に添加してからエクソソーム懸濁液と混合してください。

アッセイプロトコル

Day 1

1. 捕捉抗体の固相化

- ・希釈調製した捕捉抗体溶液 100 μL を各ウェルに添加します。プレートシールでウェルを保護し、冷蔵（4℃）で 16 時間以上静置します。

Day 2

2. 捕捉抗体の洗浄

- ・プレートウォッシャーにより捕捉抗体溶液を除き、希釈調製した洗浄液 300 μL を各ウェルに添加します。この操作をさらに 2 回繰り返します。
 - ※ プレートウォッシャーがない場合は、アスピレーターを使用するか、デカントして溶液を除いてください。
- ・洗浄後はウェルを逆さまにし、ペーパータオル等に叩きつけてしっかり水気を切ってください。

3. ブロッキング

- ・ブロッキング溶液 300 μL を各ウェルに添加します。
- ・プレートシールでウェルを保護し、室温で 1 時間静置します。

4. ブロッキング溶液の洗浄

- ・プレートウォッシャーによりブロッキング溶液を除き、希釈調製した洗浄液 300 μ L を各ウェルに添加します。この操作をさらに 8 回繰り返します。
 - ※ プレートウォッシャーがない場合は、アスピレーターを使用するか、デカントして溶液を除いてください。
- ・洗浄後はウェルを逆さまにし、ペーパータオル等に叩きつけてしっかり水気を切ってください。

5. 標準抗原およびサンプルの添加

- ・濃度調製した標準抗原溶液およびサンプル 100 μ L を各ウェルに添加します。
- ・プレートシールでウェルを保護し、室温で 1 時間、プレートシェイカーにより 400 rpm 程度で振とうします。
 - ※ ダイアル式プレートシェイカーを使用する場合は 400 rpm と同程度の振とう速度に合わせてください。

6. 標準抗原溶液およびサンプルの洗浄

- ・プレートウォッシャーにより標準抗原溶液およびサンプルを除き、希釈調製した洗浄液 300 μ L を各ウェルに添加します。この操作をさらに 8 回繰り返します。
 - ※ プレートウォッシャーがない場合は、アスピレーターを使用するか、デカントして溶液を除いてください。
- ・洗浄後はウェルを逆さまにし、ペーパータオル等に叩きつけてしっかり水気を切ってください。

7. 検出抗体の添加

- ・希釈調製した検出抗体 100 μ L を各ウェルに添加します。
- ・プレートシールでウェルを保護し、室温で 1 時間、プレートシェイカーにより 400 rpm 程度で振とうします。
 - ※ ダイアル式プレートシェイカーを使用する場合は 400 rpm と同程度の振とう速度に合わせてください。

8. 検出抗体の洗浄

- ・プレートウォッシャーにより検出抗体溶液を除き、希釈調製した洗浄液 300 μ L を各ウェルに添加します。この操作をさらに 8 回繰り返します。
 - ※ プレートウォッシャーがない場合は、アスピレーターを使用するか、デカントして溶液を除いてください。
- ・洗浄後はウェルを逆さまにし、ペーパータオル等に叩きつけてしっかり水気を切ってください。

9. 酵素サイクリング反応液の作製およびウェルへの添加

- ・下表のとおり、酵素サイクリング試薬調製液 1 に、溶解した酵素サイクリング**試薬 1、試薬 2、試薬 3、試薬 4 の順**に添加します。調製量に応じて、1.5 mL チューブや 15 mL 遠沈管、50 mL 遠沈管を使用してください。
- ・均一になるように混合したのち、すみやかに各ウェルに 100 μ L ずつ添加します。

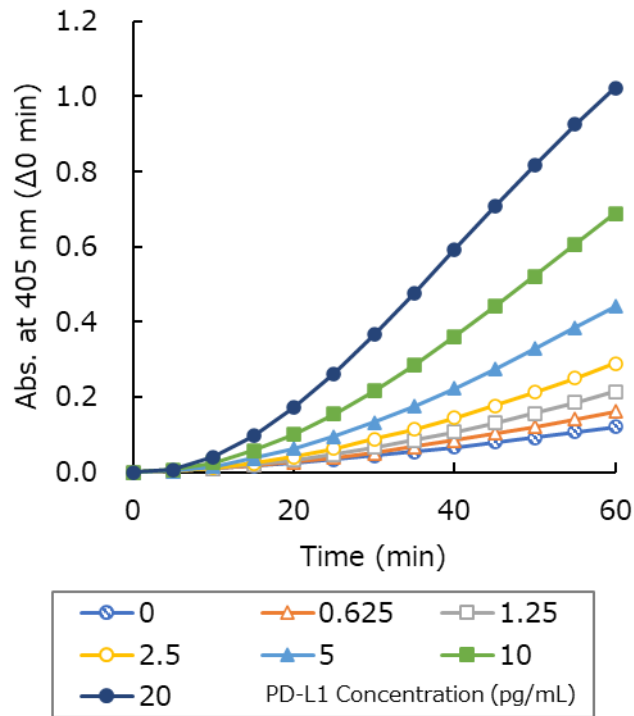
	100 μ L/1 ウェルあたりの調製量	例) 100 ウェル分を調製する場合
酵素サイクリング試薬調製液 1	95.2 μ L	9520 μ L
溶解した酵素サイクリング試薬 1	1.0 μ L	100 μ L
溶解した酵素サイクリング試薬 2	2.0 μ L	200 μ L
溶解した酵素サイクリング試薬 3	1.0 μ L	100 μ L
溶解した酵素サイクリング試薬 4	0.8 μ L	80 μ L

- ※ 変色した酵素サイクリング試薬 1 溶液は使用しないでください。測定データに影響を及ぼす恐れがあります。
- ※ 酵素サイクリング試薬の添加順は吸光度の測定値に影響する場合があります。必ず試薬の番号順に混合してください。
- ※ 酵素サイクリング試薬混合液を均一にする際は、タッピングなどによりやさしく攪拌してください。ボルテックスミキサーによる強い攪拌は避けてください。
- ※ 酵素サイクリング試薬混合液のウェルへの添加にはマルチチャンネルピペットの使用を推奨します。マルチチャンネルピペットを使用する場合は、酵素サイクリング試薬混合液をリザーバーに移してからウェルに添加してください。

1.0. 酵素サイクリング法による呈色反応 (37°C条件下) および吸光度の測定

- ・37°C条件下で酵素サイクリング法による呈色反応を行い、反応開始後、任意の経過時間で 405 nm の吸光度を測定します。
- 測定例) 測定波長を 405 nm (主波長) と 660 nm (副波長) に設定し、5 分間隔で 13 回、吸光度を測定すると下図のような測定データを取得することができます。
- ※ 測定例では副波長を 660 nm に設定して、[主波長吸光度] - [副波長吸光度] を Thio-NADH の真の吸光度として使用しておりますが、副波長を用いなくても測定、解析することはできます。
- ※ 恒温機能付き吸光マイクロプレートリーダーがない場合は、37°C に設定できるホットプレートなどの恒温装置をご使用ください。
- ※ 恒温機能付きマイクロプレートリーダーもしくはホットプレートなどの恒温装置は、反応開始までに装置内を 37°C に加温してください。反応開始時点で 37°C に達していない場合、測定データに影響を及ぼす恐れがあります。
- ※ ウェルをマイクロプレートリーダーで測定する前に、溶液に泡がないことを確認してください。泡が

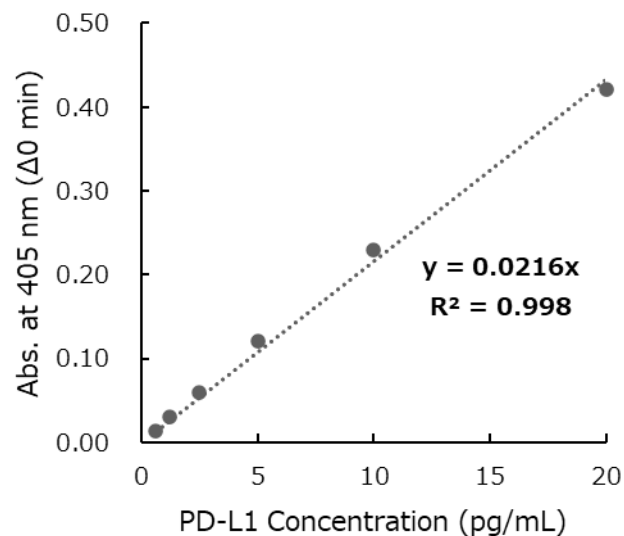
含まれていると測定データに影響を及ぼす恐れがあります。



測定例 ※本操作マニュアルのプロトコルに沿って実施した実験の結果をもとに作成しております。

・ 検量線

標準 PD-L1 濃度(pg/mL)に対する吸光度(405 nm (Δ0 min))の値は以下図のようになりました (測定波長 : 405 nm (主波長) 、660 nm (副波長) 、測定時間 : 60 min) 。ただし、検量線は、アッセイ毎に新たに描いて、サンプル中の濃度を算出するようにしてください。



各 PD-L1 濃度における吸光度の値と CV 値は以下表の通りでした。

PD-L1 (pg/mL)	吸光度 (405 nm)			平均吸光度 (濃度換算値)	CV(%)
	1	2	3		
0	0.125	0.119	0.122	0.122	4.64
0.625	0.168	0.154	0.164	0.162	3.63
1.25	0.218	0.199	0.226	0.214	5.28
2.5	0.305	0.278	0.287	0.290	3.87
5	0.442	0.430	0.455	0.442	2.31
10	0.692	0.672	0.700	0.688	1.71
20	1.110	0.975	0.985	1.023	6.00

・ 検出感度

ブランク吸光度の標準偏差 (SD: 3SD を使用) と検量線の傾きから算出した検出限界は、0.2 pg/mL 以下 (上記例では 0.154 pg/mL) でした。

・ 添加回収 (血清)

血清サンプルに既知濃度 (100 pg/mL) の PD-L1 を添加し回収率を算出した結果は以下表の通りでした。(血清サンプルは 100 倍希釈のものを使用。n=3 で測定)

サンプル	実測濃度 (pg/mL)	添加回収率 (%)
血清 (100倍希釈)	93.6	93.6

参考文献

- 1) Tsurusawa N, Iha K, Sato A, Tsai HY, Sonoda H, Watabe S, Yoshimura T, Wu DC, Lin MW, Ito E. Ultrasensitive Detection of GRP78 in Exosomes and Observation of Migration and Proliferation of Cancer Cells by Application of GRP78-Containing Exosomes. *Cancers*. 2022 Aug 11;14(16):3887. [doi: 10.3390/cancers14163887](https://doi.org/10.3390/cancers14163887).
- 2) Iha K, Tsurusawa N, Tsai HY, Lin MW, Sonoda H, Watabe S, Yoshimura T, Ito E. Ultrasensitive ELISA detection of proteins in separated lumen and membrane fractions of cancer cell exosomes. *Anal Biochem*. 2022 Oct 1;654:114831. [doi: 10.1016/j.ab.2022.114831](https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114831).

以上