



人 PD-L1 酶联免疫吸附检测试剂盒

货号：DLE2022001

规格：96T

灵敏度：42 pg/mL

检测范围：78.13-5000 pg/mL

（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断）

试剂盒组成

中文名称	英文名称	规格	保存条件
抗体预备酶标板（可拆）	Pre-coated Microplate	8 孔×12 条	4℃
冻干标准品	Standard (lyophilized)	2 支	4℃
标准品&样品通用稀释液	Standard Diluent Buffer	20mL	4℃
浓缩生物素标记抗体（100×）	Biotinylated Antibody (100×)	120μL	4℃
生物素标记抗体稀释液	Biotinylated Antibody Diluent	12mL	4℃
浓缩 HRP 酶结合物（100×）	Streptavidin-HRP (100×)	120μL	4℃
酶结合物稀释液	HRP Diluent	12mL	4℃
浓缩洗涤液（25×）	Wash Buffer (25×)	20mL	4℃
显色底物溶液（TMB）	TMB Substrate Solution	9mL	4℃（避光）
反应终止液	Stop reagent	6mL	4℃
封板覆膜	Plate Covers	2 张	
产品说明书	Instruction manual	1 份	

特别说明

1. 打开包装后请及时检查所有物品是否齐全完整。所有试剂的批号见标签。
2. 试剂盒保存：除稀释液外，其他-20℃（长时间存放）；2-8℃（一周内使用）。
3. 浓缩洗涤液低温保存会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。
4. 刚开启的酶标板孔中可能会含有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。

检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心法的原理，先将特异性 PD-L1 单克隆抗体包被于 96 孔板中，向微孔中加入含有人 PD-L1 蛋白的标准品或样本，使标准品中的人 PD-L1 蛋白或样本中的 PD-L1 蛋白与固相微孔板上的 PD-L1 单克隆抗体特异性结合，洗板后再加入生物素标记的 PD-L1 抗体，将未结合的生物素标记抗体洗净后，加入 HRP 标记的链霉亲和素，再次彻底洗涤后加入 TMB 底物显色。TMB 在过氧化物酶催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 PD-L1 蛋白含量呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD 值)，通过绘制标准曲线计算出样品浓度。

实验所需自备物品

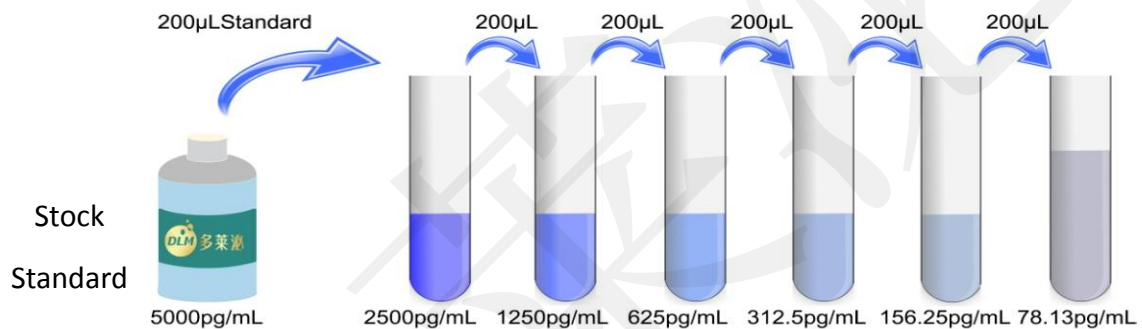
1. 标准规格酶标仪（含波长 450nm）
2. 高速离心机
3. 电热恒温箱
4. 混匀器
5. 高精度移液器，EP 管及一次性吸头（0.5-10μL、2-20μL、20-200μL、200-1000μL）
6. 双蒸水或去离子水，容量瓶，吸水纸等。

样本收集准备及保存

1. 血清：全血样品于室温放置 2 小时或 4°C 过夜后于 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。收集血液的试管应为一次性的无热源，无内毒素试管。存放-20°C 或-80°C 保存，应避免反复冻融。
2. 血浆：样品在采集后的 30 分钟内于 2-8°C、1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测。抗凝剂推荐使用 EDTA-Na₂，避免使用溶血，高血脂样品。存放-20°C 或-80°C 保存，应避免反复冻融。
3. 组织匀浆：取适量组织块，于预冷的 PBS (0.01M, pH7.0-7.2) 中清洗去除血液（匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果），称重后将组织剪碎，然后与对应体积的裂解液（一般按照 1:9 的质量体积比，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录，推荐在裂解液中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨；为了进一步裂解组织细胞，可对匀浆液进行超声破碎或反复冻融处理（超声破碎过程中注意冰浴降温，反复冻融法可重复 2 次）。最后将制备好的匀浆液于 5000×g 离心 5-10 分钟，取上清即可检测。
4. 细胞培养上清：取细胞上清于1000×g离心20分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清即可检测，置于-20°C或-80°C保存，但应避免反复冻融。
5. 细胞内蛋白：首先收集细胞，然后按照 6 孔板每孔加入 150-250μL 裂解液的比例加入裂解液。用移液器吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。轻轻的摇晃约 5-10 分钟。冰上孵育 1-3 小时充分裂解后，10000-14000g 4°C 离心 10 分钟，取上清,为蛋白提取物。
6. 尿液：请收集清晨第一次尿液（中段尿），或 24 小时尿液，2000×g 离心 15 分钟后收集上清，并将标本保存 于-20°C，且应避免反复冻融。
7. 唾液：用唾液样本采集管收集样本，然后于 2-8°C 1,000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或分装后于-20°C 保存。避免反复冻融。
8. 其它生物样品：请 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。
9. 外泌体：外泌体提取后立即检测，或者将样本存放于-20°C，且应避免反复冻融。
10. 样品收集后若在1周内进行检测可保存于4°C，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20°C（1个月内检测），或-80°C（3-6月内检测），避免反复冻融。
11. 如果您的样品中检测物浓度高于标准品最高值，请根据实际情况，做适当倍数稀释（建议先做预实验，以确定稀释倍数）。

检测前准备工作

1. 请提前 30 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
2. 用双蒸水将 25×浓缩洗涤液稀释成 1×工作液，未用完的放回 4℃。
3. 标准品：加入标准品&样品通用稀释液 1.0 mL 至冻干标准品中，旋紧管盖，静置 10 分钟，待其充分溶解后，轻轻混匀（浓度为 5000pg/mL）。此后进行倍比稀释成 2500pg/mL, 1250pg/mL, 625pg/mL, 312.5pg/mL, 156.25pg/mL, 78.13pg/mL, 标准品稀释液（0pg/mL）为空白孔。根据您的量配置好标准品待用。配置好的标准品建议在 15 分钟内加样，不建议放置过长时间。



4. 生物素标记抗体工作液：实验前计算当次实验所需用量（按100µL/孔计，实际配置时应多配置100-200µL），使用前15分钟，用抗体稀释液稀释浓缩生物素标记抗体（1:100）成工作浓度，现配现用。稀释原则即取1µL浓缩生物素标记抗体加到99µL抗体稀释液中，用移液器混匀。
5. 酶结合物工作液：实验前计算当次实验所需用量（按100µL/孔计，实际配置时应多配置100-200µL）。使用前15分钟，用酶结合物稀释液稀释浓缩HRP酶结合物（1:100）成工作浓度，现配现用。稀释原则即取1µL浓缩酶结合物加到99µL酶结合物稀释液中，用移液器混匀。
6. 浓缩洗涤液为25×高浓度试剂，使用前用蒸馏水或去离子水将其稀释25倍，比如取1ml浓缩洗液加入24ml蒸馏水或去离子水充分混匀后即可。

注意事项

1. 试剂盒使用前请按说明书提示存放。复溶后的标准品若未用完，请废弃。
2. 浓缩生物素标记抗体，浓缩酶结合物体积较小，运输过程中可能会分散在管子各部位，使用前请 $1000\times g$ 离心 1 分钟，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。取用前用移液器小心吹打 4-5 次使溶液混匀。标准品、生物素标记抗体工作液、酶结合物工作液请根据所需用量配置，并使用相应的稀释液配置，不能混淆。
3. 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，此为正常现象，可水浴或者培养箱中使结晶完全溶解后再配置洗涤液（加热温度不要超过 40°C ）。使用时洗涤液应为室温。
4. 加样需迅速，每次加样最好控制在 10 分钟以内，为了保证实验准确性，建议使用复孔。
5. 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在吸水纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。在读数前要注意清除底部残留的液体和手指印，以免影响酶标仪读数。
6. 显色剂 TMB 在储存和使用过程中应避免强光直接照射。加入底物后，注意观察反应孔中颜色变化，如果梯度已经明显请提前终止反应，避免颜色过深影响酶标仪读数。
7. 实验过程中使用的试管及试剂均为一次性，严禁重复使用，否则将影响实验结果。
8. 实验过程中请穿着实验服并带乳胶手套做好防护工作，特别是检测血液或者其它体液样品时，请按国家生物实验室安全防护条例执行。
9. 不同批号的试剂盒组分不能混用（洗涤液和反应终止液除外）。使用后的剩余试剂盒建议在首次实验后 1 个月内使用完毕。

操作步骤

1. 实验开始前，各试剂均应平衡至室温，提前配置好所有试剂。试剂或样品稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。如果样品浓度过高，用样品稀释液进行稀释，以使样品符合试剂盒的检测范围。
2. 加标准品或者待测样品 $100\mu\text{L}$ （样品需要稀释的，稀释方法请参照样品稀释原则），注意不要有气泡，加样时将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，酶标板加上盖或覆膜， 37°C 孵育 2 小时。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。
3. 弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次。洗板原则：每孔用 $200\mu\text{L}$ 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，甩

掉酶标板内的液体（或用洗板机进行洗板）。最后一次洗涤完成后，在吸水纸上将酶标板拍干。

4. 每孔加生物素抗体工作液 100 μ L（可提前 15 分钟配制），酶标板加上覆膜，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
5. 弃去孔内液体，洗板 3 次。每孔用 200 μ L 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，甩掉酶标板内的液体（或用洗板机进行洗板）。最后一次洗涤完成后，在吸水纸上将酶标板拍干。
6. 每孔加酶结合物工作液 100 μ L（可提前 15 分钟配制），37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
7. 弃去孔内液体，洗板 5 次。每孔用 200 μ L 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，甩掉酶标板内的液体（或用洗板机进行洗板）。最后一次洗涤完成后，在吸水纸上将酶标板拍干。
8. 每孔加入 TMB 显色底物溶液 90 μ L，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 分钟（根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过 30 分钟。当标准孔出现明显梯度蓝色时，即可终止）。
9. 每孔加入终止液 50 μ L，终止反应（此时蓝色立转黄色）。终止液的加入顺序应尽量与显色剂的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性，反应终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。
10. 立即用酶标仪在 450nm 波长的情况下测量各孔的光密度值（OD 值）。仪器使用前应预热，并设置好检测程序。

结果计算

1. 每个标准品和样品的 OD 值应减去空白孔的 OD 值。如设置复孔，则应取平均值计算。
2. 为了便于计算，尽管浓度为自变量而 OD 值为因变量，我们绘图时仍采用标准品的 OD 值作为横坐标（X 轴），标准品的浓度为纵坐标（Y 轴）。同时为了试验结果的直观性，图中提供的是原始数据而非对数值。由于实验操作条件的不同（如操作者、移液技术、洗板技术和温度条件等），标准曲线的 OD 值会有所差异。所提供的标准曲线仅供参考，实验者需要根据自己的实验建立标准曲线。用过样品的 OD 值可在标准曲线上计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。推荐使用专业的曲线绘制软件，如 curve expert。

特异性和重复性

- 特异性：可检测重组或天然的人 PD-L1，且不与其它相关蛋白交叉反应
- 重复性：板内、板间变异系数均 < 10%

问题分析

问题描述	可能原因	相应对策
高背景或阴性对照值偏高	洗涤不充分，洗后未排干，样本中残留物太多	浓缩洗液在配置前需要全部溶解后在稀释；加样本或者酶使用过的滤纸弃去不用，避免污染
	培养箱温度过高或者反应时间过长	严格按照说明书时间，调整培养箱温度于 37°C
	样本过多，加样时间过长	合理安排时间，样本较多时尽量分批检测
	蒸馏水污染	采用新鲜的蒸馏水
	细菌污染	更换新鲜稀释液或者对照组
阳性对照值偏低或低吸光度	试剂盒在运输过程中时间太长，温度太高	尽量缩短运输时间，夏季应放冰块降温
	试剂盒未充分平衡	试剂盒从 2-8°C 冰箱取出来后，需在室温下平衡至少 20 min
	培养箱温度不足 37°C	注意观察培养箱温度，减少开关门的次数
	洗涤时用力过猛，浸泡时间太长，洗涤次数增多	严格按照说明书给定的时间和次数来洗涤
边缘效应	板从室温置于 37°C 温箱，板也升温时，在外周孔与中心孔之间可能存在一热力学梯度	使用水浴或在将反应溶液加入至板孔中时，将板和溶液均加热至温育温度
	由于位置效应，边缘孔的湿度较中间孔更低，水分挥发的现象就更为严重	使用防挥发覆膜
标准曲线不佳	实验操作问题	合理用移液器，保证每孔加样一致
	错误的孵育时间或温度	严格按照说明书的孵育条件进行实验
	标准品污染	更换标准品



标准曲线良好， 但样本无检测 信号	未加入酶结合物	实验过程保证试剂不漏加
	样本存放时间太久	样本应采用新鲜样本，不能长期存放
	塑料管有吸附抗原的作用	血液样本尽量使用一次性玻璃试管或者真空管
重复性较差	样本过多，加样时间有长有短	减少加样个数，保证每次加样时间一致
	培养箱温度不一致	保证培养箱温度在 37°C，变化不能太大
	洗涤条件不一致	保证每次洗板次数和洗板力度一致； 配置洗液的水质要保证一致

备注

1. 限于现有条件及科学技术水平，尚不能对所有原料进行全面的鉴定分析，本产品可能存在一定的非质量技术风险。
2. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境密切相关，请务必准备充足的待测样品。
3. 为保证实验结果的准确性，请严格按照多莱泌生物的说明书操作，勿与其他公司试剂混用。
4. 有效期：6 个月。

使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分！

公司：多莱泌生物科技（武汉）有限公司

地址：湖北武汉东湖新技术开发区高新大道888号高农生物园总部B区1栋4楼

邮编：430000

座机：027-63495551 电话：18271200073

邮箱：dln_eb_support@dlmbiotech.com



微信公众号



市场部微信