

PD-L1/CD9 Exosome ELISA Kit, Human

ヒト PD-L1 陽性エクソソーム(CD9)ELISA キット

【I】キットについて

【I-1】背景と測定原理

がん細胞は、活性化 T 細胞表面に発現する PD-1 受容体に対する PD-L1(プログラム細胞死リガンド-1)を表面に発現し、PD-1/PD-L1 結合を介して T 細胞の活性を抑制することにより、免疫監視機構を回避します^{1), 2)}。近年、これらの免疫監視機構をがん治療に応用し、抗 PD-1 抗体薬や抗 PD-L1 抗体薬はこの結合を阻害することで T 細胞の活性化を増強することを目的として開発され、これまで様々な固形がんでその臨床効果や安全性が確認されています^{3), 4)}。

これら免疫チェックポイント阻害薬の効果予測因子として最もよく知られているのは、がん細胞上の PD-L1 発現であり、現在、臨床試験に組み入れられた PD-L1 IHC 検査(免疫組織化学染色法)が、がん組織・細胞中の PD-L1 発現率の測定を目的として開発が進められコンパニオン診断薬として利用されています。

一般的に IHC 検査は、侵襲性が高く被験者の負担も大きいことから、その負担を軽減できるエクソソームを利用したリキッドバイオプシの研究も進んでいます。

細胞が分泌するエクソソームにも PD-L1 が発現し、がん細胞表面の PD-L1 と同じトポロジーをとり、細胞外ドメインがエクソソームの表面に露出し、濃度依存的に T 細胞の PD-1 に結合します⁵⁾。また、転移性メラノーマ患者と健常者の血中循環エクソソームの比較において、転移性メラノーマ患者の PD-L1 レベルが有意に高いと示唆されています⁵⁾。しかしながら、この方法は超遠心法でエクソソームを精製する必要があるため、迅速で簡便に直接測定すること出来ませんでした。

本製品は、エクソソーム・マーカーである CD9 と免疫チェックポイント関連分子である PD-L1 に対する高性能な抗体を利用し、ヒトの血液や細胞培養液において細胞が分泌するエクソソームの表面に発現する PD-L1 分子を検出する 2 ステップサンドイッチ ELISA キットです。

本品は、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。

【I-2】キットの特長

- ・ ヒト血液サンプルや細胞培養上清などに含まれる PD-L1 陽性エクソソームを直接定量できます。
- ・ 特殊な装置は不要で、通常のプレートリーダーがあれば測定できます(波長 450nm)。
- ・ 標準試薬として保存安定性に欠けるエクソソームそのものを使用せず、PD-L1/CD9 融合タンパク質(標準タンパク質)を利用することで安定性と再現性を確保できます。
- ・ PD-L1/CD9 融合タンパク質(標準タンパク質)を用いた標準曲線で読み取ることで各サンプルの相対定量が可能です。
- ・ 固相化した CD9 抗体と HRP 標識した PD-L1 抗体を用いて、2 ステップサンドイッチ法でヒト PD-L1 陽性エクソソームを検出します。

【I-3】キットの原理




この ELISA キットは 2 ステップサンドイッチ法を原理としています。

キットの ELISA プレートは抗 CD9 抗体が予め固相されていて、サンプルを加えるとサンプル中のエクソソームがトラップされます。洗浄後、トラップされたエクソソームに発現する PD-L1 に対して HRP 標識抗 PD-L1 抗体を反応させ、基質添加後 HRP による発色をプレートリーダーで読み取り定量化します。

【I-4】構成

保存温度：冷蔵（2～8℃）

	内容	容量	数量	危険表記および取扱上の注意
1	抗 CD9 抗体 固相化プレート (96well)	8well x 12 strips	1 枚	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。
2	標準タンパク質 (PD-L1/CD9 融合タンパク質)	100μL	1 本*	
3	アッセイバッファー	25mL	1 本	
4	洗浄バッファー (10 倍濃縮)	25mL	1 本	
5	HRP 標識抗 PD-L1 抗体 (500 倍濃縮)	20μL	1 本	
6	基質液	12mL	1 本	

7	停止液(2N H ₂ SO ₄)	6mL	1 本	(成分として硫酸を 9.8%含む) 労働安全衛生法 第 57 条および第 57 条の 2 に該当 危険    ・吸入すると有害（気体、蒸気、ミスト） ・重篤な皮膚の薬傷及び眼の損傷 ・重篤な眼の損傷 ・呼吸器系の障害のおそれ ・長期にわたる、又は反復ばく露による呼吸器系の障害のおそれ
8	プレートシール		2 枚	

*n=2 として、検量線 2 回分

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- ・マイクロピペッター(10～1000μL)
- ・マルチチャンネルピペッター
- ・リザーバー
- ・プレートシェーカー
- ・プレートリーダー（波長 450nm が測定可能なもの）
- ・プレートウォッシャー

【Ⅱ】試薬、サンプルの調製方法

【Ⅱ-1】洗浄バッファーの調製

洗浄バッファー(10 倍濃縮)を精製水で 10 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分：洗浄バッファー(10 倍濃縮)25mL に精製水 225mL を加え、混合します。

【Ⅱ-2】標準タンパク質の希釈調製（プレート 1 枚あたり 2 ウェル分ずつ調製）

	濃度(ng/mL)	標準タンパク質	アッセイ バッファー	希釈率
A	100			
B	10	50μL of A	450μL	10
C	5	250μL of B	250μL	2
D	2.5	250μL of C	250μL	2
E	1.25	250μL of D	250μL	2
F	0.625	250μL of E	250μL	2
G	0.313	250μL of F	250μL	2
H	0.156	250μL of G	250μL	2

キットに入っている標準タンパク質（上表の A）50μL にアッセイバッファー450μL を加え（10 倍希釈）、よく混合した溶液を B とします。この B 溶液 250μL にアッセイバッファー250μL を加え（2 倍希釈）、よく混合した溶液を C とします。以下、同様に 2 倍希釈した溶液を調製し、100μL ずつ測定して下さい。各濃度 $n=2$ では、 $100\mu\text{L} \times 2 = 200\mu\text{L}$ 使用します。

希釈調製した標準タンパク質(0.156~10ng/mL)は、必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-3】抗体の調製

HRP 標識抗 PD-L1 抗体(500 倍濃縮)をアッセイバッファーで 500 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分：アッセイバッファー10mL に HRP 標識抗 PD-L1 抗体(500 倍濃縮)20μL を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗 PD-L1 抗体、必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-4】サンプル調製（血清/血漿サンプル）

血清または血漿はアッセイバッファーを用いて 10 倍に希釈し、これをサンプルとして測定します。

測定範囲上限(10ng/mL)を越えたサンプルは、アッセイバッファーを用いて更に適宜希釈して測定することにより、その濃度を求めることができます。

【Ⅱ-4】 サンプル調製（細胞培養上清）

細胞培養液を 2,000 x g で 10 分間遠心して、破片を取り除きます。その上清液をサンプルとして測定します。測定範囲上限(10ng/mL)を越えたサンプルは、アッセイバッファーを用いて適宜希釈して測定することにより、その濃度を求めることができます。

【Ⅱ-6】 サンプルの保存

未希釈のサンプルは-20℃以下で保存します。また、凍結融解を繰り返さないでください。

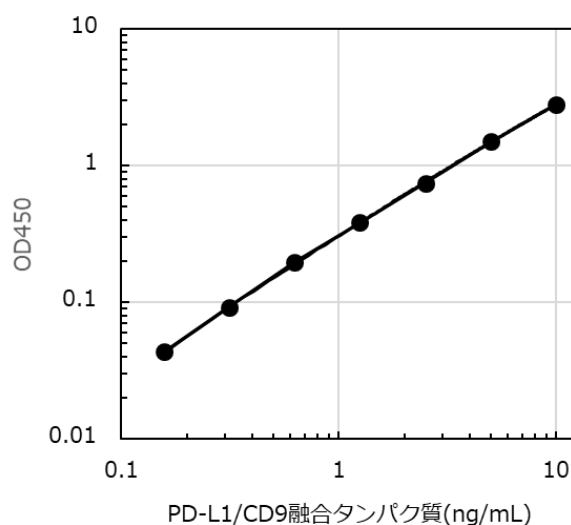
【Ⅲ】 測定方法

1. 抗 CD9 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. 標準タンパク質を希釈調製します（【Ⅱ-2】）。
3. 2 で希釈調製した標準タンパク質 (0.156~10ng/mL)もしくはサンプル溶液を 1 ウェルあたり 100μL ずつプレートへ加えます。
4. プレートにシールし、プレートシェーカーで攪拌(800rpm, 30 秒)します。
5. 室温で 1 時間攪拌(800rpm)して反応します。
6. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300μL の洗浄バッファー（【Ⅱ-1】）を加え、洗浄します。
この操作を 3 回行って下さい。
7. 希釈調製した HRP 標識抗 PD-L1 抗体（【Ⅱ-3】）を各ウェルに 100μL ずつ加えます。
8. プレートにシールし、プレートシェーカーで攪拌(800rpm, 30 秒)します。
9. 室温で 1 時間攪拌(800rpm)して反応します。
10. 抗体溶液を完全に除去し、各ウェルに 300μL の洗浄バッファー（【Ⅱ-1】）を加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。
11. 基質液を各ウェルに 100μL ずつ加え、室温で遮光して 20 分間静置反応します。
12. 発色の濃度を確認後、各ウェルに 50μL ずつ停止液を加えます。
13. プレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定します（測定波長：450nm）。
14. 横軸に標準タンパク質濃度、縦軸に吸光度を取り、標準曲線を描きます。
15. サンプル溶液から得られた吸光度を標準曲線に対応させ、標準タンパク質（PD-L1/CD9 融合タンパク質(ng/mL)）相当量としてサンプル溶液中の PD-L1 陽性エクソソーム濃度(Unit/mL)を算出し、希釈倍数を乗じます。

【IV】 測定例

【IV-1】 標準曲線

一例として、PD-L1/CD9 融合タンパク質の標準タンパク質に対する吸光度(OD450)をグラフに描くと図 1 のようになります。ただし、アッセイ毎に新たな標準曲線を描いて、サンプル中の濃度を算出してください。



(各標準タンパク質濃度の吸光度からブランク吸光度を差し引いた値をプロットしています)

標準タンパク質 (ng/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度	濃度計算値 (U/mL)
	1	2		
0	0.085	0.090	0.088	
0.156	0.131	0.131	0.131	
0.313	0.178	0.182	0.180	
0.625	0.275	0.294	0.285	
1.25	0.472	0.468	0.470	
2.5	0.839	0.834	0.837	
5	1.580	1.598	1.589	
10	2.871	2.928	2.900	
PC9 細胞 エクソソーム	0.340	-	0.340	0.83

図 1 PD-L1/CD9 融合タンパク質の標準タンパク質による標準曲線およびサンプル測定

【参考文献】

- 1) H. Dong, S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, L. Chen: *Nat Med.*, **8**, 793 (2002).
- 2) L. Chen, X. Han: *J Clin Invest.*, **125**, 3384(2015).
- 3) S. L. Topalian, F. S. Hodi, J. R. Brahmer, et al.: *N Engl J Med.*, **366**, 2443 (2012).
- 4) J. R. Brahmer, S. S. Tykodi, L. Q. Chow, et al.: *N Engl J Med.*, **366**, 2455 (2012).
- 5) G. Chen, A. C. Huang, W. Zhang, et al.: *Nature*, **560**, 382 (2018).

PD-L1/CD9 Exosome ELISA Kit, Human

【 I 】 About this kit

【 I – 1 】 Background and Measurement Principal

Tumor cells evade the immune surveillance by up-regulating surface expression of PD-L1, which interacts with PD-1 on T cells to elicit the immune checkpoint response^{1),2)}. In recent years, anti-PD-1 antibody drugs and anti-PD-L1 antibody drugs that inhibit this signal transduction have been confirmed to have clinical efficacy and safety in various solid cancers by enhancing T cell activation^{3), 4)}.

A well-known predictor of the effects of these immune checkpoint inhibitors is PD-L1 expression on cancer cells. The PD-L1 IHC test is used as a companion diagnostics for measuring PD-L1 expression rate in cancer tissues and cells.

As a general matter, because IHC tests are highly invasive, research on liquid biopsies using exosomes is also in progress.

Exosomal PD-L1 has the same membrane topology as the cell surface PD-L1, with its extracellular domain exposed on the surface of the exosomes⁵⁾. Exosomal PD-L1 binds PD-1 in a concentration-dependent manner. The level of PD-L1 on the circulating exosomes was significantly higher in patients with metastatic melanoma than that in healthy donors⁵⁾.

However, these methods require exosome purification using ultracentrifugation, there were no rapid and convenient direct measurement methods until now.

This product is a two-step sandwich ELISA, which utilizes high-performance anti-PD-L1 and anti-CD9 antibodies to directly detect PD-L1 molecules on the surface of exosomes in human blood samples and cell culture supernatants.

【 I – 2 】 Features

- Directly quantitate exosomal PD-L1 in human blood samples or cell culture supernatant.
- No special equipment is required. Standard microplate reader capable of reading at 450nm will do the job.
- Utilize PD-L1/CD9 fusion protein (Standard Protein), instead of unstable/hard to store exosome itself, to implement stability and reproducibility.
- Normalization with a standard curve using PD-L1/CD9 fusion protein (Standard Protein) enable to relative quantitate each sample.
- Detect human PD-L1 positive exosomes by two-step sandwich method using immobilized anti-CD9 antibody and HRP conjugated anti-PD-L1 antibody.

【 I – 3 】 Kit Principle

This ELISA kit uses two-step sandwich ELISA principle. The ELISA plate provided in this kit has been pre-coated with an anti-CD9 antibody.

First, samples were added onto the plate to capture exosomes by the anti-CD9 antibody. Next, HRP conjugated anti-PD-L1 antibody will be added to react with PD-L1 on the surface of exosomes. Finally, substrate will be added, then measure the coloring by the plate reader to quantitate sample exosomes.

【 I – 4 】 Kit Component

Storage temperature : 2 ~ 8 °C

	Reagent	Volume	Quantity
1	Anti-CD9 Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
2	Standard Protein (PD-L1/CD9 Fusion Protein)	100μL	1tube*
3	Assay Buffer	25mL	1vial
4	Washing Buffer (10X)	25mL	1vial
5	HRP Conjugated Anti-PD-L1 Antibody (500X)	20μL	1tube
6	Substrate Solution	12mL	1vial
7	Stop Solution (2N H ₂ SO ₄)	6mL	1vial
8	Plate Seals		2sheet

* Sufficient to create 2 standard curves with n=2.

Required Materials Not Included in the Kit

- Micropipettes (10 ~ 1000 μ L)
- Multichannel micropipette
- Multichannel micropipette Reservoir
- Plate shaker
- Microplate reader (enable to measure at wavelength 450nm)
- Plate washer

【Ⅱ】 Preparation of Reagents and Samples

【Ⅱ – 1】 Preparation of Washing Buffer

- Dilute Washing Buffer (10 \times) to 10 folds with purified water.
e.g. For 1 plate, add 225mL of purified water to 25mL of Washing Buffer (10 x) and mix well.

【Ⅱ – 2】 Preparation of Standard Protein solution

	Concentration (ng/mL)	Standard Protein	Assay Buffer	Dilution factor
A	100			
B	10	50 μ L of A	450 μ L	10
C	5	250 μ L of B	250 μ L	2
D	2.5	250 μ L of C	250 μ L	2
E	1.25	250 μ L of D	250 μ L	2
F	0.625	250 μ L of E	250 μ L	2
G	0.313	250 μ L of F	250 μ L	2
H	0.156	250 μ L of G	250 μ L	2

- To prepare Solution B, add 450 μ L of Assay Buffer into 50 μ L of Standard Protein (Solution A), and then mix well (10 times dilution). To prepare Solution C, add 250 μ L of Assay Buffer into 250 μ L of Solution B, and then mix well (2 times dilution). Similarly, 2 times dilution series for Solution D through H should be prepared.

- Use 200 μ L for measurement, using 2 wells for each solution (n=2).
- Diluted Standard Protein Solution(0.156~10 ng/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【Ⅱ-3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti-PD-L1 antibody (500x) to 500 folds using Assay Buffer.
e.g. For 1 plate, add 20 μ L of antibody (500x) into 10mL of Assay Buffer. Mix by inverting the tube.
- * Diluted antibody solution should be freshly prepared at each time before use.

【Ⅱ-4】 Preparation of Samples (For Blood samples)

Serum or plasma is measured as a sample diluted 10-fold with Assay Buffer.
Samples generating absorbance values greater than that of the highest standard should be further diluted using Assay Buffer and reanalyzed.

【Ⅱ-5】 Preparation of Samples (For cell culture medium supernatant)

Centrifuge cell culture media at 2,000 x g for 10 minutes to remove debris.
Collect supernatants and assay.
Samples generating absorbance values greater than that of the highest standard should be further diluted using Assay Buffer and reanalyzed.

【Ⅱ-6】 Sample Storage

Store un-diluted sample at -20°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

【Ⅲ】 Sample measurement procedure

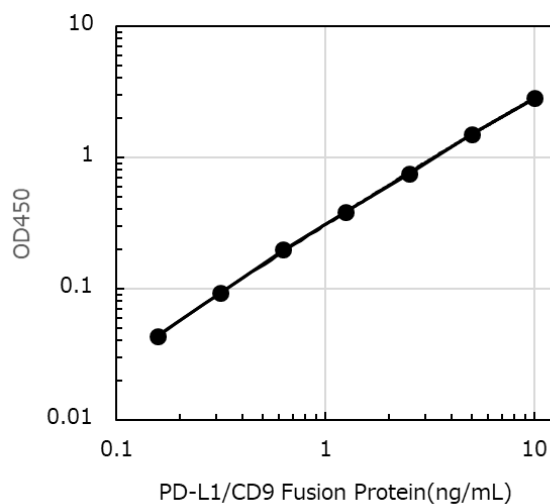
1. Bring anti-CD9 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare Standard Protein solution by serial dilution. (from step 【Ⅱ-2】)
3. Add 100 μ L each of serial diluted Standard Protein solution (0.156 ~ 10 ng/mL) or Sample solution into the well.

4. Seal the microplate with Plate Seals, place into plate shaker, and then shake it at 800 rpm for 30 sec.
5. Incubate at room temperature for 1 hour on a plat shaker set to 800 rpm.
6. Discard all the reaction solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer (from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.
7. Add 100 μ L each of diluted HRP conjugated anti-PD-L1 antibody (from step 【II-3】) to the well.
8. Seal the plate, and then shake it in the plate shaker at 800 rpm for 30 sec.
9. Incubate at room temperature for 1 hour on a plat shaker set to 800 rpm.
10. Discard the reaction solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer(from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.
11. Add 100 μ L of Substrate Solution into each well, and then incubate at room temperature protected from light for 20min for static reaction.
12. Visually confirm the coloring, and then add 50 μ L each of Stop Solution.
13. Place into the Plate-reader, and read the absorbance of each well on a spectrophotometer at the wavelength of 450nm.
14. Create a standard curve by plotting the average blank control subtracted absorbance value for each Standard Protein concentration (y axis) against the Standard Protein concentration (x axis).
15. Calculate the concentration by comparing the absorbance obtained from the sample solution to the standard curve. Determine the PD-L1-positive exosome concentration (Unit/mL) in the sample solution as the PD-L1/CD9 fusion protein (ng/mL) equivalent. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, to obtain the concentration of PD-L1 positive exosome in the sample.

【IV】 Measurement example

【IV- 1】 Standard curve

As an example, the graph of absorbance (OD450) against standard concentration is drawn as shown in Figure 1. However, draw a new standard curve for each assay to calculate the concentration in the sample.



(Plotted is the value obtained by subtracting the blank absorbance from the absorbance of each standard protein concentration)

Standard Protein (PD-L1/CD9 Fusion Protein) (ng/mL)	Absorbance (450nm)		Average	Calculated concentration (U/mL)
	1	2		
0	0.085	0.090	0.088	
0.156	0.131	0.131	0.131	
0.313	0.178	0.182	0.180	
0.625	0.275	0.294	0.285	
1.25	0.472	0.468	0.470	
2.5	0.839	0.834	0.837	
5	1.580	1.598	1.589	
10	2.871	2.928	2.900	
Exosome of PC9 cells	0.340	-	0.340	0.84

Fig.1 Standard curve and measured values

【Reference】

- 1) H. Dong, S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, L. Chen: *Nat Med.*, **8**, 793 (2002).
- 2) L. Chen, X. Han: *J Clin Invest.*, **125**, 3384(2015).
- 3) S. L. Topalian, F. S. Hodi, J. R. Brahmer, et al.: *N Engl J Med.*, **366**, 2443 (2012).
- 4) J. R. Brahmer, S. S. Tykodi, L. Q. Chow, et al.: *N Engl J Med.*, **366**, 2455 (2012).
- 5) G. Chen, A. C. Huang, W. Zhang, et al.: *Nature*, **560**, 382 (2018).