

# PD-L2 ELISA Kit, Human

## ヒト PD-L2 ELISA キット

---

### 【I】キットについて

---

#### 【I-1】背景と測定原理

PD-1 (Programmed cell Death 1) を標的とした免疫チェックポイント阻害療法は、PD-L1 発現腫瘍を有する癌患者において顕著な臨床的利益をもたらしています。PD-L2 も頭頸部扁平上皮癌、唾液腺癌 (SGC)、前立腺癌、胃癌、大腸癌、食道腺癌、および膀胱癌で高度に発現していることが確認されています。PD-L2 の構造は PD-L1 と類似していますが、PD-L2 と PD-1 の結合親和性は PD-L1 の 2~6 倍高く、強い相互作用によってサイトカイン分泌と T 細胞の増殖が抑制されるため、PD-L2 は免疫回避において重要な分子であることが示唆されています。PD-L2 は免疫機能に加えて、PD-1 とは関係なく他のタンパク質と相互作用することで、腫瘍形成において強力な生物学的役割を持つことも検証されています。これらの発見は、PD-L2 の機能を理解するための新たなステージであり、抗 PD-1 療法の効率向上に向けた新たな知見をもたらします。<sup>1)</sup>

本キットは、免疫チェックポイント関連分子である PD-L2 に対する高性能抗体を用いた 2 ステップサンドイッチ法により、ヒト PD-L2 を定量することができます。

#### 【I-2】キットの特長

- ・細胞培養上清に含まれる PD-L2 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)。
- ・固相化した PD-L2 抗体と HRP 標識した PD-L2 抗体を用いて、2 ステップサンドイッチ法でヒト PD-L2 を検出します。

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-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。このキットのELISAプレートは抗ヒトPD-L2抗体が予め固相されています。

最初に、サンプルをHRP標識抗ヒトPD-L2抗体と共にプレートのウェルに加えます。




次に、洗浄後、プレートにトラップされたサンプル中のヒトPD-L2とHRP標識抗ヒトPD-L2抗体の結合物に基質を添加します。

最後に、HRPによる発色をプレートリーダーで読み取り、サンプル中のヒトPD-L2を定量します。

### 【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PD-L2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PD-L2	150μL	1本 <sup>*1</sup>	
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) <sup>*2</sup>	25mL	1本	
5	HRP標識抗PD-L2抗体 (500倍濃縮) <sup>*3</sup>	20μL	1本	
6	基質液	12mL	1本	

7	停止液(2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	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  <b>危険</b>     ・吸入すると有害 (気体、蒸気、ミスト) ・重篤な皮膚の薬傷及び目の損傷 ・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		1 枚	

\*<sup>1</sup>n=2 として、検量線 3 回分

\*<sup>2</sup> 洗浄バッファー(10 倍濃縮)は、冷蔵保管中に結晶が析出する場合がありますので、45℃で加温して溶解後に使用してください。

\*<sup>3</sup> 本キットを速やかに使用しない場合は、標識抗体をキットから取り出して-20℃に保管してください。

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 PD-L2 の希釈調製（アッセイ毎に 2 ウェル分ずつ調製）

	PD-L2 濃度 (pg/mL)	標準 PD-L2	アッセイ バッファー	希釈率
A	20000			
B	2000	50 $\mu$ L of A	450 $\mu$ L	10
C	1000	250 $\mu$ L of B	250 $\mu$ L	2
D	500	250 $\mu$ L of C	250 $\mu$ L	2
E	250	250 $\mu$ L of D	250 $\mu$ L	2
F	125	250 $\mu$ L of E	250 $\mu$ L	2
G	62.5	250 $\mu$ L of F	250 $\mu$ L	2
H	31.25	250 $\mu$ L of G	250 $\mu$ L	2

キットに入っている標準 PD-L2（上表の A）50 $\mu$ L にアッセイバッファー450 $\mu$ L 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 250 $\mu$ L にアッセイバッファー250 $\mu$ L 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、100 $\mu$ L ずつ測定して下さい。各濃度 n=2 では、100 $\mu$ L x 2 = 200 $\mu$ L 使用します。

希釈調製した標準 PD-L2(31.25~2000 pg/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-L2 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-L2 抗体(500 倍濃縮)を 20 $\mu$ L を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗 PD-L2 抗体、必要量を用時調製してください。

## 【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、デブリを取り除きます。その上清液をサンプルとして測定します。測定範囲上限(2000pg/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-5】サンプルの保存

サンプル調製後測定までは 2~8 $^{\circ}$ C で保存して下さい。

---

### 【Ⅲ】測定方法

---

1. 抗 PD-L2 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. 標準 PD-L2 を希釈調製します（【Ⅱ-2】）。
3. 2 で希釈調製した標準 PD-L2 (32.5~2000 pg/mL)もしくはサンプル溶液を 1 ウェルあたり 100 $\mu$ L ずつプレートへ加えます。
4. プレートにシールし、室温で 1 時間プレートシェーカーを用いて攪拌(800rpm)します。
5. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 $\mu$ L 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。
6. 希釈調製した HRP 標識抗 PD-L2 抗体（【Ⅱ-3】）を各ウェルに 100 $\mu$ L ずつ加えます。
7. プレートにシールし、室温で 1 時間プレートシェーカーを用いて攪拌(800rpm)します。
8. 抗体溶液を完全に除去し、各ウェルに 300 $\mu$ L の洗浄バッファーを加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。
9. 基質液を各ウェルに 100 $\mu$ L ずつ加え、室温で遮光して 20 分間静置反応します。
10. 発色の濃度を確認後、各ウェルに 50 $\mu$ L ずつ停止液を加えます。
11. 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）。
12. 横軸に標準 PD-L2 濃度、縦軸に吸光度を取り、標準曲線を描きます。
13. 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て PD-L2 濃度(pg/mL)を算出し、希釈倍数を乗じます。

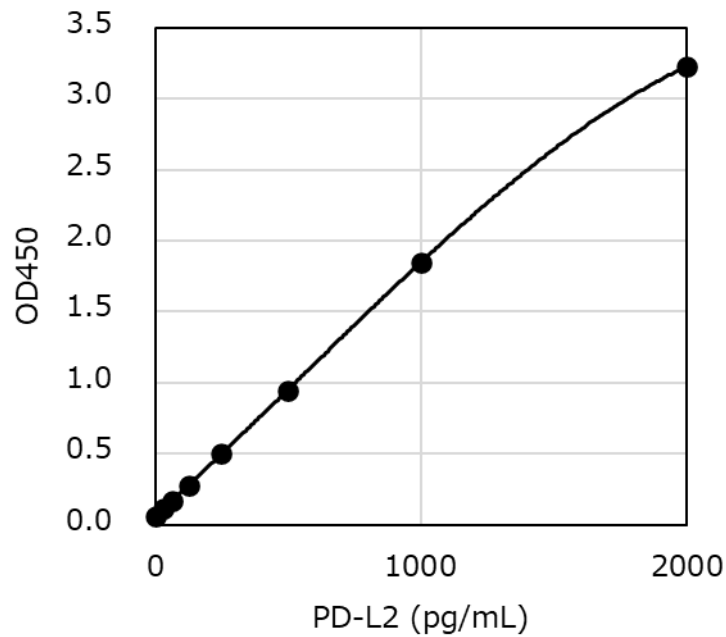
---

### 【Ⅳ】測定例

---

#### 【Ⅳ-1】標準曲線

一例として、標準 PD-L2 濃度(pg/mL)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、標準曲線は、アッセイ毎に新たに描いて、サンプル中の濃度を算出してください。

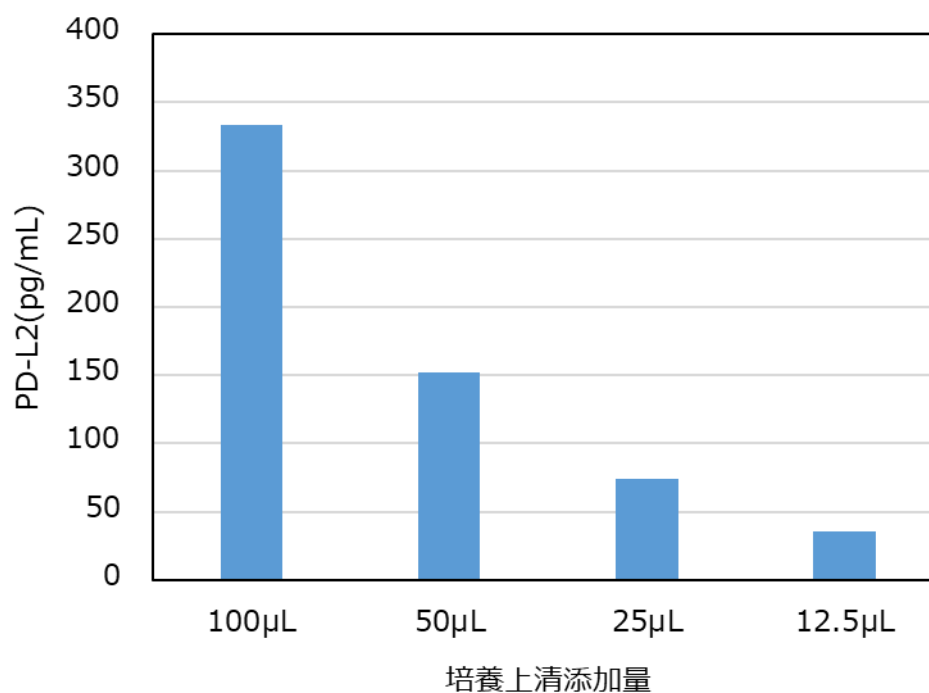


PD-L2 (pg/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度
	1	2	
0	0.061	0.062	0.062
31.25	0.115	0.118	0.117
62.5	0.169	0.167	0.168
125	0.275	0.281	0.278
250	0.498	0.509	0.504
500	0.939	0.957	0.948
1000	1.850	1.851	1.851
2000	3.228	3.226	3.227

図1 標準 PD-L2 による標準曲線

## 【IV-2】 サンプルの測定例

PD-L2 高発現細胞株(ヒト腎癌)培養上清を 12.5, 25, 50, 100 $\mu$ L ずつウェルに加え測定した結果は図2のようになります。



---

### 【V】キットの有効期限及び貯法

---

有効期限：箱ラベルに表示

貯法：冷蔵（2～8℃）

---

### 【参考文献】

---

- 1) Y. Wang, et al.: *Br J Cancer.*, **128**, 1196 (2022).

## PD-L2 ELISA Kit, Human

---

### **【 I 】 About this kit**

---

#### **【 I – 1 】 Background and Measurement Principal**

Immune checkpoint blockade therapies targeting programmed cell death protein 1 (PD-1) achieve marked clinical benefits in cancer patients harboring programmed death ligand-1 (PD-L1) expression tumors. PD-L2 was confirmed highly expressed in HNSCC, salivary gland cancer (SGC), prostate cancer, gastric cancer, colorectal cancer, oesophageal adenocarcinoma, and bladder cancer. Although the structure of PD-L2 is similar to PD-L1, the binding affinity between PD-L2 and PD-1 is two- to sixfold higher than that with PD-L1, suggesting PD-L2 is an important molecule in immune escape as the strong interaction inhibits cytokines secretion and proliferation of T cells. These findings open a new era to understand the function of PD-L2 and provide new insights for improving the efficiency of anti-PD-1 therapy. <sup>1)</sup>

This kit detects human PD-L2 by a two-step sandwich method using the high-performance antibody against human PD-L2, an immune checkpoint related molecule.

#### **【 I – 2 】 Features**

- Directly quantitate PD-L2 in the cell culture supernatant.
- No special equipment is required. Standard microplate reader capable of reading at 450nm will do the job.
- Detects high sensitivity human PD-L2 with rapidly by a two-step sandwich method using solid phase anti human PD-L2 antibody and HRP conjugated anti human PD-L2 antibody.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

### 【 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-human PD-L2 antibody.

First, the sample is added into the wells of the ELISA plate with HRP conjugated anti-PD-L2 antibody and allowed to react. Next, after washing, substrate is added to the HRP conjugated anti-PD-L2 antibody reacted with PD-L2. Finally, HRP color development is read with a plate reader to quantify human PD-L2 in the sample.

### 【 I – 4 】 Kit Component

Storage temperature : 2 ~ 8 °C

	Reagent	Volume	Quantity
1	Anti-PD-L2 Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
2	PD-L2 Standard	150μL	1tube <sup>*1</sup>
3	Assay Buffer	25mL	1vial
4	Washing Buffer (10X) <sup>*2</sup>	25mL	1vial
5	HRP Conjugated Anti-PD-L2 Antibody (500X) <sup>*3</sup>	20μL	1tube
6	Substrate Solution	12mL	1vial
7	Stop Solution (2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	6mL	1vial
8	Plate Seals		2sheets

<sup>\*1</sup> Sufficient to create 3 standard curves with n=2.

<sup>\*2</sup> Crystals may precipitate in the Washing Buffer (10x) during refrigerated storage. Warm the buffer to dissolve it at 45°C before use.

<sup>\*3</sup> If the kit is not going to be used immediately, remove the labeled antibody from the kit and store it at -20°C.

#### Required Materials Not Included in the Kit

- Micropipettes (10 ~ 1000 μL)
- 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(Prepare 2 wells for each assay)

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

### 【II – 2】 Preparation of Standard Protein solution

	Concentration (pg/mL)	PD-L2 Standard	Assay Buffer	Dilution factor
A	20000			
B	2000	50μL of A	450μL	10
C	1000	250μL of B	250μL	2
D	500	250μL of C	250μL	2
E	250	250μL of D	250μL	2
F	125	250μL of E	250μL	2
G	62.5	250μL of F	250μL	2
H	31.25	250μL of G	250μL	2

- To prepare Solution B, add 450μL of Assay Buffer into 50μL of PD-L2 Standard (Solution A), and then mix well (10 times dilution). To prepare Solution C, add 250μL of Assay Buffer into 250μL of Solution B, and then mix well (2 times dilution). Similarly, 2 times dilution series for Solution D through H should be prepared.
- Use 200μL for measurement, using 2 wells for each solution (n=2).
- Diluted PD-L2 Standard Solution(31.25~2000 ng/mL) should be freshly prepared at each time before use.

### 【II – 3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti-PD-L2 antibody (500x) to 500 folds using Assay Buffer.

e.g. For 1 plate, add 20 $\mu$ 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 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-5】 Sample Storage**

After sample preparation, store at 2-8°C until measurement.

---

### **【III】 Sample measurement procedure**

---

1. Bring anti-PD-L2 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare PD-L2 Standard solution by serial dilution. (from step 【II-2】 )
3. Add 100 $\mu$ L each of serial diluted PD-L2 Standard solution (32.5~2000 pg/mL) or Sample solution into the well.
4. Seal the microplate with Plate Seals.
5. Incubate at room temperature for 1 hour on a plate shaker set to 800 rpm.
6. Discard all the reaction solution, and then rinse each well with 300 $\mu$ L of Washing Buffer (from step 【II-1】 ). Repeat this step for 3 times.
7. Add 100 $\mu$ L each of diluted HRP conjugated anti-PD-L2 antibody (from step 【II-3】 ) to the well.
8. Seal the microplate with Plate Seals.
9. Incubate at room temperature for 1 hour on a plate shaker set to 800 rpm.
10. Discard the reaction solution, and then rinse each well with 300 $\mu$ L of Washing Buffer(from step 【II-1】 ). Repeat this step for 3 times.
11. Add 100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 absorbance value (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. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, to obtain the concentration of PD-L2 in the sample.

---

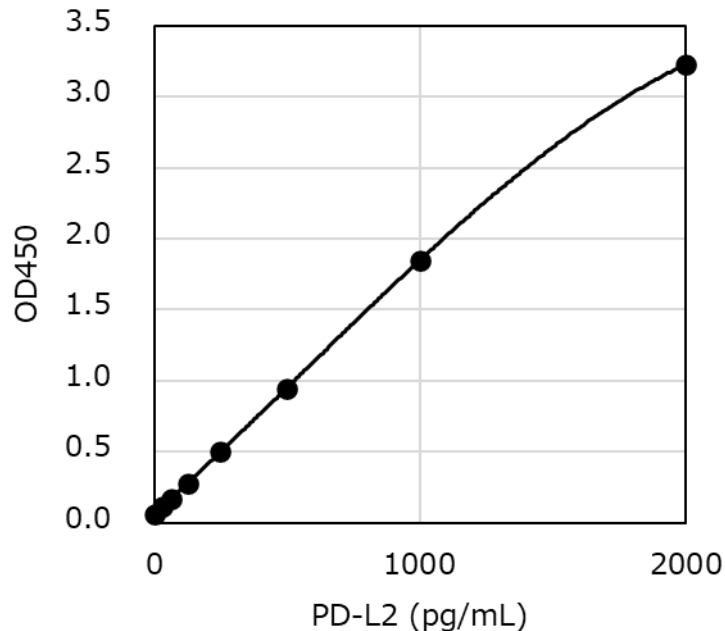
## 【IV】 Measurement example

---

### 【IV- 1】 Standard curve

As an example, the graph of absorbance (OD450) against standard PD-L2 concentration is drawn as shown in Figure 1.

However, draw a new standard curve for each assay to calculate the concentration in the sample.

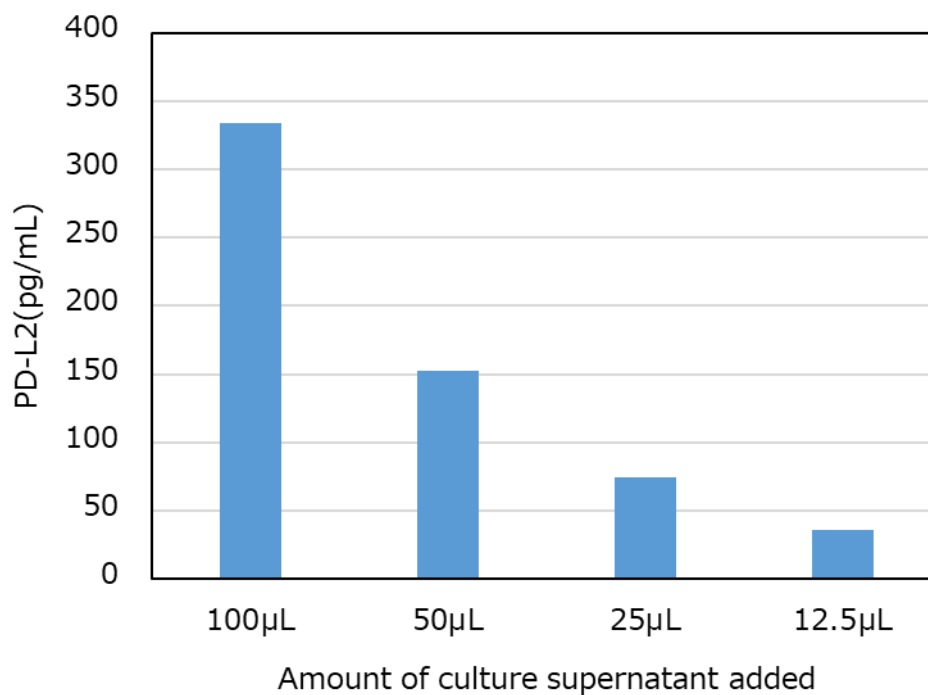


PD-L2 (pg/mL)	Absorbance (450nm)		Average
	1	2	
0	0.061	0.062	0.062
31.25	0.115	0.118	0.117
62.5	0.169	0.167	0.168
125	0.275	0.281	0.278
250	0.498	0.509	0.504
500	0.939	0.957	0.948
1000	1.850	1.851	1.851
2000	3.228	3.226	3.227

Fig.1 Standard curve

#### **[IV-2] Sample measurement example**

The results of adding 12.5, 25, 50, and 100 $\mu$ L of PD-L2 high-expression cell line (human renal cell carcinoma) culture supernatant to each well and measuring are shown in Figure 2.



---

**【V】 Kit expiry date and storage**

---

Expiry date : indicated on the kit box

Storage : Refrigeration (2-8°C)

---

**【Reference】**

---

- 1) Y. Wang, et al.: Br J Cancer., 128, 1196 (2022).