

PD-L1

Western Blot

<https://www.abcam.com/protocols/general-western-blot-protocol>

靶标概述

PD-L1 由于重度糖基化，在 WB 实验中实际检测到的条带大小在 40-60kD 之间，与预测的 20-33kD 有所区别。

以下有一些小贴士，有助于获得理想的 WB 实验结果：

样本制备	<ul style="list-style-type: none">● 添加足够量的蛋白酶抑制剂（或对于磷酸化修饰蛋白添加足量磷酸酶抑制剂）以避免靶标蛋白降解。● 整个样本制备过程中，保持样本置于冰上。● 通过 Bradford 分析、Lowry 分析或 BCA 分析测定样本总蛋白浓度。
电泳	<ul style="list-style-type: none">● 至少上样 20-50μg 总蛋白进行电泳。
转膜	<ul style="list-style-type: none">● 强烈建议转膜完成后使用丽春红染色，确定转膜是否成功。

以下有一些注意事项，有助于获得更好的 WB 实验结果：

- ✓ 如果有必要，使用 PNGase F 处理样本以确认条带特异性（PMID: 31327656）。
- ✓ 实际检测到的条带大小在 **40-60kD**。

Immunohistochemistry

<https://www.abcam.com/protocols/immunostaining-paraffin-frozen-free-floating-protocol>

靶标概述

PD-L1 在肺癌、卵巢癌、结肠癌和黑色素瘤中高表达。然而，并非所有样本都有阳性信号。PD-L1 的糖基化可能会干扰抗体与抗原结合。

以下有一些小贴士，有助于获得理想的 IHC 实验结果：

样本固定	● 样本固定时间取决于组织块大小与组织类型，但对于大多数样本，固定 18-24 小时较为合适。
	● 固定不充分会导致样本边缘信号较高而中心信号较弱，甚至无信号。
	● 过度固定则会封闭抗原表位，虽然抗原修复会暴露其中一部分表位，但如果组织固定时间非常长（如一周以上），则会发生抗原修复后依然无信号的现象。
抗体孵育	● 进行初次实验时，请根据产品说明书选择最优抗体工作浓度。

以下有一些注意事项，有助于获得更好的 IHC 实验结果：

- ✓ 使用糖苷酶处理样本可能提高信号强度. (PMID: 31327656)
- ✓ 下表列出了 PD-L1 在肺癌中的表达情况 (PD-L1 IHC 28-8 pharmDx, Dako). 对于其它癌症中 PD-L1 的表达情况，请见 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3991103/>

肿瘤	阳性样本数/总样本数	阳性率
肺腺癌	2/5	40%
肺鳞状细胞癌	1/3	33%
小细胞肺癌	1/2	50%

蛋白功能	<p>PD-L1 在诱导和维持自身免疫耐受中起关键作用 (PMID:11015443, 28813417, 28813410) 。作为抑制性受体 PDCD1 / PD-1 的配体, 调节 T 细胞的激活阈值并限制 T 细胞效应子的反应 (PMID:11015443, 28813417, 28813410) 。通过未知的激活受体, 可以共同刺激主要产生白介素 10 (IL10) 的 T 细胞亚群 (PMID:10581077) 。PDCD1 介导的抑制途径被肿瘤所利用, 以减弱抗肿瘤免疫力并逃避免疫系统的破坏, 从而促进肿瘤存活 (PMID:28813417, 28813410) 。</p> <p style="text-align: right;">SwissProt: Q9NZQ7</p>
组织表达	<p>PD-L1 在心脏, 骨骼肌, 胎盘和肺中高度表达。在胸腺, 脾脏, 肾脏和肝脏中弱表达。在活化的 T 细胞和 B 细胞, 树突状细胞, 角质形成细胞和单核细胞上表达 (PMID: 10581077, 11015443) 。</p> <p>通过 LPS 和 IFNG 激活后, 在 T 细胞和 B 细胞, 树突状细胞, 角质形成细胞和单核细胞中上调。在表面 Ig 交联激活的 B 细胞中上调 (PMID: 10581077, 11015443, 28813410) 。</p>
细胞定位	<p>PD-L1 定位于细胞膜 (PMID: 28813417, 28813410) , 早期的内体膜, 可回收的内体膜, 在回收的内体中与 CMTM6 结合, 可防止其靶向溶酶体降解 (PMID: 28813417) 。</p> <p>异构体 1: 细胞膜 (PMID: 15780196) 异构体 2: 内膜系统 (PMID: 15780196)</p>
异构体	<p>人: 异构体 I-3: 20-33kD (预测) 小鼠: 33kD (预测)</p> <p>由于 PD-L1 存在多种异构体, 在 WB 中检测的条带大小与预测值并不一致。</p>
修饰	<p>糖基化 (PMID: 19159218) 异源二聚体 (PMID: 18287011, 26602187) 泛素化, STUB1 可能介导 PD-L1 / CD274 的多聚泛素化, 触发其降解 (PMID: 28813410)</p> <p>由于 PD-L1 存在多种翻译后修饰, 在 WB 中检测的条带大小与预测值并不一致。</p>
阳性对照	<p>WB: B-CPAP, MD-MB-231, U87-MG IHC: 人扁桃体, 头颈部鳞状细胞癌, 胎盘组织</p>
阴性对照	<p>WB: A549 SW480 IHC: MCF-7 (PMID: 31327656)</p>