

# 中文说明书

## OX40 Bioassay, Propagation Model

适用产品目录号：  
J2172



# OX40 Bioassay, Propagation Model

所有技术文献的英文原版均可在 [www.promega.com/protocols](http://www.promega.com/protocols) 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。  
 电子邮箱：[chinatechserv@promega.com](mailto:chinatechserv@promega.com)

1. 描述.....	2
2. 产品组分和储存条件.....	8
3. 开始检测前.....	9
4. 准备 OX40 效应细胞.....	11
4.A. 细胞解冻和原始细胞培养.....	11
4.B. 细胞维持与增殖.....	11
4.C. 细胞冷冻和储存.....	12
5. FcγRIIb 依赖性抗体的检测操作流程.....	12
5.A. 制备检测缓冲液、Bio-Glo™ Reagent 和抗体样品.....	13
5.B. 检测板布局设计.....	15
5.C. 准备和铺板 FcγRIIb CHO-K1 细胞.....	15
5.D. 制备抗体系列稀释液.....	16
5.E. 准备 OX40 效应细胞.....	17
5.F. 抗体样品和 OX40 效应细胞加至检测板中.....	18
5.G. 加入 Bio-Glo™ Reagent.....	18
5.H. 数据分析.....	18
6. 非 FcγRIIb 依赖性抗体的检测操作流程.....	19
6.A. 制备检测缓冲液、Bio-Glo™ Reagent 和抗体样品.....	19
6.B. 检测板布局设计.....	21
6.C. 制备配体或抗体系列稀释液.....	21
6.D. 准备 OX40 效应细胞.....	23
6.E. 配体或抗体样品和 OX40 效应细胞加至检测板中.....	23
6.F. 加入 Bio-Glo™ Reagent.....	24
6.G. 数据分析.....	24
7. 疑难解答.....	25
8. 参考文献.....	26
9. 附录.....	27
9.A. FcγRIIb 依赖性抗体的代表性检测结果.....	27
9.B. OX40 配体的代表性检测结果.....	28
9.C. 缓冲液和溶液组成.....	28
9.D. 相关产品.....	29

## 1. 描述

人类免疫系统由抑制性和刺激性受体组成复杂网络系统调节，这些受体可促进病原体清除并同时维持对自体抗原的耐受性。刺激性免疫检查点受体可能对于癌症进展和自身免疫疾病具有重要作用。目前已确定多种共刺激免疫检查点受体，例如糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关蛋白 (GITR)、OX40、4-1BB、CD40 以及诱导型 T 细胞共刺激因子 (ICOS)。在下一代免疫治疗策略中，已开始采用配体或激动剂抗体激活前述受体，从而增强抗肿瘤免疫应答并促进免疫介导肿瘤排斥反应 (1-3)。

OX40 (CD134/TNFRSF4) 属于肿瘤坏死因子 (TNF) 受体超家族成员之一，其为共刺激受体，主要表达于活化 T 细胞上，也少量表达于中性粒细胞和自然杀伤 (NK) 细胞上 (4)。OX40 在细胞表面与 OX40 配体 (OX40L) 发生相互作用，并诱导后续细胞增殖、存活和细胞因子产生，尤其在 T 细胞中 (5, 6)。

目前，靶向 OX40 的大分子药物活性检测方法基于原代人类 T 细胞和功能性终点测量，如细胞增殖、细胞表面标志物表达以及干扰素  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 和白细胞介素 -2 (IL-2) 的产生。由于这些检测方法基于供体原代细胞、步骤复杂的操作、未经资格认定的检测试剂，因此繁琐且结果变异性大。因此，在质量受控药物开发条件下建立这些方法的难度较大。

OX40 Bioassay, Propagation Model<sup>(a-e)</sup> (目录号: J2172) 是一款基于生物发光细胞的检测试剂盒，不具有现有检测方法的缺点。本检测试剂盒可用于检测可结合和激活 OX40 的配体或激动剂抗体的效价和稳定性 (5, 7)。本检测试剂盒由表达人 OX40 的基因工程改造 Jurkat T 细胞系和由特定反应元件 (可对 OX40 配体 / 激动剂抗体刺激产生应答) 驱动的萤光素酶报告基因组成。OX40 效应细胞为细胞增殖型 (CPM)，包括可解冻、增殖并储存以供长期使用的冷冻细胞。

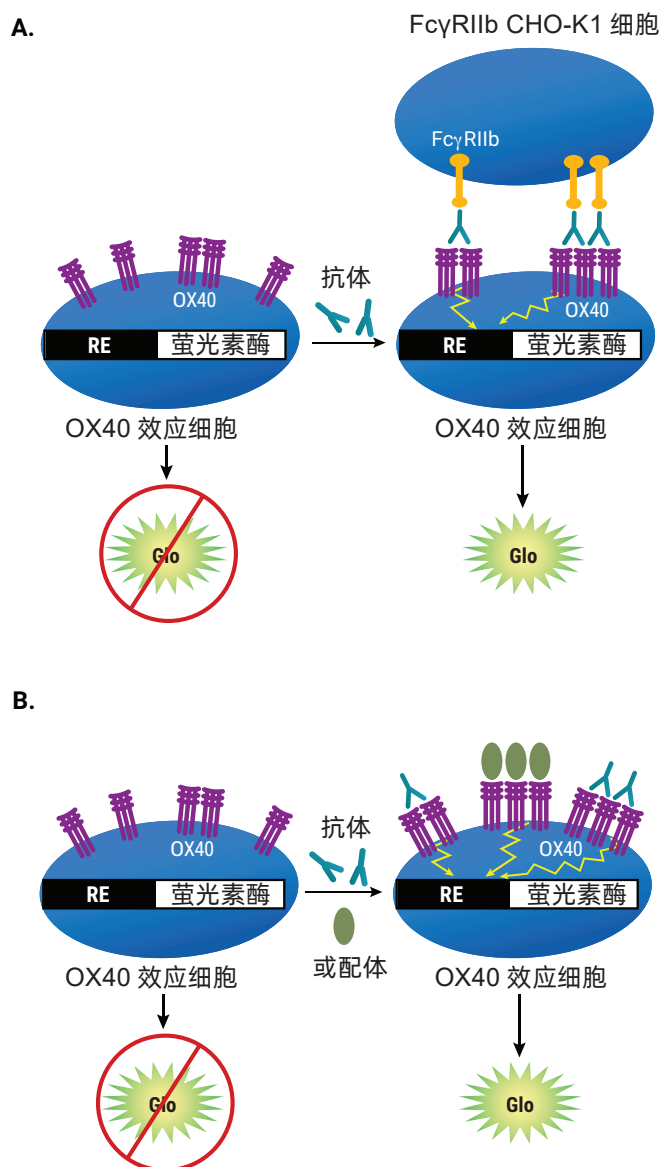
应使用 Fc $\gamma$ R11b CHO-K1 细胞 (目录号: J2232) 进行 OX40 Bioassay 实验，从而检测激动剂抗体是否可激活 OX40 且呈 Fc $\gamma$ R11b 依赖性。Fc $\gamma$ R11b CHO-K1 细胞可能用于交联激动剂抗体，但对于配体的测试则不是必需的。建议在筛选共刺激免疫检查点激动剂抗体时，可于有或无 Fc $\gamma$ R11b CHO-K1 细胞条件下进行检测，从而确定增强激动剂抗体对共刺激免疫检测点靶标的作用是否需要这些细胞。

OX40 效应细胞经 OX40 配体或激动剂抗体诱导后可导致产生反应元件介导的发光信号 (图 1)。可使用 Bio-Glo™ Luciferase Assay System 和标准发光检测仪 (如 GloMax® Discover System, 参见第 9.D 节, 相关产品) 对生物发光信号进行定量检测。

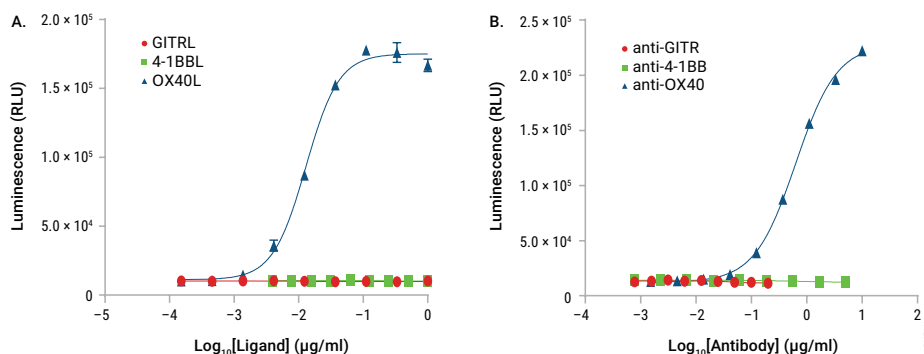
OX40 Bioassay, Propagation Model 可反映激活 OX40 的大分子药物作用机制 (MOA)。

具体而言, 加入 OX40 配体和 OX40 激动剂抗体后, 检测 OX40 介导的发光信号 (图 2)。已根据 ICH 指南预先对本生物活性检测方法进行确认, 并获得了效价和稳定性研究中常规使用所需精密度、准确度和线性数据 (表 1 和图 3)。可于 1 天或 2 天时间内进行检测, 具体取决于抗体性质。生物活性检测工作流程简单、耐用且可与早期药物发现抗体筛选用 96 孔和 384 孔板模式兼容 (图 4)。此外, 本生物活性检测方法可使用 100% 人血清 (抗体样品; 图 5), 表明有望将本方法进一步优化为中和抗体生物活性检测方法。

## 1. 描述(续)



**图 1.OX40 Bioassay 图示。**图 A. 用 Fc $\gamma$ RIIb 依赖性激动剂抗体进行检测。此生物活性检测操作流程涉及 2 种工程改造细胞系，分别为 OX40 效应细胞和 Fc $\gamma$ RIIb CHO-K1 细胞。存在 Fc $\gamma$ RIIb CHO-K1 细胞时，可交联抗 OX40 抗体，从而诱导 OX40 通路激活的发光信号。图 B. 用非 Fc $\gamma$ RIIb 依赖性激动剂抗体或配体进行检测。此生物活性检测方法涉及 1 种工程改造细胞系，即 OX40 效应细胞。不存在激动剂抗体或 OX40 配体时，OX40 受体未被激活，发光信号较低。加入激动剂抗体或 OX40 配体，诱导 OX40 通路激活的发光信号（呈剂量依赖性）。



**图 2.OX40 Bioassay 反映了激活 OX40 的大分子药物的作用机制 (MOA) 和特异性。**图 A. 如图所示, OX40 效应细胞经系列滴定浓度配体诱导: 被抗 HA Ab 交联的 GITRL; 被抗 His-Ab 交联的 4-1BBL; 或 OX40L。图 B. 如图所示, 存在 FcγRIIb CHO-K1 细胞 (目录号: JA2251、JA2255) 时, 用系列滴定浓度抗 GITR 抗体、抗 4-1BB 抗体或抗 OX40 抗体诱导 OX40 效应细胞。孵育 5 小时后, 加入 Bio-Glo™ Reagent 并用 GloMax® Discover System 定量检测发光信号。数据使用解冻即用细胞生成, 并用 GraphPad Prism® 软件进行四参数逻辑曲线拟合。

**表 1.OX40 Bioassay 的精密度、准确度和线性。**

参数	结果	
	预期相对效价 %	回收率 %
准确度	50	99.4
	70	100.8
	140	101.2
	200	109.9
重复性 (CV%)	100% (对照)	5.4
中间精密度 (CV%)		9.0
线性 (r <sup>2</sup> )		0.996
线性 (y = mx + b)		y = 1.123x - 8.895

2 名分析员于 3 天内 3 个独立实验中, 对理论效价为 50~200% 的系列 Control Ab, Anti-OX40 进行分析 (3 个复孔)。加入 Bio-Glo™ Reagent 并用 GloMax® Discover System 对发光信号进行定量检测。使用 JMP® 软件分析数据, 并于平行检测后计算相对效价。数据使用解冻即用细胞生成。

1. 描述(续)

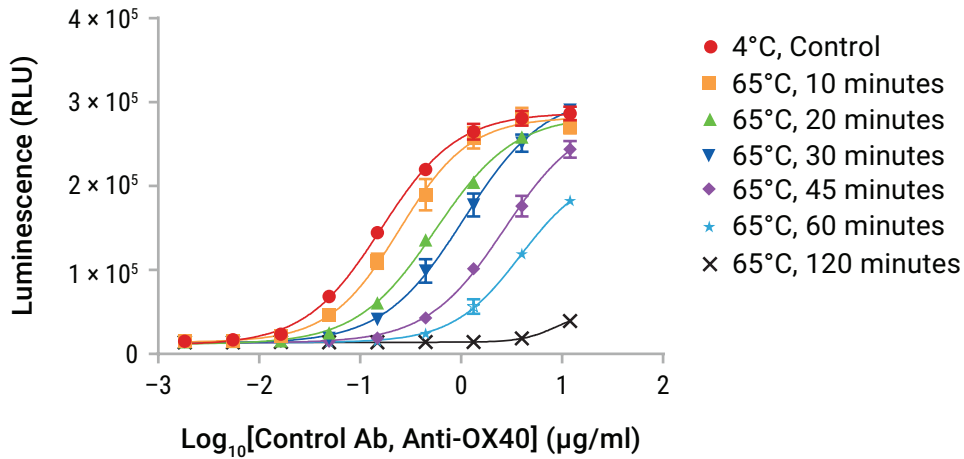
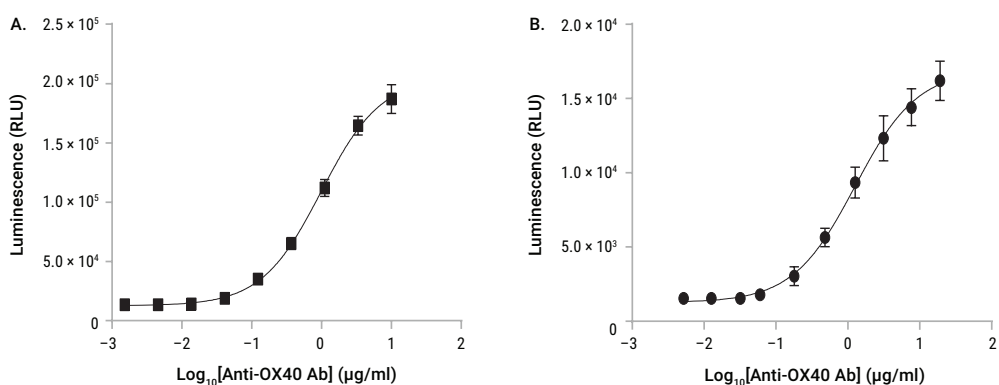


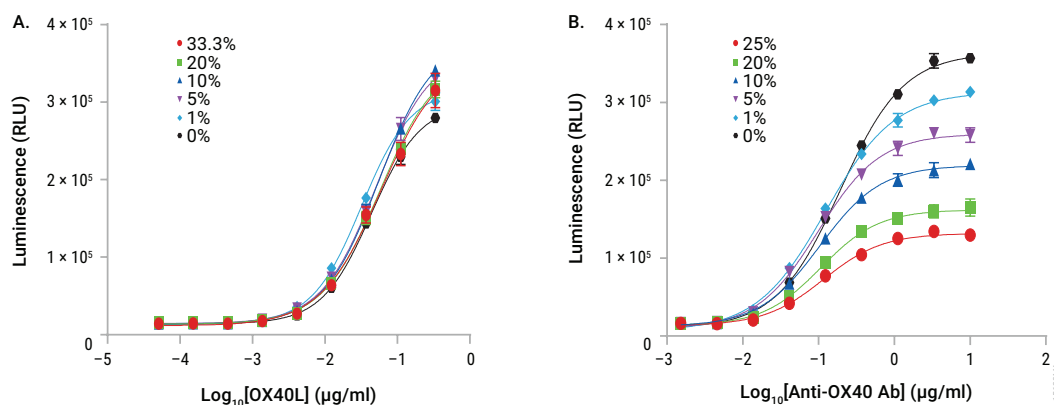
图 3. OX40 Bioassay 具有稳定性指示性。Control Ab, Anti-OX40 (目录号: K1191) 置 4°C (对照) 或 65°C 热处理特定时间, 然后用 FcγRIIb CHO-K1 细胞 (目录号: JA2251、JA2255) 和 OX40 Bioassay 进行分析。孵育 5 小时后, 加入 Bio-Glo™ Reagent 并用 GloMax® Discover System 定量检测发光信号。数据使用解冻即用细胞生成, 并用 GraphPad Prism® 软件进行四参数逻辑曲线拟合。



**图 4.OX40 Bioassay 适用于 384 孔模式且可与实验室自动化技术兼容。**图 A. 如说明书所述，在 96 孔板中用抗 OX40 抗体进行 OX40 Bioassay 实验。图 B. 使用 Mantis<sup>®</sup> 液体处理机分装细胞和 Echo<sup>®</sup> 声学液体处理机操作抗体并在 384 孔中进行 OX40 Bioassay 实验。检测前一天，按  $8 \times 10^3$  个细胞 /10 $\mu$ l/ 孔铺板密度铺板 Fc $\gamma$ RIIb CHO-K1 细胞（目录号：JA2251, JA2255），并置 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 5 小时。然后按  $1.0 \times 10^4$  个细胞 /10 $\mu$ l/ 孔铺板密度将 OX40 效应细胞加至孔板中，并与 Fc $\gamma$ RIIb CHO-K1 细胞同置 37 $^{\circ}$ C 条件下共孵育过夜。检测当天，系列稀释抗 OX40 抗体，并按每孔 0.2 $\mu$ l 加至孔板中。孵育 5 小时后，加入 20 $\mu$ l Bio-Glo<sup>™</sup> 试剂并用 GloMax<sup>®</sup> Discover System 定量检测发光信号。使用 GraphPad Prism<sup>®</sup> 软件对数据进行四参数逻辑曲线拟合。96 孔和 384 孔模式的 EC<sub>50</sub> 值分别为 0.99 $\mu$ g/ml 和 1.26 $\mu$ g/ml，诱导倍数分别为 15 和 11。数据使用解冻即用细胞生成。



## 1. 描述(续)



**图 5.OX40 Bioassay 可耐受人血清。**图 A.OX40 配体 (OX40L, Biologend 目录号: 555704) 在存在浓度增加的混合正常人血清 (配体样品中浓度为 0~100%) 的情况下进行分析, 达到人血清最终检测浓度 (0~33.3%)。图 B. 于存在 FcγRIIb CHO-K1 细胞 (目录号: JA2251、JA2255) 和递增浓度正常人血清 (抗体样品中浓度为 0~100%, 人血清最终检测浓度为 0~25%) 条件下, 分析了 Control Ab, Anti-OX40 (目录号: K1191)。37°C 条件下诱导 5 小时后, 加入 Bio-Glo™ 试剂并用 GloMax® Discover System 定量检测发光信号。使用 GraphPad Prism® 软件对数据进行四参数逻辑曲线拟合。数据使用解冻即用细胞生成。OX40 Bioassay 可耐受混合人血清。不同批次混合人血清对检测方法具有类似影响 (数据未列出)。

## 2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
OX40 Bioassay, Propagation Model	1 份	J2172

不得用于医学诊断。

包括:

- 2 管 OX40 效应细胞 (CPM),  $2.0 \times 10^7$  个细胞 /ml (1.0ml/ 管)

**注意:** 在开展正式的检测前, 请解冻并扩增其中一瓶细胞以建立冷冻细胞库。另一瓶应留作将来使用。

**储存条件:** 送达后, 即刻将细胞冻存管转移至低于  $-140^{\circ}\text{C}$  (冷冻冰箱或气相液氮) 条件下进行长期储存。不得将细胞冻存管浸没于液氮中储存。不得将细胞冻存管置于  $-80^{\circ}\text{C}$  条件下保存, 否则会降低细胞活力和细胞性能。

### 3. 开始检测前

**使用前，先仔细阅读完整检测方法以便熟悉产品组分和检测流程。**

从装有细胞冻存管的盒子上取下产品标签，或记录标签上目录号和批号。此信息可用于从网站下载指定产品相关文件，例如分析证书。

OX40 Bioassay, Propagation Model 适用于与用户提供的可激活 OX40 的抗体或配体结合使用。Control Ab, Anti-OX40 (目录号: K1191) 和 FcγRIIb CHO-K1 细胞 (目录号: JA2251、JA2255) 以及细胞增殖型 FcγRIIb CHO-K1 细胞 (目录号: J2232) 可单独购买，用于检测方法优化和常规质量控制。我们强烈建议在前几次检测时将 OX40 配体或 Control Ab, Anti-OX40 和 FcγRIIb CHO-K1 细胞作为阳性对照，从而增加对检测方法的熟悉程度。使用这些试剂所得数据参见图 2-5 和第 9.A 和 9.B 节代表性检测结果。

细胞解冻、增殖和储存需严格按照第 4 节中所述说明进行。细胞接种和传代密度已经过优化，以确保稳定的细胞生长，这反映在稳定的细胞倍增率上，以实现最佳、一致的性能。常规细胞培养和最佳生物检测性能需要准确、可靠和可重现的细胞计数方法。分别使用 OX40 配体和 Control Ab, Anti-OX40 确定了第 5 节和第 6 节所述推荐细胞铺板密度、诱导时间和检测缓冲液组分。您可能需要针对您自有抗体或大分子药物，调整本文所述参数并优化检测条件。

OX40 Bioassay, Propagation Model 可产生生物发光信号，应与可检测发光信号的主要光度计或微孔板读数仪结合使用。本说明书所述生物活性检测方法和性能数据通过 GloMax<sup>®</sup> Discover System 所得 (参见第 9.D 节，相关产品)。每孔读数的整合时间为 0.5 秒。

## 用户需提供的材料

(缓冲液和溶液组成信息参见第 9.C. 节)

### 试剂

- 用户自定义的抗 OX40 抗体或其他大分子药物样品
- RPMI 1640 培养基 (含 L- 谷氨酰胺和 HEPES) (例如, Corning<sup>®</sup>, 目录号: 10-041-CV 或 GIBCO<sup>™</sup>, 目录号: 22400105)
- Ham's F-12 培养基 (含 L- 谷氨酰胺) (例如, GIBCO<sup>™</sup>, 目录号: 11765062)
- 胎牛血清 (例如, HyClone, 目录号: SH30070.03 或 GIBCO<sup>™</sup>, 目录号: 16000044)
- 潮霉素 B (例如, GIBCO<sup>™</sup>, 目录号: 10687010)
- G418 硫酸盐溶液 (例如, GIBCO<sup>™</sup>, 目录号: 10131035)
- 丙酮酸钠 (例如, GIBCO<sup>™</sup>, 目录号: 11360070)
- MEM 非必需氨基酸, 100X (例如, GIBCO<sup>™</sup>, 目录号: 11140050)
- DMSO (例如, Sigma, 目录号: D2650)
- DPBS (例如, GIBCO<sup>™</sup>, 目录号: 14190)
- Accutase<sup>®</sup> 溶液 (例如, Sigma, 目录号: A6964)
- 台盼蓝溶液 (例如, Sigma, 目录号: T8154)
- Bio-Glo<sup>™</sup> Luciferase Assay System (目录号: G7940、G7941)
- 可选: FcγRIIb CHO-K1 细胞 (若首次使用本检测试剂盒和 / 或检测可能依赖于 FcγRIIb 交联的抗体, 则需使用此细胞系: 目录号: JA2251、JA2255)
- 可选: 对照 OX40 配体 (Biolegend, 目录号: 555704)
- 可选: Control Ab, Anti-OX40 (目录号: K1191)

### 实验用品和仪器

- 用于铺板和读取发光信号的白色平底 96 孔检测板 (例如, Corning<sup>®</sup>, 目录号: 3917)
- 用于制备抗体稀释液的带盖、无菌、透明、V 型底 96 孔板 (例如, Costar<sup>®</sup>, 目录号: 3896 或 Linbro, 目录号: 76-223-05)
- 移液器 (单道和 12 通道; 为获得最佳结果, 根据实际需要手动和电动移液器)
- 15ml 和 50ml 无菌锥形管
- 无菌试剂加样槽 (如 Costar<sup>®</sup>/Corning<sup>®</sup>, 目录号: 4870)
- 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱
- 37°C 水浴
- 可读取发光信号的孔板读数仪或发光检测仪 (例如, GloMax<sup>®</sup> Discover System 或类似系统)

## 4. 准备 OX40 效应细胞

### 4.A. 细胞解冻和原始细胞培养

**!** 遵循您所在机构关于处理生物危害材料的指导方针，包括使用个人防护设备（PPE）和废物处置。

1. 取 5ml FBS、0.5ml 100X MEM 非必需氨基酸（NEAA）和 0.5ml 100mM 丙酮酸钠，加至 44ml RPMI 1640 培养基（已预热至 37°C）中，从而制备 50ml 原始细胞培养基。这种原始细胞培养基将用于解冻后立即培养细胞。
2. 取 9ml 已预热原始细胞培养基转移至 50ml 锥形管中。
3. 从 -140°C 处取出 1 管 OX40 效应细胞，然后置 37°C 水浴中并轻轻摇动（不得倒置）使解冻，直至刚好解冻（一般为 2~3 分钟）。
4. 取所有细胞（约 1ml）转移至已加入 9ml 预热原始细胞培养基的 50ml 锥形管中。
5. 于 90×g 条件下离心 10 分钟。
6. 小心吸去培养基，并将细胞沉淀重悬于 25ml 预热原始细胞培养基。
7. 将细胞悬液转移至 T75 组织培养瓶，并将培养瓶水平置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。
8. 细胞传代前，先培养细胞约 48 小时。

### 4.B. 细胞维持与增殖

**说明：**对于从第二次细胞传代开始的细胞维持和增殖，使用含抗生素的细胞生长培养基，并于增殖期间监测细胞存活率和倍增率。细胞生长速率将于解冻后 7~10 天达至稳态，稳态细胞存活率一般 > 90%，平均细胞倍增率约为 30 小时。每次细胞传代应记录传代数。根据我们既往经验，若按周一 / 周三 / 周五这一时间表进行传代，细胞可以保持其功能长达 25 次传代。

1. 细胞传代当天通过台盼蓝染色法检测细胞存活率和密度。
2. 若以每两天（如周一 / 周三或周三 / 周五）传代一次，则细胞接种密度为  $4 \times 10^5$  个细胞 / ml，若每三天（如周五 / 周一）传代一次，则细胞接种密度为  $2 \times 10^5$  个细胞 / ml。始终保持培养瓶在培养箱中处于水平位置。
3. 通过将新鲜细胞生长培养基添加到原始培养瓶中细胞悬液或将细胞转移到新培养瓶中，同时保持培养体积与培养瓶表面积的比率一致（如每个 T75 培养瓶 25ml 体积或每个 T150 培养瓶 50ml 体积），以此来维持细胞培养。
4. 将培养瓶置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。

#### 4.C. 细胞冷冻和储存

1. 细胞冻存当天，制备新鲜的细胞冻存培养基，置于冰上保存。
2. 用移液器轻轻吹打细胞，形成均匀细胞悬液。
3. 取出样品并通过台盼蓝染色法进行细胞计数。根据所需细胞冻存密度  $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^7$  个细胞 /ml，计算所需细胞冻存培养基体积。
4. 取细胞悬液转移至 50ml 无菌锥形管或更大规格离心管中，并于  $130 \times g$ ， $4^\circ C$  条件下离心 10~15 分钟。
5. 小心吸去上清液，避免扰动细胞沉淀。
6. 缓缓将细胞沉淀重悬于冰冷细胞冻存培养基中，最终细胞密度为  $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^7$  个细胞 /ml。取细胞悬液合并至同一管并分装到冻存管中。
7. 使用可控速率冷冻冰箱（首选）或  $-80^\circ C$  冷冻冰箱 Mr. Frosty<sup>®</sup> 或 Styrofoam<sup>®</sup> 架中过夜冷冻细胞。取冻存管转移至  $-140^\circ C$  或更低温度进行长期储存。

#### 5. FcγRIIb 依赖性抗体的检测操作流程

此检测操作流程涉及 2 种工程改造细胞系，分别为 OX40 效应细胞和 FcγRIIb CHO-K1 细胞。FcγRIIb CHO-K1 细胞有两种模式，即解冻即用模式（OX40 Bioassay 说明书 #TM581）和 CPM 形式（参见 FcγRIIb CHO-K1 Propagation Model 说明书 #TM569）。两种模式的细胞均可用于检测。

下述流程介绍了使用 OX40 Bioassay 并采用 FcγRIIb CHO-K1 CPM 模式细胞于单次检测中检测 2 份 FcγRIIb 依赖性抗体样品以及 1 份对照样品。每一测试抗体和对照抗体均进行 10 个浓度点的系列稀释，每个浓度点设置 3 个复孔，于单个 96 孔板中内侧 60 个孔进行分析。若采用其他实验板布局，则可能需进一步优化。

**说明：**制备测试抗体和对照抗体时，应选择适宜起始浓度和稀释方案，从而获取完整剂量 - 响应曲线（具有适宜上下渐近线且曲线上点足够）。例如，检测 Control Ab, Anti-OX40 时，我们以  $10 \mu g/ml$  为起始浓度（1X）并进行 3 倍系列稀释。

### 5.A. 制备检测缓冲液、Bio-Glo™ Reagent 和抗体样品

1. **FcγRIIb CHO-K1 细胞铺板培养基:** 检测前一天, 于 50ml 锥形管中制备 40ml 细胞铺板培养基 (90%Ham's F-12/10%FBS)。将 FBS 在 4°C 条件下过夜解冻或在当天使用前放入 37°C 水浴中解冻。取 4ml FBS, 加至 36ml Ham's F-12 培养基中。混匀并加热至 37°C 备用。

2. **检测缓冲液:** 检测当天, 制备适量检测缓冲液 (95%RPMI 1640/5%FBS)。将 FBS 在 4°C 条件下过夜解冻或在当天使用前放入 37°C 水浴中解冻。混匀并加热至 37°C 备用。例如, 30ml 检测缓冲液一般可满足 96 孔板检测模式 (使用内侧 60 个孔) 120 个孔所需用量。

**说明:** 推荐的检测缓冲液含 5%FBS。此 FBS 浓度适用于我们已检测的 Control Ab, Anti-OX40。若检测目标抗体时, 使用 5%FBS 检测缓冲液的检测性能不佳, 可尝试在 0.5~10% 范围内对检测缓冲液中 FBS 浓度进行优化。

3. **Bio-Glo™ Reagent:** 例如, 10ml Bio-Glo™ Reagent 可满足 96 孔板检测模式 120 个孔所需用量。将 Bio-Glo™ Luciferase Assay Buffer 置 4°C 条件下过夜解冻或于检测当天置室温水浴中解冻。取 Bio-Glo™ Luciferase Assay Buffer 平衡至环境温度, 并避光保存。

取 Bio-Glo™ Luciferase Assay Buffer 转移至装有 Bio-Glo™ Luciferase Assay Substrate 的棕色瓶中, 上下颠倒混匀直至底物完全溶解。在添加到检测板之前, 复溶后的 Bio-Glo™ Reagent 置环境温度 (22~25°C) 避光条件下平衡。

若您使用的是大规格 (100ml) Bio-Glo™ Luciferase Assay System, 您可将复溶后 Bio-Glo™ Reagent 分装为 10ml 等分样品, 并置 -20°C 条件下最长储存 6 周。避免反复冻融。检测当天, 于使用前置室温水浴解冻适量复溶后 Bio-Glo™ Reagent 至少 1~2 小时。复溶后 Bio-Glo™ Reagent 可置室温条件下储存, 储存 24 小时后发光信号损失约 18%。

4. **测试样品和对照样品:** 以检测缓冲液作为稀释剂, 在 1.5ml 试管中制备两份测试抗体 (各 180μl) 和一份对照抗体 (400μl) 的初始稀释液 (稀释液 1, 3X 最终浓度)。制备抗体系列稀释液前, 妥善储存含抗体初始稀释液的试管。

#### 说明:

若您使用 Control Ab, Anti-OX40 (目录号: K1191) 作为对照抗体, 则取 12μl 抗 -OX40 抗体储备液 (1000μg/ml), 加至 388μl 检测缓冲液中, 制备出含有 30μg/ml Anti-OX40 抗体的 400μl 起始稀释液 (稀释液 1, 3X 最终浓度)。抗体初始稀释液置冰上储存, 以供后续检测用。

为简化检测流程, 于收集和铺板 OX40 效应细胞前, 制备抗体系列稀释液。

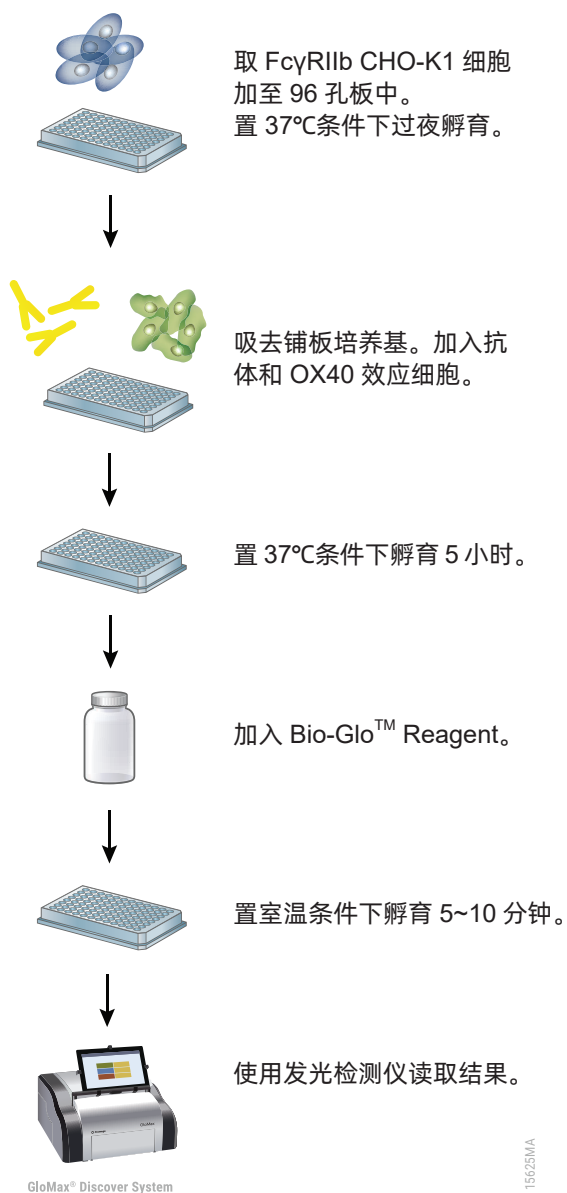


图 6. 使用 Fc $\gamma$ RIIb 依赖性抗体进行 OX40 Bioassay, Propagation Model 实验的操作流程示意图。

## 5.B. 检测板布局设计

对于此处所述操作流程，请参见图 7 所示检测板布局作为参考。此操作流程描述了测试抗体和对照抗体的系列稀释液（ $n = 3$ ），每孔板建立 2 条 10 点剂量 - 反应曲线。

检测板布局设计推荐													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	检测缓冲液 (B)
B	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	对照抗体
C	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	测试抗体
D	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	对照抗体
E	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	测试抗体
F	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	对照抗体
G	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	测试抗体
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	检测缓冲液 (B)

图 7. 测试抗体和对照抗体系列稀释液的非聚集样品位置以及仅含检测缓冲液的检测孔（用“B”表示）的检测板布局示例。

## 5.C. 准备和铺板 FcγRIIb CHO-K1 细胞

根据 *FcγRIIb CHO-K1 Cells Propagation Model* 说明书 #TM569 所述推荐细胞接种密度，维持 FcγRIIb CHO-K1 细胞（目录号：J2232）生长。细胞培养体积或接种密度变化会影响细胞生长速率和检测性能。请勿让细胞生长至 100% 汇合。增殖期间，细胞倍增率稳定后方可将细胞用于检测。

**说明：**在细胞培养超净台中执行下述步骤。

1. 我们建议根据 *FcγRIIb CHO-K1 Cells Propagation Model* 说明书 #TM569 所述内容，于铺板前两天，对 FcγRIIb CHO-K1 细胞进行传代，从而确保检测性能最佳且一致。
2. 检测前一天，针对 FcγRIIb CHO-K1 细胞，制备新 FcγRIIb CHO-K1 细胞铺板培养基（Ham's F-12/10%FBS）。
3. 抽提弃去 FcγRIIb CHO-K1 细胞的细胞培养基并用 DPBS 洗涤。



### 5.C. 准备和铺板 FcγRIIb CHO-K1 细胞 (续)

4. 向每个 T75 培养瓶中加入 2ml Accutase<sup>®</sup> 溶液, 然后将培养瓶置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 5~7 分钟或直到细胞变圆并从瓶底脱落。
5. 向培养瓶中加入 8ml FcγRIIb CHO-K1 细胞铺板培养基。将细胞悬液转移到 50ml (或更大) 的锥形离心管中。
6. 轻轻混匀并采用台盼蓝染色法对 FcγRIIb CHO-K1 细胞进行计数。
7. 于 230×g 条件下离心 5 分钟。
8. 缓缓将细胞沉淀重悬于细胞铺板培养基中, 浓度为 4×10<sup>5</sup> 个活细胞 /ml。
9. 取细胞悬液转移至无菌试剂加样槽中。使用多通道移液器, 立即将 100μl 细胞悬液分装至 96 孔白色平底检测孔板内侧 60 个孔中。每孔最终细胞数量应为 4×10<sup>4</sup> 个 / 孔。
10. 取 100μl 细胞铺板培养基, 加至检测板外侧孔中。
11. 盖好检测板盖, 置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜孵育 (18~22 小时)。

### 5.D. 制备抗体系列稀释液

此处操作说明适用于制备单一抗体的三倍系列稀释储备液, 以三个复孔进行分析 (各 120μl 抗体稀释液足够用于三个复孔)。或者, 您也可以制备三份独立的连续稀释储备液, 以生成三份样本。为了制备三倍连续稀释液, 您需要 400μl 对照抗体, 浓度为剂量 - 响应曲线中最高抗体浓度的 3 倍。对于测试抗体剂量反应曲线, 您需要每种测试抗体 180μl, 其浓度也为最高抗体浓度的三倍。对于其他稀释方案, 请相应地调整体积。

**说明:** 若您于检测时使用 Control Ab, Anti-OX40 作为对照, 则按下述说明制备三倍系列稀释液。测试抗体的三倍系列稀释流程示例如下。

1. 于检测当天, 如第 5.A 节所述, 制备适量检测缓冲液。
2. 取 180μl 对照抗体初始稀释液 (稀释液 1, 3X 最终浓度), 加至无菌透明 V 型底 96 孔板的 A11 和 B11 孔中 (参见图 8)。
3. 取 180μl 测试抗体 1 和 2 初始稀释液 (稀释液 1, 3X 最终浓度), 分别加至 E11 和 G11 孔中 (参见图 8)。
4. 取 120μl 检测缓冲液, 加至这 4 行的其他孔 (第 2 列至第 10 列) 中。
5. 从第 11 列取 60μl 抗体初始稀释液, 加至第 10 列。吹打使混匀。避免产生气泡。
6. 从右向左至第 3 列, 进行三倍系列稀释。请勿在第 2 列进行稀释。
7. 准备 OX40 效应细胞时, 盖好检测板盖并置环境温度 (22~25°C) 条件下。

**说明:** A2、B2、E2 和 G2 孔中含 120μl 无抗体检测缓冲液 (用作阴性对照)。

通过单一抗体储备液制备抗体稀释液的推荐检测板布局。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1		对照抗体
B		无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1		对照抗体
C													
D													
E		无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1		测试抗体 1
F													
G		无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1		测试抗体 2
H													

图 8. 抗体系列稀释液检测板布局示例。

### 5.E. 准备 OX40 效应细胞

根据推荐的细胞接种密度，维持 OX40 效应细胞培养。细胞培养体积或接种密度变化会影响细胞生长速率和检测性能。增殖期间，细胞倍增率稳定后方可将细胞用于检测。

1. 如第 4.B 节所述，于检测前两天或三天进行细胞传代。为确保检测性能最佳且一致，收集时细胞密度需落在  $0.8\sim 1.5\times 10^6$  个细胞 /ml 范围内且细胞存活率大于 90%。
2. 通过台盼蓝染色法进行 OX40 效应细胞计数，并计算细胞密度和细胞存活率。
3. 从培养瓶中移取适量 OX40 效应细胞置 50ml 锥形管或更大规格离心管中。
4. 于  $130\times g$ ，环境温度条件下离心 10 分钟从而收集细胞，并将细胞沉淀重悬于检测缓冲液中，从而确保达到目标细胞密度  $1.0\times 10^6$  个细胞 /ml。
5. 您需至少 8ml 的 OX40 效应细胞，从而满足 120 个检测孔，即两个检测板内侧 60 个孔分析用量。

### 5.F. 抗体样品和 OX40 效应细胞加至检测板中

1. 从培养箱中取出加入 FcγRIIb CHO-K1 细胞的 96 孔检测板。使用手动多通道移液器，从每孔中取出 95μl 培养基。或者，将检测板倒置于水槽上方，从而除去培养基。然后将倒置孔板置纸巾放置上 5~10 秒，从而排出剩余培养基。
2. 根据图 7 检测板布局，使用电动多通道移液器，取 25μl 适宜抗体稀释液，加至检测板中。
3. 取 75μl 检测缓冲液，加至 96 孔检测板外侧孔中。
4. 取第 5.E 节准备的 OX40 效应细胞，置于无菌试剂加样槽中。使用多通道移液器，分装 50μl ( $0.5 \times 10^5$  个细胞) OX40 效应细胞至含抗体的孔中。
5. 盖好检测板盖，并置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 5 小时。

### 5.G. 加入 Bio-Glo™ Reagent

**说明：** Bio-Glo™ Reagent 加入检测孔板时应确保其已处于环境温度 (22~25°C) 。

1. 从培养箱中取出检测板并于环境温度下平衡 10~15 分钟。
2. 使用手动多通道移液器，取 75μl Bio-Glo™ Reagent 加至检测板内侧 60 孔中，注意不得产生气泡。
3. 取 75μl Bio-Glo™ Reagent 加至每一检测板的 B1、C1 和 D1 孔中，检测本底信号。
4. 置环境温度条件下孵育 5~15 分钟。

**说明：** 改变孵育时间会影响原始相对发光单位 (RLU) 值，但不应导致 EC<sub>50</sub> 值和诱导倍数发生显著变化。

5. 使用光度计或可读取发光信号的微孔板读数仪检测发光信号。

### 5.H. 数据分析

1. 通过计算 B1、C1 和 D1 孔的平均 RLU，确定孔板本底信号。
2. 诱导倍数计算 = 
$$\frac{\text{RLU (诱导 - 本底)}}{\text{RLU (无抗体对照 - 本底)}}$$
3. 绘制 RLU vs. Log<sub>10</sub>[抗体] 和诱导倍数 vs. Log<sub>10</sub>[抗体] 关系图。使用适宜曲线拟合软件 (例如 GraphPad Prism® 软件) 拟合曲线并检测抗体应答 EC<sub>50</sub> 值。

## 6. 非 FcγRIIb 依赖性抗体的检测操作流程

本检测操作流程介绍了单个检测批中使用 OX40 Bioassay, Propagation Model 对 2 份抗体样品和 1 份对照样品进行分析。每一测试抗体和对照抗体均有 10 点系列稀释液，每点设置 3 个复孔，并于单个 96 孔板中内侧 60 个孔进行分析。若采用其他实验和检测板布局，可能需要进一步优化。

**说明：**制备测试抗体和对照抗体时，应选择适宜起始浓度和稀释方案，从而获取完整剂量 - 响应曲线（具有适宜上下渐近线且曲线上点足够）。例如，检测 OX40 配体时，我们以 0.333μg/ml 为起始浓度（1X）并进行 3 倍系列稀释（参见第 3 节）。

### 6.A. 制备检测缓冲液、Bio-Glo™ Reagent 和抗体样品

1. **检测缓冲液：**检测当天，制备适量检测缓冲液（95%RPMI 1640/5%FBS）。将 FBS 在 4°C 下过夜解冻或在使用当天在 37°C 水浴中解冻。混匀并加热至 37°C 备用。例如，30ml 检测缓冲液一般可满足 96 孔板检测模式（使用内侧 60 个孔）120 个孔所需用量。

**说明：**推荐的检测缓冲液含 5%FBS。此 FBS 浓度适用于我们已检测的交联对照抗原 OX40L。

2. **Bio-Glo™ Reagent：**例如，10ml Bio-Glo™ Reagent 可满足 96 孔板检测模式 120 个孔所需用量。将 Bio-Glo™ Luciferase Assay Buffer 置 4°C 条件下过夜解冻或于检测当天置室温水浴中解冻。取 Bio-Glo™ Luciferase Assay Buffer 平衡至环境温度，并避光保存。

取 Bio-Glo™ Luciferase Assay Buffer 转移至装有 Bio-Glo™ Luciferase Assay Substrate 的棕色瓶中，上下颠倒混匀直至底物完全溶解。在添加到检测板之前，将复溶后 Bio-Glo™ Reagent 在环境温度（22–25°C）下平衡并避光保存。

若您使用的是大规格（100ml）Bio-Glo™ Luciferase Assay System，您可将复溶后 Bio-Glo™ Reagent 分装为 10ml 等分样品，并置 -20°C 条件下最长储存 6 周。避免反复冻融。检测当天，于使用前置室温水浴解冻适量复溶后 Bio-Glo™ Reagent 至少 1~2 小时。复溶后 Bio-Glo™ Reagent 可置室温条件下储存，储存 24 小时后发光信号损失约 18%。

3. **测试样品和对照样品：**以检测缓冲液作为稀释剂，在 1.5ml 试管中制备两份测试抗体（各 180μl）和一份对照交联配体（400μl）的初始稀释液（稀释液 1，3X 最终浓度）。制备抗体系列稀释液前，妥善储存含配体或抗体初始稀释液的试管。

#### **说明：**

若您使用 OX40L（对照 OX40 配体 /TNFSF4）（Biolegend，目录号：555704）作为对照配体，则取 2μl OX40L 储备液（200μg/ml），加至 398μl 检测缓冲液中，从而制备 400μl 的浓度为 1μg/ml 的 OX40L 初始稀释液。OX40L 的最终（1X）起始浓度为 0.333μg/ml。配体初始稀释液置冰上储存，以供后续检测用。

为简化检测流程，于收集和铺板细胞前，制备抗体或配体系列稀释液。

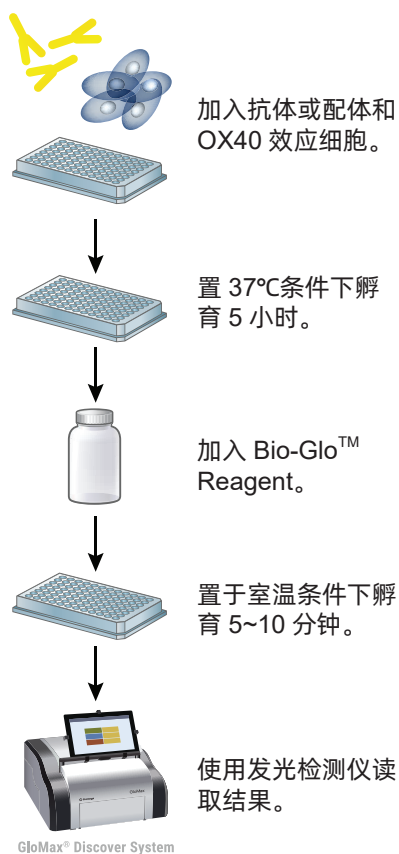


图 9. 使用 OX40 配体或非 FcγRIIb 依赖性抗体进行 OX40 Bioassay, Propagation Model 实验的操作流程示意图。

## 6.B. 检测板布局设计

对于此处所述操作流程，请参见图 10 所示检测板布局作为参考。此操作流程描述了测试抗体和对照配体的系列稀释液（ $n = 3$ ），每孔板建立 2 条 10 点剂量 - 反应曲线。

检测板布局设计推荐													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	检测缓冲液 (B)
B	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	对照配体
C	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	测试抗体
D	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	对照配体
E	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	测试抗体
F	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	对照配体
G	B	无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1	B	测试抗体
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	检测缓冲液 (B)

图 10. 测试抗体和对照配体系列稀释液的非聚集样品位置以及仅含检测缓冲液的检测孔（用“B”表示）的检测板布局示例。

## 6.C. 制备配体或抗体系列稀释液

此处操作说明适用于制备配体的三倍系列稀释储备液，以三个复孔进行分析（各 120 $\mu$ l 配体稀释液足够用于三个复孔）。另外，也可以制备三份独立的连续稀释储备液以生成三份样本。若要制备配体的三倍系列稀释液，需 400 $\mu$ l 对照配体，浓度为剂量 - 响应曲线中最高浓度的 3 倍。若要制备测试抗体的三倍系列稀释液，每一测试抗体需 180 $\mu$ l，浓度为每一测试抗体剂量 - 响应曲线中最高抗体浓度的 3 倍。若选择其它稀释方案，可相应调整用量。

**说明：**若您于检测时使用 OX40L（参见第 3 节），则按下述说明制备三倍系列稀释液。测试抗体的三倍系列稀释流程示例见下文。

### 6.C. 制备配体或抗体系列稀释液（续）

1. 于检测当天，如第 6.A 节所述，制备适量检测缓冲液。
2. 取 180 $\mu$ l 对照配体初始稀释液（稀释液 1，3X 最终浓度），加至无菌透明 V 型底 96 孔板的 A11 和 B11 孔中（参见图 11）。
3. 取 180 $\mu$ l 测试抗体 1 和 2 初始稀释液（稀释液 1，3X 最终浓度），分别加至 E11 和 G11 孔中（参见图 11）。
4. 取 120 $\mu$ l 检测缓冲液，加至这 4 行的其他孔（第 2 列至第 10 列）中。
5. 从第 11 列抗体初始稀释液中取 60 $\mu$ l 加至第 10 列。吹打使混匀。避免产生气泡。
6. 从右向左至第 3 列，进行三倍系列稀释。请勿在第 2 列进行稀释。
7. 准备 OX40 效应细胞时，盖好检测板盖并置环境温度（22~25 $^{\circ}$ C）条件下。

说明：A2、B2、E2 和 G2 孔中含 120 $\mu$ l 无抗体检测缓冲液（用作阴性对照）。

通过单一抗体储备液制备抗体稀释液的推荐检测板布局。													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		无配体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1		对照配体
B		无配体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1		对照配体
C													
D													
E		无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1		测试抗体 1
F													
G		无抗体	稀释液 9	稀释液 8	稀释液 7	稀释液 6	稀释液 5	稀释液 4	稀释液 3	稀释液 2	稀释液 1		测试抗体 2
H													

图 11. 抗体系列稀释液检测板布局示例。

#### 6.D. 准备 OX40 效应细胞

根据推荐的细胞接种密度，维持 OX40 效应细胞培养。细胞培养体积或接种密度变化会影响细胞生长速率和检测性能。增殖期间，细胞倍增率稳定后方可将细胞用于检测。

1. 如第 4.B 节所述，于检测前两天或三天进行细胞传代。为确保检测性能最佳且一致，收集时细胞密度需落在  $0.8\sim 1.5\times 10^6$  个细胞 /ml 范围内且细胞存活率大于 90%。
2. 通过台盼蓝染色法进行 OX40 效应细胞计数，并计算细胞密度和细胞存活率。
3. 从培养瓶中移取适量 OX40 效应细胞置 50ml 锥形管或更大规格离心管中。
4. 于  $130\times g$ ，环境温度条件下离心 10 分钟从而收集细胞，并将细胞沉淀重悬于检测缓冲液中，从而确保达到目标细胞密度  $1.0\times 10^6$  个细胞 /ml。
5. 您需至少 8ml OX40 效应细胞，从而满足 120 个检测孔，即两个检测板内侧 60 个孔分析用量。

#### 6.E. 配体或抗体样品和 OX40 效应细胞加至检测板中

1. 根据图 10 检测板布局，使用电动多通道移液器，取 25 $\mu$ l 适宜抗体或配体稀释液，加至检测板中。
2. 取 75 $\mu$ l 检测缓冲液，加至 96 孔检测板外侧孔中。
3. 取第 6.D 节准备的 OX40 效应细胞，置于无菌试剂加样槽中。使用多通道移液器，分装 50 $\mu$ l ( $0.5\times 10^5$  个细胞) OX40 效应细胞至含抗体或配体的孔中。
4. 盖好各检测板盖，并置 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 5 小时。



## 6.F. 加入 Bio-Glo™ Reagent

**说明：** Bio-Glo™ Reagent 加入检测孔板时应已平衡到环境温度（22~25°C）。

1. 从培养箱中取出检测板并于环境温度下平衡 10~15 分钟。
2. 使用手动多通道移液器，取 75μl Bio-Glo™ Reagent 加至检测板内侧 60 孔中，注意不得产生气泡。
3. 取 75μl Bio-Glo™ Reagent 加至每一检测板的 B1、C1 和 D1 孔中，检测本底信号。
4. 置环境温度条件下孵育 5~15 分钟。

**说明：** 改变孵育时间会影响原始相对发光单位（RLU）值，但不应导致 EC<sub>50</sub> 值和诱导倍数发生显著变化。

5. 使用发光检测仪或可读取发光信号的微孔板读数仪检测发光信号。

## 6.G. 数据分析

1. 通过计算 B1、C1 和 D1 孔的平均 RLU，确定孔板本底信号。
2. 诱导倍数计算 = 
$$\frac{\text{RLU (诱导 - 本底)}}{\text{RLU (无抗体对照 - 本底)}}$$
3. 绘制 RLU vs. Log<sub>10</sub>[抗体] 和诱导倍数 vs. Log<sub>10</sub>[抗体] 关系图。使用适宜曲线拟合软件（例如 GraphPad Prism® 软件）拟合曲线并检测抗体应答 EC<sub>50</sub> 值。

## 7. 疑难解答

若您遇到的问题在此没有列出，请联系普洛麦格（北京）生物技术有限公司或当地经销商。

联系信息见：[www.promega.com](http://www.promega.com)。电子邮箱：[chinatechserv@promega.com](mailto:chinatechserv@promega.com)

问题	原因和参考建议
发光信号检测值较低（RLU 读数）	选择专用发光检测仪。不推荐主要用于荧光信号检测的仪器。发光检测仪测量并报告发光信号相对值，不同仪器的实际 RLU 值可能存在差异。
	检测孔细胞量不足可导致低 RLU 值。根据说明书进行操作和铺板细胞，确保每孔含有足量活细胞。
	低活性 Bio-Glo™ Reagent 可导致低 RLU 值。按照说明书进行储存和操作 Bio-Glo™ Reagent。
	若是第一次进行测定，我们建议您尝试使用 FcγRIIb 细胞，因为您感兴趣的抗体可能依赖于 FcγRIIb 的交联。在配体的情况下，可能需要通过抗体进行交联。
检测性能变异性大。	细胞生长条件的变化，包括细胞铺板和收集密度、细胞活力和细胞倍增时间。严格按照说明书指导操作细胞，确保细胞生长情况一致。
	细胞收集过程中操作不当（包括离心时间过长、离心速度过快）会导致检测性能降低和检测变异性升高。
	不当细胞计数方法可能造成培养物和检测体系中出现细胞数量存在差异，并导致检测变异性升高。确保细胞计数方法准确且一致。

## 7. 疑难解答 (续)

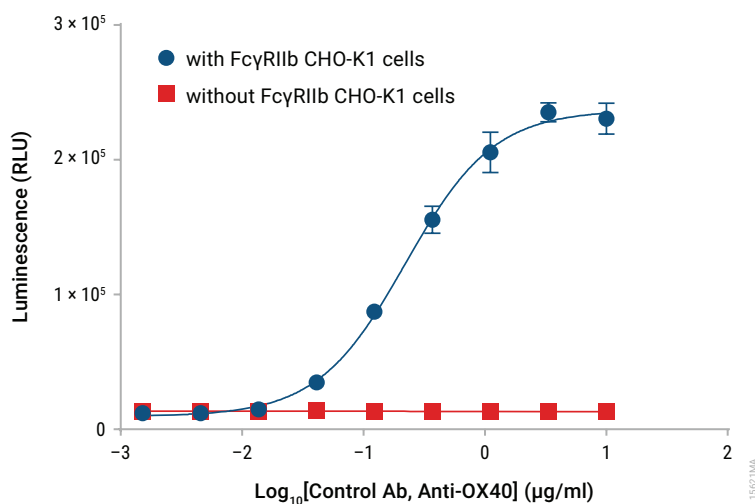
问题	原因和参考建议
检测反应弱 (低诱导倍数)	<p>优化测试样品浓度范围, 从而获取完整剂量 - 响应曲线 (具有适宜上下渐近线)。OX40 Bioassay 测得 EC<sub>50</sub> 值与其他方法 (例如基于原代 T 细胞) 测得 EC<sub>50</sub> 值可能存在差异。</p> <p>本检测试剂盒对检测缓冲液中 FBS 浓度较为敏感。若检测性能不佳, 则需优化检测缓冲液中 FBS 浓度 (0.5%~10%)。</p> <p>于存在 FcγRIIb 细胞条件下进行检测, 确定所用抗体性能是否与交联有关。</p> <p>若未处理对照组 RLU 小于微孔板读数仪本底 RLU 的 100 倍, 则在计算诱导倍数前, 从所有样品中减去检测板本底 RLU。</p>

## 8. 参考文献

- Mahoney, K.M. *et al.* (2015) Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nature Rev. Drug Disc.* **14**, 561–84.
- Melero, I. *et al.* (2015) Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nature Rev. Cancer* **15**, 457–72.
- Buchan, S.L. *et al.* (2018) The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy. *Blood* **131** (1), 39–48.
- Willoughby, J. *et al.* (2017) OX40: Structure and function-What questions remain? *Mol. Immunol.* **83**, 13–22.
- Croft, M. *et al.* (2009) The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol. Rev.* **229** (1), 173–91.
- Ishii, N. *et al.* (2010) OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. *Adv Immunol.* **105**, 63–98.
- Wilson, N.S. *et al.* (2011) An Fcγ receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells. *Cancer Cell* **19**, 101–13.

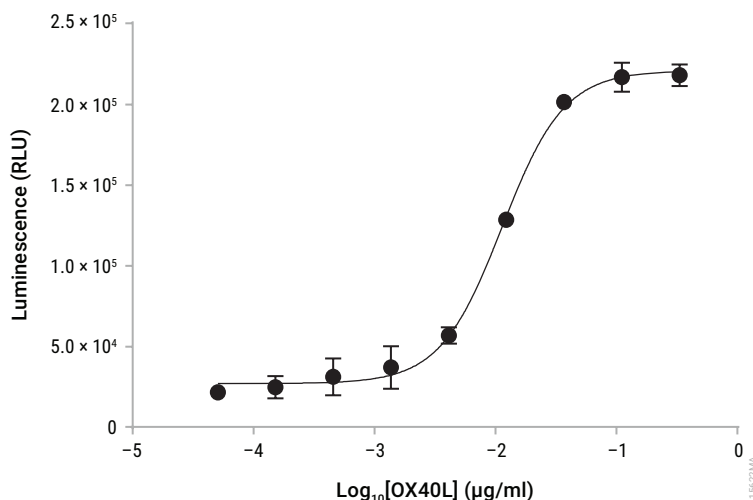
## 9. 附录

### 9.A. FcγRIIb 依赖性抗体的代表性检测结果



**图 12.OX40 Bioassay 检测 Control Ab, Anti-OX40 活性。** FcγRIIb CHO-K1 细胞铺板过夜。第二天，加入 Control Ab, Anti-OX40 (第 5.D 节) 稀释液，然后加入 OX40 效应细胞。置 37°C 条件下孵育 5 小时后，加入 Bio-Glo™ Reagent 并用 GloMax® Discover System 检测发光信号。使用 GraphPad Prism® 软件进行四参数逻辑曲线分析。EC<sub>50</sub> 值为 ~0.22µg/ml，诱导倍数为 ~19.2。

## 9.B. OX40 配体的代表性检测结果



**图 13. OX40 Bioassay 检测 OX40 配体活性。** 检测当日，按 50000 个细胞 / 孔的铺板密度将 OX40 效应细胞铺板于 96 孔板中。细胞与不同浓度的 OX40L (第 6.C 节) 共同孵育。置 37°C 条件下孵育 5 小时后，加入 Bio-Glo™ Reagent 并用 GloMax® Discover System 检测发光信号。使用 GraphPad Prism® 软件进行四参数逻辑曲线分析。EC<sub>50</sub> 值为 ~0.011 µg/ml，诱导倍数为 ~10.1。

## 9.C. 缓冲液和溶液组成

### OX40 效应细胞的初始细胞培养基

90%	RPMI 1640 (含 L- 谷氨酰胺和 HEPES)
10%	FBS
1mM	丙酮酸钠
0.1mM	MEM 非必需氨基酸

### OX40 效应细胞的细胞冻存培养基

85%	RPMI 1640 (含 L- 谷氨酰胺和 HEPES)
10%	FBS
5%	DMSO

### OX40 效应细胞的细胞生长培养基

90%	RPMI 1640 (含 L- 谷氨酰胺和 HEPES)
10%	FBS
500 µg/ml	潮霉素 B
800 µg/ml	G418 硫酸盐溶液
1mM	丙酮酸钠
0.1mM	MEM 非必需氨基酸

### FcγRIIb CHO-K1 细胞的细胞复苏培养基

90%	Ham's F12
10%	FBS

### 检测缓冲液

95%	RPMI 1640 (含 L- 谷氨酰胺和 HEPES)
5%	FBS

## 9.D. 相关产品

### T Cell Activation Bioassays

产品	规格	目录号
T Cell Activation Bioassay (NFAT)	1 份	J1621
T Cell Activation Bioassay (NFAT) 5X	1 份	J1625
T Cell Activation Bioassay (NFAT), Propagation Model	1 份	J1601
T Cell Activation Bioassay (IL-2)	1 份	J1651
T Cell Activation Bioassay (IL-2) 5X	1 份	J1655
T Cell Activation Bioassay (IL-2), Propagation Model	1 份	J1631

不得用于医学诊断。

### Cytokine and Growth Factor Bioassays

产品	规格	目录号
VEGF Bioassay	1 份	GA2001
VEGF Bioassay 5X	1 份	GA2005
VEGF Bioassay, Cell Propagation Model	1 份	GA1082
Recombinant VEGF	10µg	J2371
IL-2 Bioassay	1 份	JA2201
IL-2 Bioassay 5X	1 份	JA2205
IL-2 Bioassay, Propagation Model	1 份	J2952
IL-15 Bioassay 5X	1 份	JA2015
IL-15 Bioassay, Propagation Model	1 份	J2962

不得用于医学诊断。

## 9.D. 相关产品 (续)

### Immune Checkpoint Bioassays

产品	规格	目录号
FcγRIIb CHO-K1 Cells	1 份	JA2251
FcγRIIb CHO-K1 Cells 5X	1 份	JA2255
FcγRIIb CHO-K1 Cells, Propagation Model (CPM)	1 份	J2232
CD40 Bioassay	1 份	JA2151
CD40 Bioassay 5X	1 份	JA2155
CD40 Bioassay, Propagation Model	1 份	J2172
LAG-3/MHCII Blockade Bioassay	1 份	JA1111
LAG-3/MHCII Blockade Bioassay 5X	1 份	JA1115
LAG-3/MHCII Blockade Bioassay, Propagation Model	1 份	JA1112
OX40 Bioassay	1 份	JA2191
OX40 Bioassay 5X	1 份	JA2195
4-1BB Bioassay	1 份	JA2351
4-1BB Bioassay 5X	1 份	JA2355
4-1BB Bioassay, Propagation Model	1 份	J2332
PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay	1 份	J1250
PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay 5X	1 份	J1255
PD-L1 Negative Cells	1 份	J1191
CTLA-4 Blockade Bioassay	1 份	JA3001
CTLA-4 Blockade Bioassay 5X	1 份	JA3005
TIGIT Negative Cells	1 份	J1921
PD-1+TIGIT Combination Bioassay	1 份	J2211
PD-1+TIGIT Combination Bioassay 5X	1 份	J2215
Control Ab, Anti-CTLA-4	100μg	JA1020
Control Ab, Anti-PD-1	100μg	J1201
Control Ab, Anti-TIGIT	100μg	J2051
Control Ab, Anti-4-1BB	50μg	K1161
Control Ab, Anti-OX40	50μg	K1191
Control Ab, Anti-GITR	50μg	K1171
Control Ab, Anti-CD40	50μg	K1181

不得用于医学诊断。

其他试剂盒规格可供选择。

## Fc Effector Bioassays

产品	规格	目录号
ADCC Reporter Bioassay, Complete Kit (Raji)*	1 份	G7015
ADCC Reporter Bioassay, Target Kit (Raji)*	1 份	G7016
ADCC Reporter Bioassay, Core Kit*	1 份	G7010
ADCC Reporter Bioassay, F Variant, Core Kit**	1 份	G9790
FcγRIIIa-H ADCP Reporter Bioassay, Complete Kit**	1 份	G9901
FcγRIIIa-H ADCP Reporter Bioassay, Core Kit**	1 份	G9991

\* 仅供研究使用。不得用于诊断。

不得用于医学诊断。其他试剂盒规格可供选择。

## 检测试剂

产品	规格	目录号
Bio-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	G7941
	100ml	G7940

不得用于医学诊断。

## 发光检测仪

产品	规格	目录号
GloMax® Navigator System	1 份	GM2000
GloMax® Discover System	1 份	GM3000
GloMax® Explorer System	1 份	GM3500

仅供研究使用。不得用于诊断。

说明：可通过普洛麦格 Custom Assay Services 购买其他 Fc Effector、Immune Checkpoint 与 Cytokine Bioassays。Early Access 清单见：

[www.promega.com/applications/biologics-drug-discovery/functional-bioassays/target-pathway-assays/](http://www.promega.com/applications/biologics-drug-discovery/functional-bioassays/target-pathway-assays/) 或  
电子邮箱：CAS@promega.com



(a)NOT FOR MEDICAL DIAGNOSTIC USE. FOR IN VITRO USE ONLY. BY USE OF THIS PRODUCT, RECIPIENT AGREES TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LIMITED USE STATEMENT. If the recipient is not willing to accept the conditions of this limited use statement, and the product is unused, Promega will accept return of the unused product and provide the recipient with a full refund.

This product may not be further sold or transferred by the recipient and may be used only by the recipient, and then only for (1) research use, (2) discovery, development and monitoring of biologic drugs and vaccines, (3) quality assurance testing of biologic drugs and vaccines, and (4) product release assays for biologic drugs and vaccines. No other commercial use is allowed. "Commercial use" means any and all uses of this product by recipient for monetary or other consideration, including providing a service, information or data to unaffiliated third parties, and resale of this product for any use. Recipient has no right to modify, derivatize, genetically engineer or otherwise create variations of the cells or genes stably transfected within the cells except that recipient may propagate and store the cells for long-term use. In addition, recipient must use Bio-Glo™ Luciferase Assay System purchased from Promega Corporation for all luminescence assays using this product or contact Promega to obtain a license for use of this product with reagents other than Promega's. PROMEGA MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING AS TO MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE WITH REGARDS TO THIS PRODUCT. The terms of this agreement shall be governed under the laws of the State of Wisconsin, USA.

<sup>(b)</sup>U.S. Pat. No. 8,008,006 and European Pat. No. 1341808.

<sup>(c)</sup>Product cannot be used for proficiency testing.

<sup>(d)</sup>Licensed from Lonza Cologne GmbH under U.S. Pat. Nos. 7,700,357, 8,192,990 and 8,003,389, European Pat. Nos. 1297119, 1522587, 1607484 and 1741778 and other pending and issued patents.

<sup>(e)</sup>Patents Pending.

© 2019 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GloMax is a registered trademark of Promega Corporation. Bio-Glo is a trademark of Promega Corporation.

Accutase is a registered trademark of Innovative Cell Technologies. Echo is a registered trademark of Labcyte, Inc. GIBCO is a trademark of Thermo Fisher Scientific, Ltd. GraphPad Prism is a registered trademark of GraphPad Software, Inc. JMP is a registered trademark of SAS Institute, Inc. Mantis is a registered trademark of Formulatrix, Inc. Multidrop is a trademark of Thermo Fisher Scientific, Ltd.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information. All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.