

中文说明书

IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay, Propagation Model

适用产品目录号：
J3392 和 GA1410



IL-2R β Bioassay, Propagation Model

所有技术文献的英文原版均可在 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

1. 描述.....	2
2. 产品组分和储存条件.....	12
3. 开始检测前.....	12
3.A. 用户需提供的材料.....	13
4. 制备 IL-2R β Bioassay Cells.....	13
4.A. 细胞解冻和原始细胞培养.....	13
4.B. 细胞维持与增殖.....	14
4.C. 细胞冷冻和储存.....	15
5. 检测操作流程.....	15
5.A. 检测板布局设计.....	17
5.B. 第 1 天：制备和铺板 IL-2R β Bioassay Cells.....	17
5.C. 第 2 天（检测当天）：准备试剂、测试样本和参考样本.....	18
5.D. 制备系列稀释液.....	19
5.E. IL-15 刺激实验.....	20
5.F. 制备和添加 Bio-Glo-NL™ Reagent.....	21
5.G. 数据分析.....	21
6. 疑难排查.....	22
7. 参考文献.....	23
8. 附录.....	23
8.A. 缓冲液和溶液组成.....	23
8.B. 相关产品.....	24

1. 描述

IL-2 受体 (IL-2R) 是一种由三个亚单位组成的 I 型细胞因子受体, 包括 IL-2R α (CD25)、IL-2/IL-15R β (CD122) 和 IL-2R γ (CD132)。具有高亲和力 (K_d 约为 10^{-11} M) 的三聚体受体形式包含这三个亚单位, 在调节性 T 细胞 (Treg)、活化的 CD4 和 CD8 效应 T 细胞、部分自然杀伤 (NK) 细胞以及多种内皮细胞类型中存在。中等亲和力 (K_d 约为 10^{-9} M) 的异二聚体受体形式仅包含 IL-2R β 和 IL-2R γ , 在 CD8+ 效应记忆 T 细胞和大多数 NK 细胞中发现。IL-2R γ 也被称为 γ 通用链 (γ_c), 存在于 IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 和 IL-21 的受体中 (1)。

高剂量重组 IL-2 疗法 (阿地白介素; 商品名 Proleukin) 在 1990 年代被批准用于治疗转移性肾细胞癌和转移性黑色素瘤。最初认为这种疗法只促进患者效应 T 细胞和 NK 细胞的扩增。然而, 后来发现高剂量 IL-2 会促进免疫抑制性 Treg 细胞的扩增和发育, 这些细胞通常被认为是肿瘤微环境中不希望存在的。相反, 如今低剂量方案正在被研究用于治疗各种自身免疫疾病, 因为 Treg 细胞参与了对自身抗原的耐受。为了避免与高剂量 IL-2 相关的弊端和副作用 (如半衰期短、血管漏出综合征、低血压和肝毒性), 正在开发针对中等亲和力受体及表达该受体的细胞类型的其他 IL-2 和 IL-15 分子 (2)。为了癌症治疗目的, 避免刺激高亲和力受体类型的细胞 (如 Treg 细胞和血管及肺部内皮细胞), 并增加 CD8+/Treg 的比例可能会增强更积极且安全的反应。

IL-15 是功能相关的一种细胞因子, 但与 IL-2 不同, 它不对 Treg 细胞产生影响。IL-15 也有一个三聚体受体形式, 即 IL-15R α (CD215) (其 N 端含有可结合的 sushi 结构域), 以及 IL-2/IL-15R β (CD122) 和 IL-15R γ (CD132)。IL-15 可以通过三种方式结合和向效应细胞发出信号。它主要以膜形式向同时表达 IL-15 和 IL-15R α 的各种细胞发出信号, 包括单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞 (3)。在此情况下, IL-15R α 将 IL-15 从内质网护送到细胞表面, 从而实现顺式呈递给一系列表达 IL-15R $\beta\gamma$ 的细胞 (如 NK 细胞、CD8+ T 细胞、NKT 细胞和 B 细胞; 4)。也可以分泌一种可溶形式的受体 / 细胞因子的异二聚体复合物, 以便向表达 IL-15R $\beta\gamma$ 的效应细胞展示细胞因子 (5)。最后, 虽然罕见检测到单体 IL-15, 但它可以直接与 IL-15R $\beta\gamma$ 结合, 但亲和力较低 (6)。

IL-2/IL-15 信号可以激活多种信号通路。在淋巴细胞中, JAK/STAT 信号传导始于 JAK1 和 JAK3 酪氨酸激酶在受体胞浆域的招募和激活。这些激酶进一步招募并激活磷酸化后的 STAT3 和 5, 形成二聚体 / 四聚体转运至细胞核, 从而转录激活多种蛋白质, 包括 Bcl-2、c-myc、c-fos 和 c-jun。在第二条通路中, Shc 接头蛋白被招募至 IL-2/IL-15R β 亚基, 并激活 Grb2。Grb2 位于 PI3K 通路中, 最终可以磷酸化 Akt, 或者激活 RAS-RAF 进而激活 MAPK。这些通路影响细胞增殖、抗凋亡生存能力和细胞毒性效应功能。

IL-2R $\beta\gamma$ 生物活性测定法, 可扩增模型^(a-c) (IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay, Propagation Model, Cat.# J3392) 是一种设计用来测量人源 IL-2R $\beta\gamma$ 受体刺激或抑制的基于细胞的生物发光检测方法。IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay 细胞以可扩增细胞模型 (CPM) 格式提供, 其中包含冷冻保存的细胞, 解冻后可以进行增殖和长期储存 (也可提供即用型; Cat.# JA5101, JA5105)。IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay, 可扩增模型的细胞库 (Cat.# GA1410) 同样可提供。

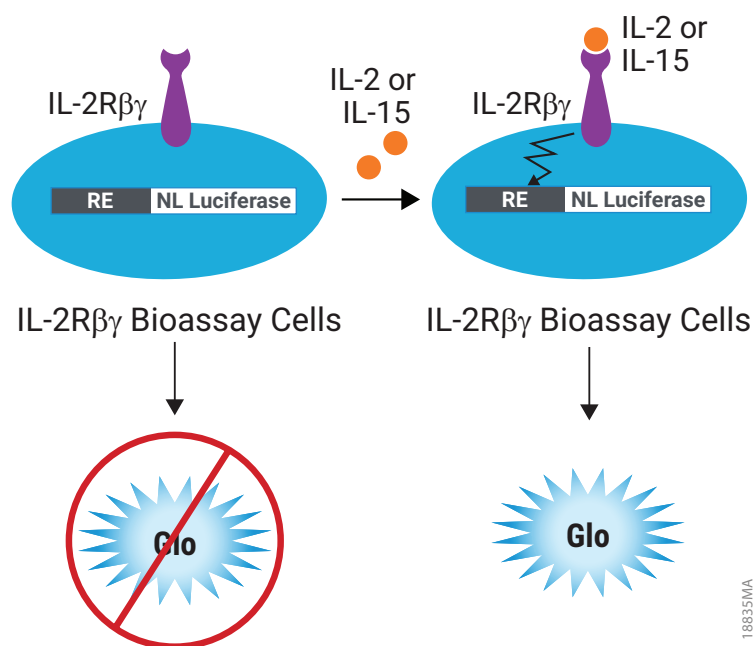


图 1. IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay 的示意图。IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay 包含了一种基因工程改造的细胞系 --IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay 细胞。当 IL-2 或 IL-15 与中等亲和力的 CD122/CD132 异源二聚体受体复合物（即 IL-2R $\beta\gamma$ ）结合时，会启动受体介导的信号传导途径，进而导致生物发光现象。这种发光可通过添加 Bio-Glo-NL™ 试剂（目录号 Cat.# J3081、J3082、J3083）并利用发光测量仪进行检测和量化。若不存在细胞因子，则 CD122/CD132 复合体下游不会发生信号传导，从而不会产生发光信号。

1. 描述 (续)

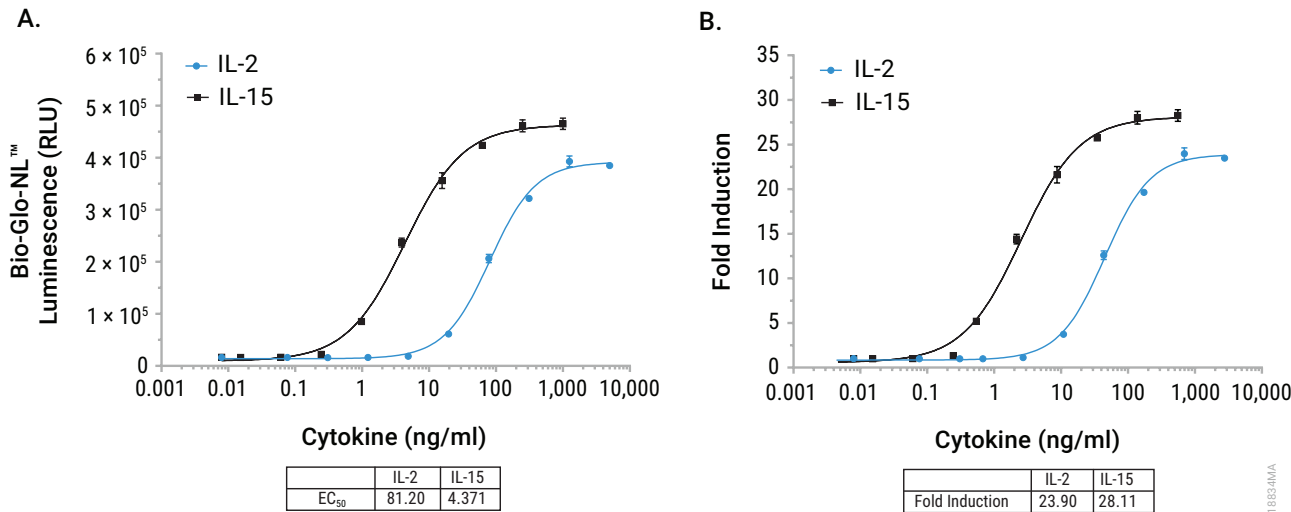


图 2. IL-2Rβγ Bioassay 对重组 IL-2 和 IL-15 有响应。按照下文操作方案所述方法制备 IL-2Rβγ Bioassay 细胞，并将其与不同稀释浓度的重组 IL-2 和 IL-15 孵育。经过 6 小时孵育后，加入 Bio-Glo-NL™ 试剂，并采用 GloMax® Discover 系统对产生的发光进行量化测定。数据通过 GraphPad Prism® 软件拟合为四参数逻辑曲线。结果显示，IL-2 的 EC₅₀ 值为 81ng/ml (**面板 A**)，其诱导倍数约为 24 倍 (**面板 B**)。IL-15 的 EC₅₀ 值为 4.4ng/ml，其诱导倍数约为 28 倍。这些数据是由培养细胞实验获得的。**面板 A** 显示了原始的发光强度测量值，而**面板 B** 则展示了计算出的诱导倍数。

表 1. IL-2R β y Bioassay 的精密度、准确度和线性。

参数	结果	
准确度	预期相对效价 %	回收率 %
	50	90.3
	75	102.6
	125	105.7
	150	101.7
重复性 (% CV)	100% (参考)	3.6
中间精密度 (% CV)		8.4
线性 (r^2)		0.996
线性方程 ($y = mx + b$)		$y = 1.08x - 6.35$
针对重组人 IL-15 的 50%-150% 理论活性系列，在三天内由两位分析员各自独立执行三次实验（共六次独立实验），每组实验均进行三重平行测定。实验中加入 Bio-Glo-NL™ 试剂并通过 GloMax® Discover 系统对产生的发光进行了量化。使用 JMP® 软件确定平行性后，对数据进行分析并计算相对效价。这些数据是基于解冻即用型细胞生成的。		

1. 描述 (续)

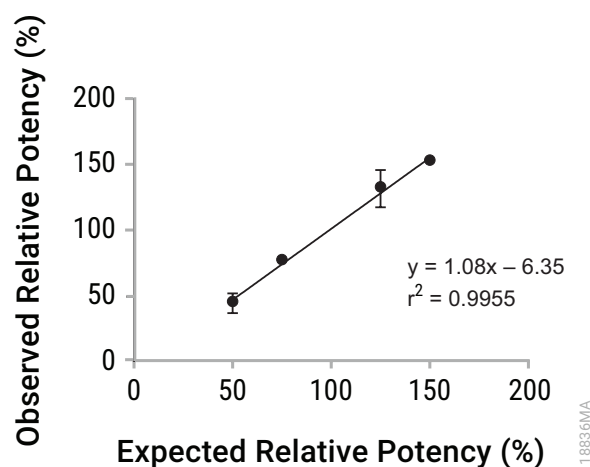


图 3. IL-2Rβγ Bioassay 显示了精确性、准确性和线性关系。通过 IL-2Rβγ Bioassay，对重组人 IL-15 的 50%-150% 理论活性系列在三天内在两位不同分析员之间分别进行了三次独立实验（总计六个独立实验），每次实验均做三重平行检测。实验中添加了 Bio-Glo-NL™ 试剂，并利用 GloMax® Discover 系统对量化发光。线性关系及 r^2 值采用 GraphPad Prism® 软件进行计算确定。所有数据来源于解冻即用型细胞。

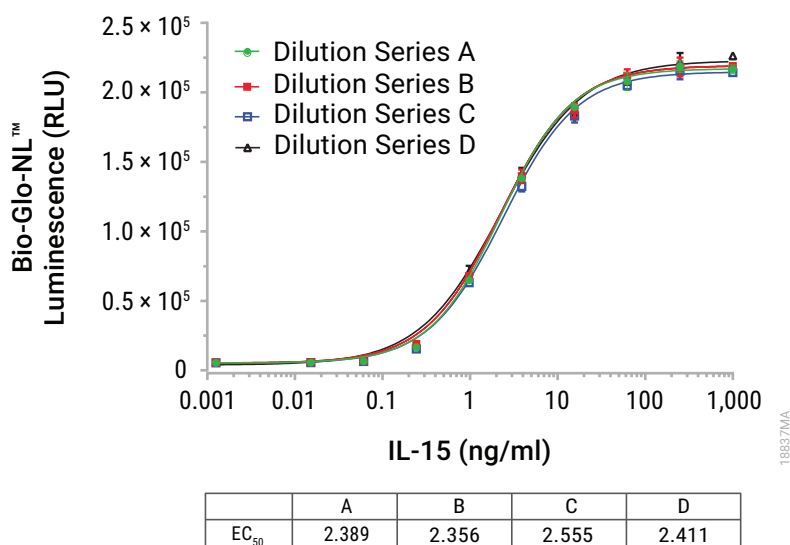


图 4. IL-2Rβγ Bioassay 展现出良好的重复性。通过 IL-2Rβγ Bioassay，在四个独立的检测板上分析了重组人 IL-15 的四个单独连续稀释系列（A、B、C 和 D）。在每个检测板上均添加了 Bio-Glo-NL™ 试剂，并使用 GloMax® Discover 系统量化发光。所获取的数据通过 GraphPad Prism® 软件拟合至四参数逻辑曲线。图中展示了四个检测板各自的 EC₅₀ 值。这些数据基于解冻即用型细胞生成。

1. 描述 (续)

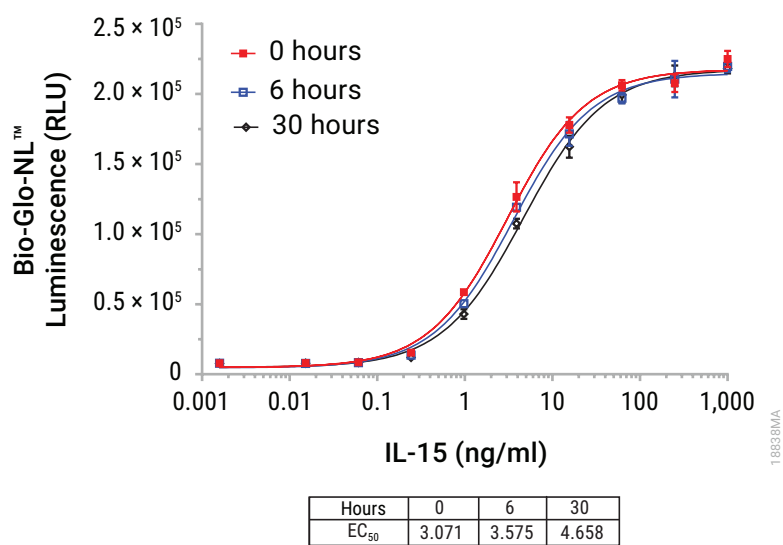


图 5. IL-2Rβγ Bioassay 显示出检测物的稳定性。在应用于 IL-2Rβγ Bioassay 之前，将重组人 IL-15（15μg/ml，以牛血清白蛋白为载体）在 53°C 条件下进行 0 至 30 小时的热处理。随后添加 Bio-Glo-NL™ 试剂，并利用 GloMax® Discover 系统量化发光。使用 GraphPad Prism® 软件将倍增诱导数据拟合到四参数逻辑曲线。该数据同样采用了解冻即用型细胞进行实验。

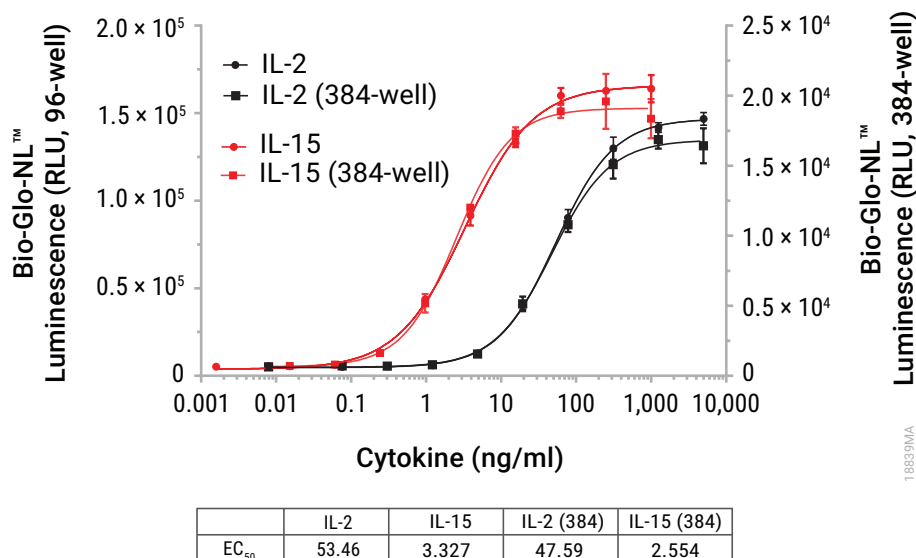


图 6. IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay 适用于 384 孔板格式。 IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay 在 96 孔板和 384 孔板两种格式下进行了测试。IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay 细胞被准备并分配为 50 μ l (96 孔板) 或 12.5 μ l (384 孔板) 体积。重组人 IL-15 进行了一系列 4 倍连续稀释, 并添加到细胞中 (96 孔板每孔 25 μ l; 384 孔板每孔 6.2 μ l)。在用重组 IL-15 刺激 6 小时后, 添加 Bio-Glo-NL™ 试剂 (96 孔板每孔 75 μ l; 384 孔板每孔 18.7 μ l), 然后利用 GloMax® Discover 系统量化发光。所得数据通过 GraphPad Prism® 软件拟合至四参数逻辑曲线。这些数据是使用解冻即用型细胞生成的。表格所示, IL-2 的 EC₅₀ 值约为 54ng/ml (96 孔板格式) 和 48ng/ml (384 孔板格式)。IL-15 的 EC₅₀ 值约为 3.3ng/ml (96 孔板) 和 2.6ng/ml (384 孔板)。

1. 描述 (续)

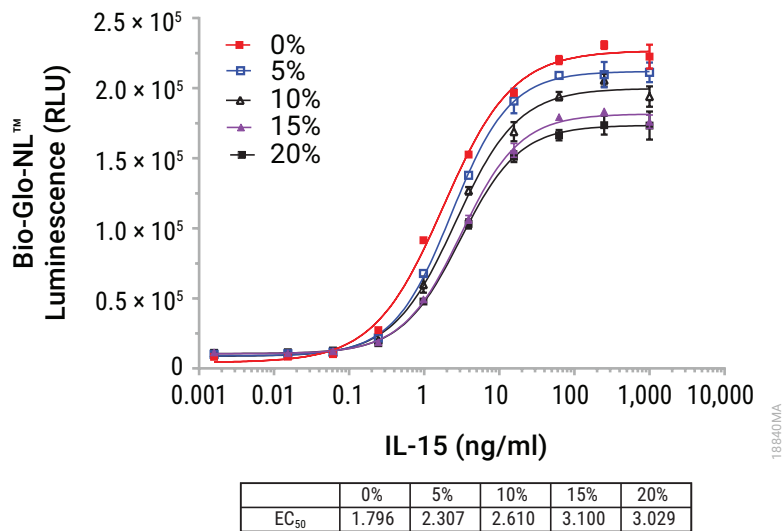


图 7. 人血清对 IL-2Rβγ Bioassay 的影响。IL-2Rβγ Bioassay 细胞在无血清或存在不同浓度混合正常人血清的情况下，接受了一定剂量范围内的重组 IL-15 处理，最终形成 0%-20% 的人血清终浓度。随后添加 Bio-Glo-NL™ 试剂，并采用 GloMax® Discover 系统量化发光。所得数据通过 GraphPad Prism® 软件拟合至四参数逻辑曲线。这些数据同样基于解冻即用型细胞产生。

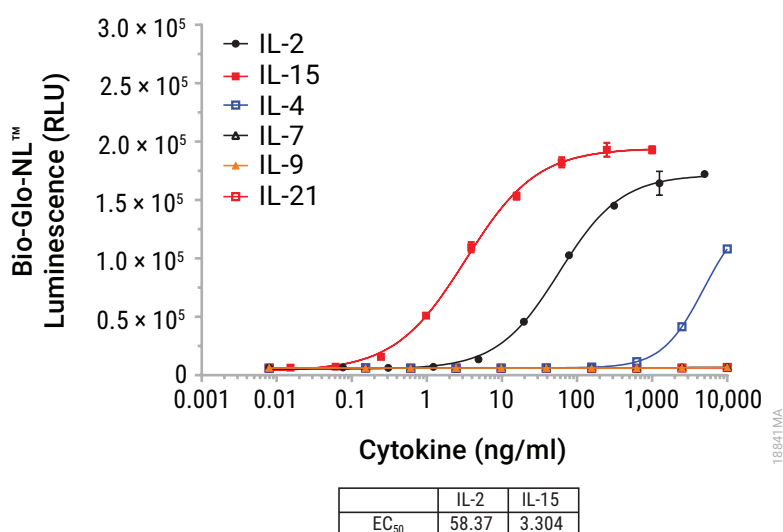


图 8. IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay 的细胞因子特异性。IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay 细胞经一系列第 1 型相关细胞因子（包括 IL-2、IL-15、IL-4、IL-7、IL-9 和 IL-21）处理。之后添加 Bio-Glo-NL™ 试剂，并利用 GloMax® Discover 系统量化发光。所得数据通过 GraphPad Prism® 软件拟合至四参数逻辑曲线。在高浓度下可以检测到部分 IL-4 的响应，但在本实验条件下，IL-7、IL-9 和 IL-21 并未引发任何信号。由于所测试浓度范围限制，我们未能计算出这些相关细胞因子的 EC₅₀ 值。这些数据基于解冻即用型细胞生成。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
IL-2R β Bioassay, Propagation Model	1 份	J3392

非医疗诊断用途。包含：

- 2 瓶 IL-2R β Bioassay 细胞 (CPM)，每瓶含 1.6×10^7 个细胞 /ml (每瓶 1ml)

注：解冻并培养其中一瓶以建立冷冻细胞库用于后续实验。保留第二瓶供未来使用。

产品	规格	目录号
IL-2R β Bioassay, Cell Bank	1 份	GA1410

非医疗诊断用途。包含：

- 50 瓶 IL-2R β Bioassay 细胞 (CPM)，每瓶含 1.6×10^7 个细胞 /ml (每瓶 1ml)

储存条件：收到产品后，应立即将细胞小瓶转移至低于 -140°C (冷冻柜或液氮蒸汽相) 进行长期储存。不得将细胞小瓶浸没于液氮中，也不得储存在 -80°C ，因为这会降低细胞活力和细胞性能。

3. 开始检测前

请在开始操作前完整阅读整个操作手册，熟悉各组分以及检测程序。

从装有细胞小瓶的包装盒上取下产品标签保存，或者记下标签上的产品目录号和批号。这些信息可用于从网站下载该特定产品的相关文档，如质量分析证书 (Certificate of Analysis) 等。

细胞的解冻、扩增和建立细胞库必须严格按照第四部分所述进行。细胞接种密度和扩增密度已进行了优化，以确保稳定的细胞生长，表现为恒定的细胞倍增率，从而达到最优、一致的性能表现。

IL-2R β Bioassay 旨在与用户提供的设计用于激活或抑制 IL-2R β 信号通路的生物制品配合使用。第五部分中推荐的细胞铺板密度、诱导时间和检测缓冲液成分是采用研究级重组人 IL-2 和 IL-15 建立的。对于其他生物样品，可能需要调整此处提供的参数并优化检测条件。使用这些试剂生成的数据已在图 2 中展示。

IL-2R β Bioassay 产生生物发光信号，需要灵敏的发光检测仪或多模式微孔板读数仪来检测发光强度。本技术手册中包含的生物检定开发和性能数据均使用 GloMax[®] Discover System 仪器生成。所有读数的积分时间为 0.5 秒 / 孔。该生物检定法兼容大多数其他微孔板读数器；然而，相对发光单位 (RLU) 读数可能会因不同仪器的敏感性和设置而有所差异。使用不同仪器不应影响对测试样本测量得到的相对效力。

3.A. 用户需自行提供的材料

缓冲液和溶液的组成在第 8.A 节提供。

试剂

- 重组人白介素 -15 (例如, PeproTech Cat.# 200-15) 或人白介素 -2 (例如, PeproTech Cat.# 200-02 或 Miltenyi Cat.# 130-097-742)
- 用户自定义的生物制品样本
- RPMI 1640 培养基 (例如, ATCC Cat.# 30-2001 或 GIBCO™ Cat.# A10491-01)
- 胎牛血清 (FBS; 例如, Avantor Seradigm Cat.# 89510-194 或 HyClone Cat.# SH30070)
- 潮霉素 B (例如, GIBCO™ Cat.# 10687-010)
- 杀稻瘟菌素 S (例如, GIBCO™ Cat.# A1113903 或 Invivogen Cat.# ant-bl)
- 二甲基亚砜 (DMSO; Sigma Cat.# 2650)
- 台盼蓝溶液 (例如, Sigma Cat.# T8154)
- Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay System (Cat.# J3081, J3082, J3083)

! 注: 对于检测 IL-2R β Bioassay 细胞 (可增殖模型), 需使用 Bio-Glo-NL™ 萤光素酶检测系统 (Cat.# J3081, J3082, J3083)。不要使用 Bio-Glo™ 萤光素酶检测系统 (Cat.# G7940, G7941)。

耗材与设备

- 白色平底 96 孔检测板 (例如, Corning® Cat.# 3917)
- 无菌透明带盖 96 孔板 (例如, Corning® Cat.# 3370 或 Falcon Cat.# 353077), 用于制备样品稀释液
- 单通道和 12 通道移液器
- T75 组织培养瓶 (例如, Corning® Cat.# 430641U)
- 无菌 15ml 和 50ml 锥形离心管
- 无菌试剂储液槽 (例如, Corning® Cat.# 4870)
- 温湿度控制的 37°C、5% CO₂ 孵箱
- 37°C 水浴装置
- 可测发光强度的板式读数器 (例如, GloMax® Discover System)

4. 制备 IL-2R β Bioassay 细胞

4.A. 细胞解冻与初始细胞培养

IL-2R β Bioassay 细胞是在悬浮培养条件下生长的。

! 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. 准备 75ml 解冻培养基 (参见第 8.A 节), 并预热至 37°C。此培养基将在细胞解冻后立即用于培养细胞。
2. 向 50ml 锥形离心管中转移 9ml 解冻培养基。

4.A. 细胞解冻与初始细胞培养（续）

3. 从 -140°C 存储条件下取出一管 IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay 细胞，在 37°C 温水浴中温和振荡解冻（切勿倒置细胞管），直至完全解冻（通常需要 2-3 分钟）。
4. 用 70% 乙醇喷洒细胞管，然后转移到细胞培养超净台内。
5. 将所有细胞（约 1ml）转移到含预热的解冻培养基（9ml）的 50ml 锥形离心管中。
6. 以 $120 \times g$ 离心 5 分钟。
7. 轻柔吸去培养基，并用预先加热的解冻培养基重新悬浮细胞沉淀。
8. 通过台盼蓝排斥法计数细胞数量和存活率。
9. 使用额外的解冻培养基调整细胞浓度至 3×10^5 个细胞 /ml（最终细胞悬液体积约为 60ml），并将细胞悬液均匀分配到两个 T75 培养瓶中。将培养瓶水平放置于温度湿度控制的 37°C 、5% CO_2 孵箱中，孵育两天。

4.B. 细胞维持与扩增

从第二次传代开始，使用含有选择性抗生素的生长培养基（参见第 8.A 节）进行细胞维持和扩增，并在扩增过程中监测细胞存活率和倍增时间。细胞生长速率应在解冻后大约 7 至 10 天稳定下来。此时，细胞存活率通常高于 90%，平均细胞倍增时间约为 24 小时。每次传代时应记录传代次数。细胞预计在最多 25 次传代内保持大部分功能。

1. 在细胞传代当天，通过显微镜观察细胞并估计细胞汇合程度。
2. 振荡或吹打使细胞形成单细胞悬液。
3. 取出一份样品并通过台盼蓝排斥法计数细胞。
4. 推荐的细胞传代密度如下：

- a. 对于 2 天培养： 3×10^5 个细胞 /ml
- b. 对于 3 天培养： 1.5×10^5 个细胞 /ml

注意：建议在常规细胞扩增过程中使用以下培养基体积：T75 培养瓶用 25ml，T150 培养瓶用 50ml，T225 培养瓶用 75ml。根据其他培养瓶表面积相应调整体积。

5. 将培养瓶水平放置于温度湿度控制的 37°C 、5% CO_2 孵箱中。

! **注意：**不得让细胞密度超过 1.6×10^6 个细胞 /ml，否则它们会迅速耗尽培养基营养成分，开始失去活力。

4.C. 细胞冷冻与储存

注： 我们建议在最早的传代次数就建立主细胞库和工作细胞库。

1. 在细胞冷冻当天，准备新的细胞冷冻培养基（参见第 8.A 节），并置于冰上待用。
2. 取样进行台盼蓝染色细胞计数。根据所需的细胞冷冻密度计算所需冷冻培养基的体积。我们建议的冷冻密度范围为 2×10^6 至 1×10^7 个细胞 /ml。
3. 将细胞转移至 50ml 无菌锥形离心管或更大容量的离心管中，以 $120 \times g$ 离心 10-15 分钟。
4. 轻轻吸去上清液，避免扰动细胞沉淀。
5. 小心地用冰凉冷冻培养基重悬细胞沉淀，使其达到期望的最终细胞密度。将细胞悬液合并到单一管中，然后将 1ml 细胞悬液分装入冷冻管。
6. 使用控速冷冻器进行冷冻（或 -80°C 冷冻冰箱 Mr. Frosty[®] 或 Styrofoam[®] 架中过夜冷冻细胞）。
7. 转移到 -140°C 或更低温度下长期储存。

5. 检测操作流程

IL-2R β Bioassay 可用于检测已知能够结合并刺激 IL-2R β 受体的 IL-2 和 IL-15 类型生物样本。可以使用重组人 IL-2 或 IL-15。本操作流程方案说明如何在一个检测运行中，使用 IL-2R β Bioassay 比较两个测试样品与参照样品的效果。每个测试样品和参考样品都设置三个平行孔，使用十点（10-point）系列稀释液，并在单个 96 孔检测板内部 60 个孔进行分析。其他实验布局和检测板设计也是可行的，但可能需要进一步优化。

注：

- a. 在制备测试样本和参照样本时，选择适当的起始浓度和稀释方案，以实现具有适当上下渐近线和斜率上足够点数的完整剂量 - 效应曲线。作为参考，我们使用 $0-1\mu\text{g/ml}$ 重组人 IL-15 (PeproTech Cat.# 200-15) 或 $0-5\mu\text{g/ml}$ 重组人 IL-2 (PeproTech Cat.# 200-02) 作为样本范围，并采用四倍系列稀释以构建完整的十点剂量曲线。对于您的样本，浓度范围和稀释方案可能需要优化。
- b. 在培养 IL-2R β Bioassay 细胞期间，遵循推荐的细胞接种密度进行常规扩增。细胞培养体积或接种密度的变化可能会影响后续检测性能。只有当细胞在扩增过程中倍增率稳定后，才可用于本检测。使用常规 2 天或 3 天传代过程中收获的活跃生长的健康细胞；在进行检测前，细胞活力应大于 90%。

5. 检测方案 (续)

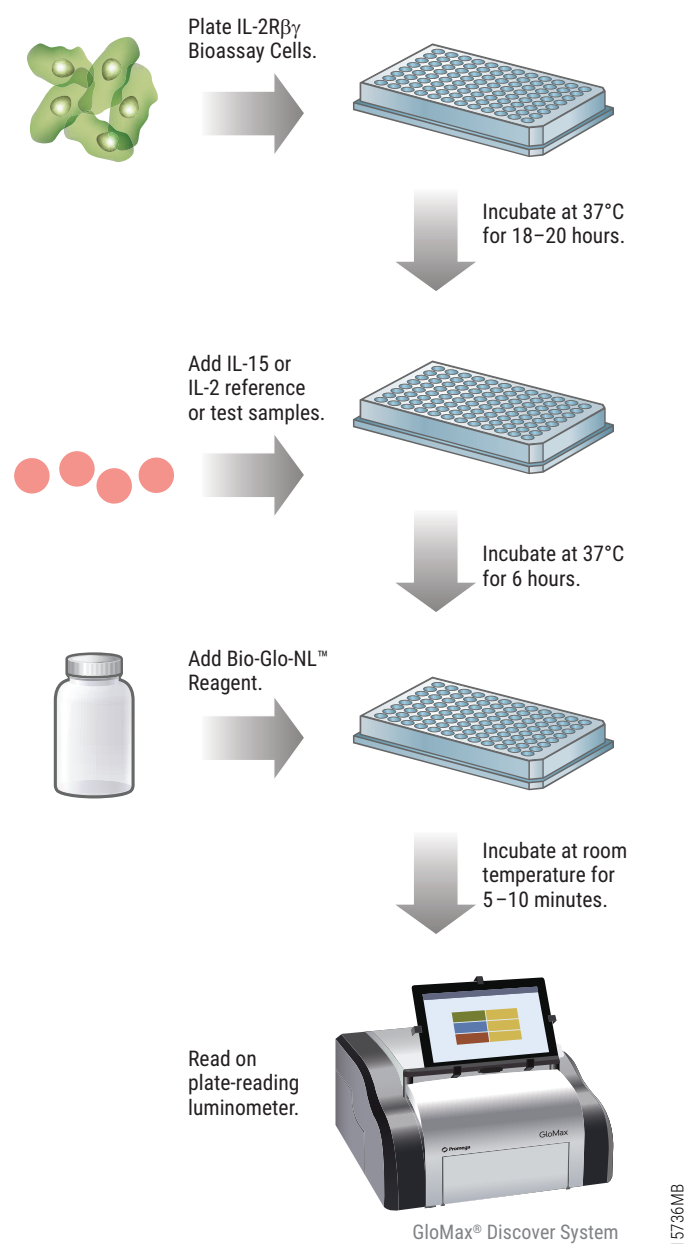


图 9. IL-2R $\beta\gamma$ Bioassay 操作流程

5.A. 板布局设计

对于本操作方案中描述的方法，请参考图 10 所示的板布局设计作为指南。本操作方案描述了测试样本和参照样本的系列重复稀释（n=3），以在每个板上生成两条 10 点剂量 - 反应曲线。

推荐板布局设计													
	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	无药对照	稀释 9	稀释 8	稀释 7	稀释 6	稀释 5	稀释 4	稀释 3	稀释 2	稀释 1	B	参照样本重复孔 1
C	B	无药对照	稀释 9	稀释 8	稀释 7	稀释 6	稀释 5	稀释 4	稀释 3	稀释 2	稀释 1	B	测试样本重复孔 1
D	B	无药对照	稀释 9	稀释 8	稀释 7	稀释 6	稀释 5	稀释 4	稀释 3	稀释 2	稀释 1	B	参照样本重复孔 2
E	B	无药对照	稀释 9	稀释 8	稀释 7	稀释 6	稀释 5	稀释 4	稀释 3	稀释 2	稀释 1	B	测试样本重复孔 2
F	B	无药对照	稀释 9	稀释 8	稀释 7	稀释 6	稀释 5	稀释 4	稀释 3	稀释 2	稀释 1	B	参照样本重复孔 3
G	B	无药对照	稀释 9	稀释 8	稀释 7	稀释 6	稀释 5	稀释 4	稀释 3	稀释 2	稀释 1	B	测试样本重复孔 3
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

图 10. 示例板布局。这个推荐的布局展示了每个测试样本和参照样本稀释系列（稀释 1- 稀释 9）的三个不相邻重复孔位置，以及仅含有检测缓冲液（标注为“B”）的孔。

5.B. 第一天：准备和接种 IL-2Rβy Bioassay 细胞

- 按照第 8.A 部分所述准备 50ml 检测缓冲液，并在使用前加热至 37°C。
- 使用在常规 2 天或 3 天传代过程中收获的、活跃增殖且健康的细胞。振荡细胞、取样、台盼蓝排除法计数。
- 根据样品和板的数量，估算所需细胞数目，并额外增加 50–100% 以补偿离心过程中的损失。对于每个检测板，至少需要 1.8×10^6 个细胞（每孔 3×10^4 个细胞 $\times 60$ 孔）。
- 将细胞加入 50ml 离心管中，以 $120 \times g$ 离心 10 分钟。
- 去除上清液。

6. 将细胞悬浮于检测缓冲液中，浓度估算为 2×10^6 个细胞 /ml，并通过台盼蓝排斥法进行计数。
7. 使用额外的检测缓冲液调整细胞浓度至 6×10^5 个细胞 /ml。
8. 分配 50 μ l / 孔 (每孔约 3×10^4 个细胞) 到两个 96 孔板内部的 60 个孔中；对外围 36 个孔，每孔加入 75 μ l 检测缓冲液。
9. 在 37°C、5% CO₂ 条件下孵育 18 至 20 小时。

 **注意：**本生物活性检测也可以在一天内完成，即细胞在一天内进行接种和刺激。可能会观察到略低的诱导倍数。

5.C. 第 2 天（检测日）：准备试剂、测试样本和参考样本

在开始实验前准备好以下试剂。

Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay Reagent：作为参考，10ml Bio-Glo-NL™ 试剂足以用于检测 96 孔板中的 120 个孔。Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay Substrate 应在 -30°C 至 -10°C 下储存。在 6 小时的检测诱导期内，在室温（不超过 25°C）解冻 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay Buffer。建议在使用前即刻配制重组 Bio-Glo-NL™ 试剂，不要储存重组后的试剂。一旦重组，Bio-Glo-NL™ 试剂在室温下大约 8 小时内会丧失约 10% 活性。有关 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay System 的使用说明，请参阅 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay System 快速操作手册 (#FB227)。

 **注：**IL-2R β Bioassay 细胞仅与 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay Reagent 兼容，**不得**将 Bio-Glo™ Luciferase Assay Reagent 与 IL-2R β Bioassay 结合使用。

检测缓冲液：确保为实验准备足够的检测缓冲液。将胎牛血清（FBS）在 4°C 过夜解冻，或在 37°C 水浴中解冻，但要避免过度加热。为了制备 50ml 检测缓冲液，向 45ml RPMI 1640 培养基中加入 5ml FBS，得到 90% RPMI 1640/10% FBS（参见第 8.A 节）。充分混合后，于使用前将其预热至 37°C。参考而言，50ml 检测缓冲液通常足够用于 96 孔板 120 个孔（只使用内部 60 个孔）的实验。

测试样品和参考样品：按照图 10 和图 11 所示，准备测试样品和参考样品的起始稀释液（标记为 稀释 1，3X 最终浓度）。使用检测缓冲液作为稀释剂，在 1.5ml 离心管中分别制备 360 μ l 参考样品起始稀释液以及每个测试样品的 180 μ l 起始稀释液。在进行系列稀释之前，正确存储含有起始稀释液的离心管。

5.D. 制备系列稀释液

在检测当日制备系列稀释液。

这里描述的说明是用于为单一样品制备一套四倍系列稀释储备液，以进行一式三份的重复分析（135 μ l 的每个稀释度的储备液提供了进行三复孔分析的足够体积）。或者，您可以准备三套独立的连续稀释系列以生成三个重复样品。要制备四倍系列稀释，您需要 360 μ l 的参考样品，其浓度为剂量 - 响应曲线最高浓度的三倍。对于每个测试样品，您需要准备 180 μ l 的每个测试样品，其浓度为对应剂量反应曲线最高浓度的 3 倍。对于其他稀释方案，请相应调整体积。

注：若使用重组人 IL-15 作为参考样品（PeproTech IL-15, Cat.# 200-15）进行 IL-15 刺激，我们建议从 3 μ g/ml（3x 最终浓度）开始，并进行四倍连续稀释。当使用其他来源的 IL-15 作为参考样品时，起始浓度可能需要调整。

1. 将 180 μ l 参考样品起始稀释液（稀释 1, 3 倍终浓度）分别添加到透明无菌 96 孔板的 A11 和 B11 孔中（参见图 11）。
2. 分别将 180 μ l 测试样品 1 和 2 的起始稀释液（稀释 1, 3 倍终浓度）添加到 C11 和 D11 孔中。
3. 向这四个行中的其它孔（从第 10 列到第 2 列）中加入 135 μ l 检测缓冲液。
4. 从第 11 列转移 45 μ l 样品起始稀释液至第 10 列，并通过移液器充分混合。避免产生气泡。
5. 从右至左重复进行等量的四倍系列稀释，直到达到第 3 列。从第 3 列移除 45 μ l，以确保所有孔的体积为 135 μ l。不要将稀释液加入第 2 列。
6. 用盖子盖住板子，放在一旁备用。

推荐的单样品储备液制备样品系列稀释的板布局													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		无药对照	稀释 9	稀释 8	稀释 7	稀释 6	稀释 5	稀释 4	稀释 3	稀释 2	稀释 1		参照样本
B		无药对照	稀释 9	稀释 8	稀释 7	稀释 6	稀释 5	稀释 4	稀释 3	稀释 2	稀释 1		参照样本
C		无药对照	稀释 9	稀释 8	稀释 7	稀释 6	稀释 5	稀释 4	稀释 3	稀释 2	稀释 1		测试样本 1
D		无药对照	稀释 9	稀释 8	稀释 7	稀释 6	稀释 5	稀释 4	稀释 3	稀释 2	稀释 1		测试样本 2
E													
F													
G													
H													

图 11. 显示参考样本和测试样本连续稀释的示例板布局。A2、B2、C2 和 D2 孔中包含 135µl 不含样本的检测缓冲液作为阴性对照。

5.E. IL-15 刺激实验

1. 使用多通道移液器，根据图 10 所示的板布局，将每个样品 25µl 分装到 50µl 预先放置的细胞中。
2. 为每个检测板加盖，并在湿度控制的 37°C、5% CO₂ 孵箱中孵育 6 小时。
3. 经过 6 小时孵育后，继续执行 5.F 部分的操作。

5.F. Bio-Glo-NL™ 试剂的制备和添加

我们建议在使用前即刻制备 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay Reagent。确保在重构试剂前，Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay Buffer 已调整至室温（不超过 25°C）。不要储存重构后的试剂。一旦重构，Bio-Glo-NL™ 试剂在室温下大约 8 小时内将损失 10% 的活性。

1. 从 -30°C 至 -10°C 的储存环境中取出 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay Substrate。如果底物集中在管盖或管壁上，请短暂离心试管。
 2. 通过将底物与缓冲液按 1:50 的比例混合，制备所需量的重构 Bio-Glo-NL™ 试剂。例如，如果实验需要 10ml 试剂，则在 10ml 缓冲液中加入 200μl 底物。10ml Bio-Glo-NL™ 试剂足以用于 120 个孔（两张检测板，每张板使用内部 60 个孔）。
 3. 从孵箱中取出检测板，取下板盖，并在室温下平衡 15 分钟。
 4. 使用多通道移液器，小心不要产生气泡的情况下，向检测板内部的 60 个孔中各加入 75μl Bio-Glo-NL™ 试剂。
 5. 向每张检测板的 B1、C1 和 D1 孔中加入 75μl Bio-Glo-NL™ 试剂，以测定背景信号。
 6. 在室温下孵育 5 至 10 分钟。
- 注：** 改变孵育时间将影响原始 RLU 值，但不应显著改变 EC₅₀ 值和诱导倍数。
7. 使用光度计或发光板读数器测量发光强度。

5.G. 数据分析

1. 通过计算来自 B1、C1 和 D1 孔的平均相对光单位（RLU）来测量板背景。
2. 计算诱导倍数：

$$\text{诱导倍数} = \frac{\text{RLU}_{\text{样本}} - \text{RLU}_{\text{背景}}}{\text{RLU}_{\text{无药对照}} - \text{RLU}_{\text{背景}}}$$

注： 在计算诱导倍数时，如果无药对照样本的 RLU 值至少比板背景 RLU 值高 100 倍，则无需从样本 RLU 中减去板背景 RLU。

3. 将数据绘制成 RLU 对 Log₁₀[样本] 和诱导倍数对 Log₁₀[样本] 的曲线。使用合适的曲线拟合软件（例如 GraphPad Prism®）拟合曲线并确定响应的 EC₅₀ 值。

6. 疑难排查

针对此处未提及的问题，请联系您当地的 Promega 分公司或分销商获取帮助。联系方式可在 www.promega.com 网站获取，或者发送电子邮件至 chinatechserv@promega.com

问题	原因和参考建议
低发光强度（RLU 读数）测量	选择专用发光检测仪。主要设计用于荧光检测的仪器不推荐使用。发光仪测量并报告的是相对发光值，不同仪器的实际 RLU 数值会有差异。若使用的读数器具有可调节增益功能，建议采用高增益设置。
	每个孔内细胞数量不足可能导致 RLU 读数偏低。请按照操作指导要求正确处理和分装细胞，确保每个孔内有足够数量的活细胞。
	细胞活力低下会导致低的发光读数以及检测性能的不稳定。
	Bio-Glo-NL™ 试剂活性较低会导致 RLU 读数偏低。请按照说明书正确存储和处理 Bio-Glo-NL™ 试剂。
	确认正在使用专为 NanoLuc® 萤光素酶报告基因生物测定设计的 Bio-Glo-NL™ 试剂。IL-2Rβγ Bioassay 生物测定细胞与专为萤火虫萤光素酶报告基因生物测定设计的 Bio-Glo™ 试剂不兼容。
检测性能变异	确保各次检测之间的孵育时间保持一致。
	确保严格遵循 2 天或 3 天培养期的预培养操作流程。
	对于每次检测，应在检测前以相同方式对待细胞。细胞生长速率和预培养接种密度的变化会导致检测结果的变异性。
	确保以一致的方式计数细胞。
弱检测反应（低诱导倍数）	确保铺板的细胞初始活力大于 90%。
	如果未经处理的对照组 RLU 值仅比平板读数器背景 RLU 值高出不到 100 倍，在计算诱导倍数之前，应先从所有样本中减去平板读数器背景 RLU 值。

7. 参考文献

- Hernandez, R. *et al.* (2022) Engineering IL-2 for immunotherapy of autoimmunity and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 614–28.
- Harris, K.E. *et al.* (2021) A bispecific antibody agonist of the IL-2 heterodimeric receptor preferentially promotes in vivo expansion of CD8 and NK cells. *Sci. Rep.* **11**, 10592.
- Castillo, E.F. and Schluns, K.S. (2012) Regulating the immune system via IL-15 transpresentation. *Cytokine* **59**, 479–90.
- Stonier, S.W. and Schluns, K.S. (2010) Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol. Lett.* **127**, 85–92.
- Bergamaschi, C. *et al.* (2012) Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15R α in human and mouse serum. *Blood* **120**, e1–8.
- Giri, J.G. *et al.* (1994) Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* **13**, 2822–30.

8. 附录

8.A. 缓冲液和溶液组成

解冻培养基

90% RPMI 1640
10% 胎牛血清

在 10 天内制备和使用。储存在 4°C。

生长培养基

90% RPMI 1640
4 μ g/ml 链霉素硫酸盐
550 μ g/ml 潮霉素 B
10% 胎牛血清

在 10 天内制备和使用。储存在 4°C。

冷冻培养基

70% RPMI 1640
20% 胎牛血清
10% DMSO

制备后在使用期间保持在 4°C。

检测缓冲液

90% RPMI 1640
10% 胎牛血清

在 5 天内制备和使用。储存在 4°C。

8.B. 相关产品

Fc Effector Bioassays

产品	规格	目录号
ADCC Reporter Bioassay, Complete Kit (Raji)*	1 each	G7015
ADCC Reporter Bioassay, Core Kit*	1 each	G7010
ADCC Reporter Bioassay, F Variant, Core Kit**	1 each	G9790
ADCC Reporter Bioassay, Target Kit (Raji)*	1 each	G7016
FcγRIIa-H ADCP Reporter Bioassay, Complete Kit**	1 each	G9901
FcγRIIa-H ADCP Reporter Bioassay, Core Kit**	1 each	G9991
Mouse FcγRIV ADCC Bioassay, Complete Kit	1 each	M1201
Mouse FcγRIV ADCC Bioassay, Core Kit	1 each	M1211
Membrane TNFα Target Cells**	1 each	J3331
Membrane RANKL Target Cells**	1 each	J3381

* 仅限科研用途，不得用于诊断过程

** 不得用于医学诊断。

其他试剂盒规格可供选择。

Fc Effector Immunoassay

产品	规格	目录号
Lumit™ FcRn Binding Immunoassay	100 assays	W1151

不得用于医学诊断。其他试剂盒规格可供选择。

Immune Checkpoint Bioassays

产品	规格	目录号
4-1BB Bioassay	1 each	JA2351
CD28 Bioassay	1 each	JA6702
CD28 Blockade Bioassay	1 each	JA6101
CD40 Bioassay	1 each	JA2151
CTLA-4 Blockade Bioassay	1 each	JA3001
GITR Bioassay	1 each	JA2291
ICOS Bioassay	1 each	JA6801
ICOS Blockade Bioassay	1 each	JA6001
LAG-3/MHCII Blockade Bioassay	1 each	JA1111
OX40 Bioassay	1 each	JA2191
PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay	1 each	J2015
PD-1+TIGIT Combination Bioassay	1 each	J2211
PD-L1 Negative Cells	1 each	J1191
TIGIT/CD155 Blockade Bioassay	1 each	J2201

不得用于医学诊断。其他试剂盒规格可供选择。

Macrophage-Directed Bioassays

产品	规格	目录号
SIRP α /CD47 Blockade Bioassay	1 each	JA6011
SIRP α /CD47 Blockade Bioassay, Fc-Dependent	1 each	JA4801
TLR Bioassay	1 each	JA9011
ADCP Reporter Bioassay (THP-1)	1 each	JA9411

不得用于医学诊断。其他试剂盒规格可供选择。

8.B. 相关产品（续）

T Cell Activation Bioassays

产品	规格	目录号
T Cell Activation Bioassay (IL-2)	1 each	G7015
T Cell Activation Bioassay (NFAT)	1 each	G7010
T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO, CD4+)	1 each	G9790
T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO, CD8+)	1 each	G7016
T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO, CD4+, CD8+)	1 each	G9901

不得用于医学诊断。其他试剂盒规格可供选择。

Cytokine and Growth Factor Bioassays

产品	规格	目录号
IL-2 Bioassay	1 each	JA2201
IL-6 Bioassay	1 each	JA2501
IL-12 Bioassay	1 each	JA2601
IL-15 Bioassay	1 each	JA2011
IL-23 Bioassay	1 each	JA2511
RANKL Bioassay	1 each	JA2701
VEGF Bioassay	1 each	GA2001

不得用于医学诊断。其他试剂盒规格可供选择。

Control Antibodies and Proteins

产品	规格	目录号
Control Ab, Anti-4-1BB	1 each	G7015
Control Ab, Anti-CD20	1 each	G7010
Control Ab, Anti-CD40	1 each	G9790
Control Ab, Anti-CTLA-4	1 each	G7016
Control Ab, Anti-LAG-3	1 each	G9901
Control Ab, Anti-OX40		
Control Ab, Anti-PD-1		
Control Ab, Anti-SIRP α		
Control Ab, Anti-TIM-3		
Recombinant VEGF ligand		

不得用于医学诊断。其他试剂盒规格可供选择。

Detection Reagents

产品	规格	目录号
Bio-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	G7941
	100ml	G7940
Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay System	10ml	J3081
	100ml	J3082
	1000ml	J3083

不得用于医学诊断。其他试剂盒规格可供选择。

Luminometers

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

不得用于医学诊断。其他试剂盒规格可供选择。

注：还有其他 Fc 效应功能、免疫检查点作用、T 细胞激活、细胞因子、巨噬细胞及靶细胞杀伤等生物活性检测可供选择。若要浏览和订购 Promega 公司的生物测定产品，请访问：www.promega.com/products/reporter-bioassays/，或通过电子邮件联系 EarlyAccess@promega.com。有关个性化生物测定开发和服务的更多信息，请访问 Promega 定制研发解决方案网站：www.promega.com/custom-solutions/tailored-solutions/

^(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-NL™ 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.

^(b)U.S. Pat. Nos. 8,557,970, 8,669,103, 9,777,311, 9,840,730, 9,951,373, 10,233,485, 10,633,690, 10,774,364, 10,844,422, 11,365,436, 11,661,623, 11,667,950;

European Pat. Nos. 2456864, 2635595, 2990478, 3181687, 3409764; Japanese Pat. Nos. 6038649, 6155424, 6227615, 6374420, 6539689; and other patents and patents pending.

^(c)Product cannot be used for proficiency testing.

© 2024 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GloMax is a registered trademarks of Promega Corporation. Bio-Glo and Bio-Glo-NL are trademarks of Promega Corporation.

GraphPad Prism is a registered trademark of GraphPad Software, Inc. JMP is a registered trademark of SAS Institute, Inc. Mr. Frosty is a registered trademark of Nalge Nunc International Corporation. Proleukin is a registered trademark of CLINIGEN HOLDINGS LIMITED. Styrofoam is a registered trademark of Dow Chemical Company.

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.