

中文说明书

T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO), Propagation Model

适用产品目录号: GA1162, GA1172, GA1182, GA1210,
GA1220 和 GA1230



T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO), 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. 产品描述	2
2. 产品组分和储存条件	9
3. 开始实验前.....	10
3. A. 用户需提供的材料.....	11
4. 准备 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞	12
4. A. 细胞解冻和原始细胞培养.....	12
4. B. 细胞维持与繁殖	13
4. C. 细胞冷冻和储存.....	13
5. TCR 质粒转染操作说明.....	14
5. A. 制备细胞复苏培养基、电穿孔缓冲液和 TCR 质粒.....	14
5. B. 使用 Nucleofector™ 2b Device 转染 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞.....	14
6. T Cell Activation Bioassay	15
6. A. 制备检测缓冲液、抗原肽和 Bio-Glo-NL™ Reagent	15
6. B. 孔板布局设计.....	17
6. C. 铺板 MHCII APC 细胞	17
6. D. 制备肽的连续稀释液.....	18
6. E. 制备和铺板 TCR $\alpha\beta$ -KO Cells	18
6. F. 制备和添加 Bio-Glo-NL™ Reagent.....	19
6. G. 数据分析	19
7. 疑难解答	20
8. 参考文献	21
9. 附录	22
9. A. 代表性检测结果	22
9. B. 缓冲液和溶液组成	25
9. C. 相关产品.....	26

1. 产品描述

过继性 T 细胞免疫治疗是一种重要的癌症治疗策略，该方法通过基因改造在 T 细胞中引入抗原受体，使其具有肿瘤特异性，从而提高它们识别和破坏肿瘤的能力。过继性 T 细胞免疫治疗可分为 T 细胞受体改造的 T 细胞 (TCR-T) 治疗和嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 治疗两种类型。CAR-T 疗法特点是表达 CAR 的改造 T 细胞，CAR 由与抗体域融合的 T 细胞信号域组成。该抗体域对肿瘤抗原具有特异性，与之结合将诱导 T 细胞活化。CAR-T 疗法对血液系统恶性肿瘤的临床疗效已得到证实，并且数种 CAR-T 产品已批准用于临床 (1)。

TCR-T 疗法的特点是同种异体或（通常）自体 T 细胞表达改造后的转基因 TCR。TCR 已经进化到可以对相对低水平的抗原做出有效反应，并且 TCR 可以通过主要组织相容性复合体 (MHC) 系统识别几乎所有蛋白质，这使得 TCR 对改造后的自身（肿瘤相关）或病原体来源抗原非常敏感。

TCR 复合物由 TCR α 和 β 链与辅助信号分子（如 CD3）组成。个体 T 细胞通常表达一条 α 链和一条 β 链，源自细胞发育中 TCR 基因座的体细胞基因重排。外源性 TCR α 和 β 链的引入导致混合 TCR 复合物的形成（例如来自内源性 TCR 的 α 链、来自外源性 TCR 的 β 链；2）。就其性质而言，混合的 $\alpha\beta$ TCR 对生成了抗原特异性改变的 TCR。此外，内源性和外源性 TCR 链的配对导致“首选”外源性 TCR 配对的表达下调，并降低对同源抗原的识别 (3,4)。

CD4 和 CD8 是与 MHC 上的非多态性区域结合的 T 细胞辅助受体，因此它们加强了低亲和力 TCR 或 TCR 对低水平抗原反应的信号传导及灵敏性。CD4 通常在辅助性和调节性 T 细胞上表达，结合存在于专职抗原呈递细胞 (APC) 上的第 II 类 MHC (MHCII)。相比之下，CD8 通常在细胞毒性 T 细胞上表达，并与所有体细胞都表达的第 I 类 MHC 结合。MHCII 通常提呈细胞外（如病原体来源的）抗原，而 MHCI 提呈细胞内（如自身（肿瘤）或病毒）抗原。

基于细胞的免疫疗法包括适应性 T 细胞疗法，该疗法作用原理为利用能够与靶细胞上抗原结合的转基因 TCR 修饰 T 细胞。转基因 TCR 的开发和利用需要进行功能性生物检测。目前使用的方法主要检测 TCR-MHC/肽的结合亲和能力，这不一定表明 TCR 可有效激活 T 细胞的能力 (5-7)。其它方法主要依赖于原代人类 T 细胞和功能终点检测，例如细胞增殖、激活诱导的生物标记物分析和细胞因子的产生。由于对供体 T 细胞的依赖、复杂的检测方案和不合格的检测试剂，这些检测方法既费力又不易重复。并且原代 T 细胞内源性表达的现有 TCR 也会混淆检测结果。

T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO)、Propagation Model^(a-h) (目录号 GA1162、GA1172、GA1182) 是一种基于生物发光报告基因细胞的检测试剂盒, 克服了现有检测试剂盒的局限性。它可用于检测转基因 TCR 构建体激活 T 细胞的效力, 并且不受内源性 TCR 表达的限制 (图 1 和 2)。该检测试剂盒由基因工程改造的 Jurkat T 细胞系组成, 其中内源性 TCR α 和 β 链由成簇的规则间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)-Cas9 敲除。这些细胞同时表达 TCR 通路依赖性启动子驱动的萤光素酶报告基因。

TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞为可扩增细胞模型 (cell propagation model, CPM) 形式, 其中包括可以解冻和繁殖的冷冻细胞, 并且可建库供长期使用。此外该检测试剂盒同样也以细胞库形式提供 (目录号 GA1210、GA1220、GA1230), 其中包括为计划增加 CPM 量的客户提供的更大量的 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞。我公司可单独提供 TCR Transfection Positive Control Kit, 其中包括编码 Positive Control TCR 的质粒、同源 Positive Control Peptide 和解冻即用 APC。

将 TCR α 和 β 链引入 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞可使细胞表面出现转基因 TCR 的表达 (图 2)。通过同源肽和 MHC 表达的 APC 激活表达转基因 TCR 的 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞, 可激活有效的 TCR 和激发启动子介导的发光 (图 2)。CD8⁺ 和 CD4⁺TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞能有效分析 MHC I- 和 MHC II- 限制肽 /TCRs (图 3)。此外, CD4⁺/CD8⁺ 双阳性 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞允许转基因 TCR 筛选, 而不会偏向于 CD4 或 CD8 的依赖性 (图 3)。可使用 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay System 和标准光度计 (如 GloMax® Discover System) 对生物发光信号进行量化检测 (相关产品请参见第 9.C 节)。

T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO) 可用于 TCR-T 的整个研发过程。TCR 亲和力和表面表达水平决定了 T 细胞反应程度的大小 (6,7)。TCR 链序列会影响 TCR 构建体的表面表达 (8)。因此关键点是凭实验验证 TCR 构建体的表达水平。可使用 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞进行比较不同 TCR 构建体表面表达水平的 TCR 表达研究 (图 4)。该生物检测试剂盒可对转基因 TCR 进行功能检测, 如抗原排序、特异性和安全性检测 (图 5)。此外可在 TCR 筛选和研发过程中检测 TCR 对 CD4 或 CD8 共表达的依赖性 (图 6)。

除 TCR-T 的研发之外, TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞还使许多需要检测特定抗原的方法更为便利。还可使用 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞开发表达转基因 TCR 的稳定报告细胞系, 可长期用于疫苗和免疫疗法的研发, 包括质量控制分析。我公司已成功研发稳定的转基因 TCR 表达报告细胞, 这些细胞来源于对病毒 (如 CMV、HPV、流感等) 或肿瘤 (如 Melan-A (MART-1) 抗原具有特异性的 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞。有关现有可用 TCR 表达细胞系和定制细胞系开发的更多信息, 请访问 www.promega.com/support/。

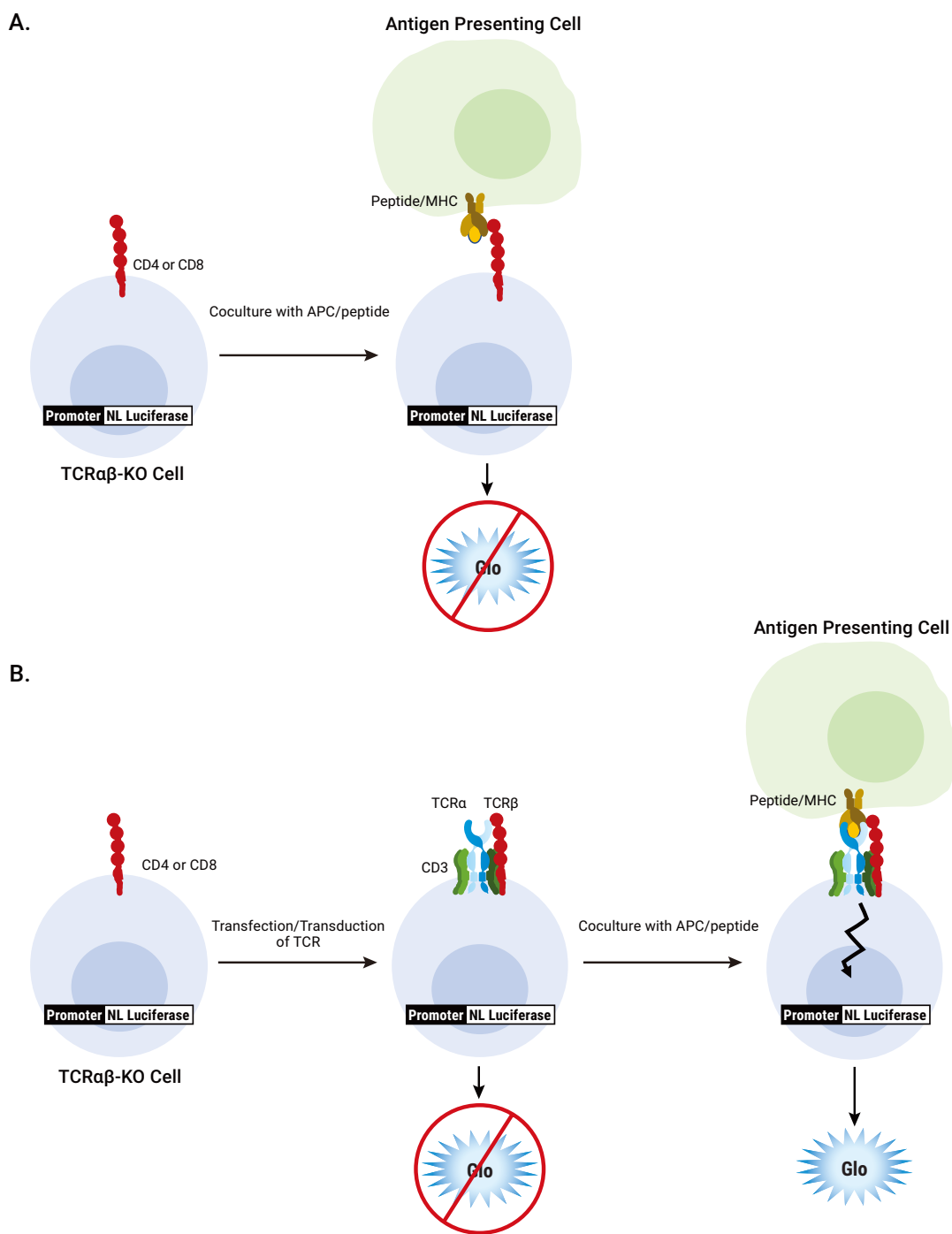


图 1.T 细胞活化生物检测试剂盒 (TCR $\alpha\beta$ -KO) 的说明图 A. 在不表达转基因 TCR 的情况下, TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞不会被肽或 MHC 激活, 从而导致较低的光输出。**图 B.** 通过转染或转导表达 TCR 的 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞由 APC 和同源抗原激活, 从而诱导 TCR 通路激发出发光信号。

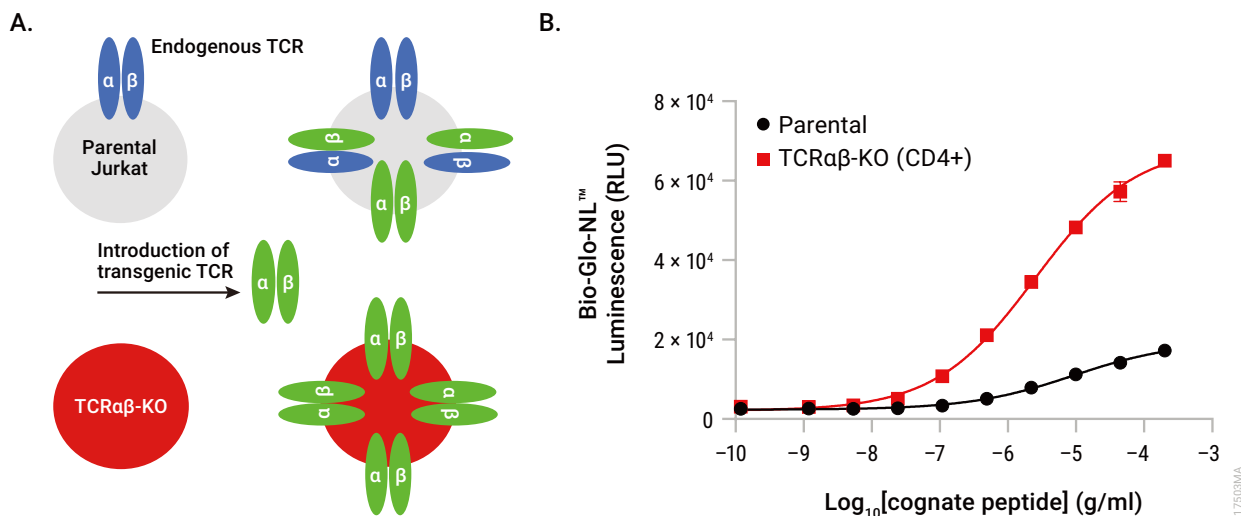


图 2. TCRαβ-KO Cells 与亲本 Jurkat 细胞 (带有内源性 TCR) 的对比 **图 A.** 将转基因 TCR 引入亲本 Jurkat 细胞和 TCRαβ-KO 细胞的示意图。将转基因 TCR 引入亲本 Jurkat 细胞会导致由内源性和转基因 TCRαβ 链混搭组成的 TCR 链的表达。由于缺乏内源性 TCR, TCRαβ-KO 细胞中的转基因 TCR 表达可导致单一类型的 TCRαβ 配对。**图 B.** **图 A** 中描述细胞的功能检测反应。将 TCR 转染的亲本 Jurkat 细胞 (内源性 CD4⁺)、TCRαβ-KO (CD4⁺) 细胞、HLA-DR-positive 细胞和浓度梯度的同源肽共同培养。细胞培养 6 小时后, 加入 Bio-Glo-NL™ Reagent 并使用 GloMax® Discover System 对发光信号进行定量检测。使用 GraphPad Prism® 软件将数据拟合为四参数逻辑曲线。EC₅₀ 值分别为 2.5 μg/mL 和 9.1 μg/mL, TCRαβ-KO (CD4⁺) 细胞和亲本 Jurkat 细胞的诱导倍数分别为 22 和 8。

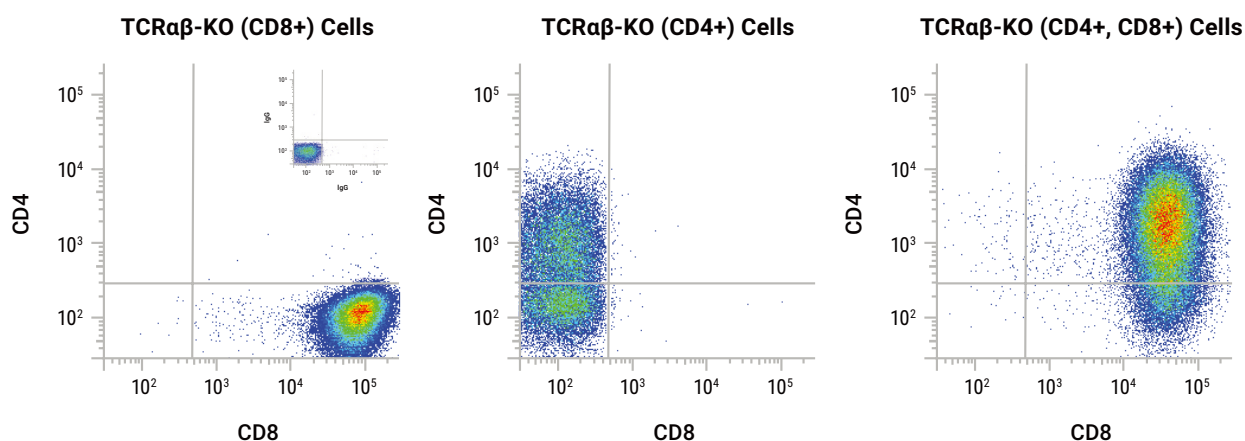


图 3. CD4 和 CD8 在 TCR $\alpha\beta$ -KO (CD8 $^+$)、TCR $\alpha\beta$ -KO (CD4 $^+$) 和 TCR $\alpha\beta$ -KO (CD4 $^+$, CD8 $^+$) 细胞上的表达。 将 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞用与 CD8 (x 轴, 克隆抗体 SK1) 和 CD4 (y 轴, 克隆抗体 OKT4) 结合的偶联抗体荧光染料进行标记, 并在 BD LSRFortessa™ X-20 流式细胞仪上进行分析。使用 FlowJo™ 软件进行数据分析。插图显示了同种型匹配的对照抗体。

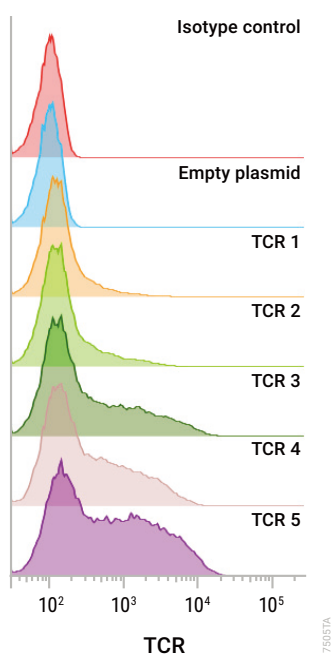


图 4. TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞的 TCR 表达 TCR $\alpha\beta$ -KO (CD8 $^+$) 细胞用空质粒或编码五个独立 TCR 的质粒进行瞬时转染。48 小时后, 在 BD LSRFortessa™ X-20 流式细胞仪上通过流式细胞仪 (抗 TCR 克隆抗体 IP26) 分析 TCR 表面表达。使用 FlowJo™ 软件进行数据分析。

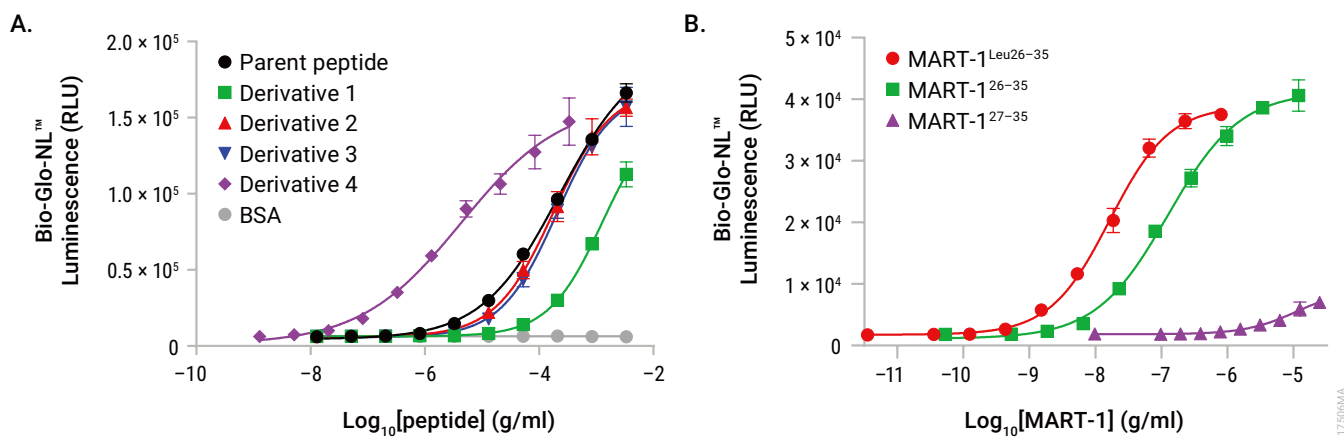
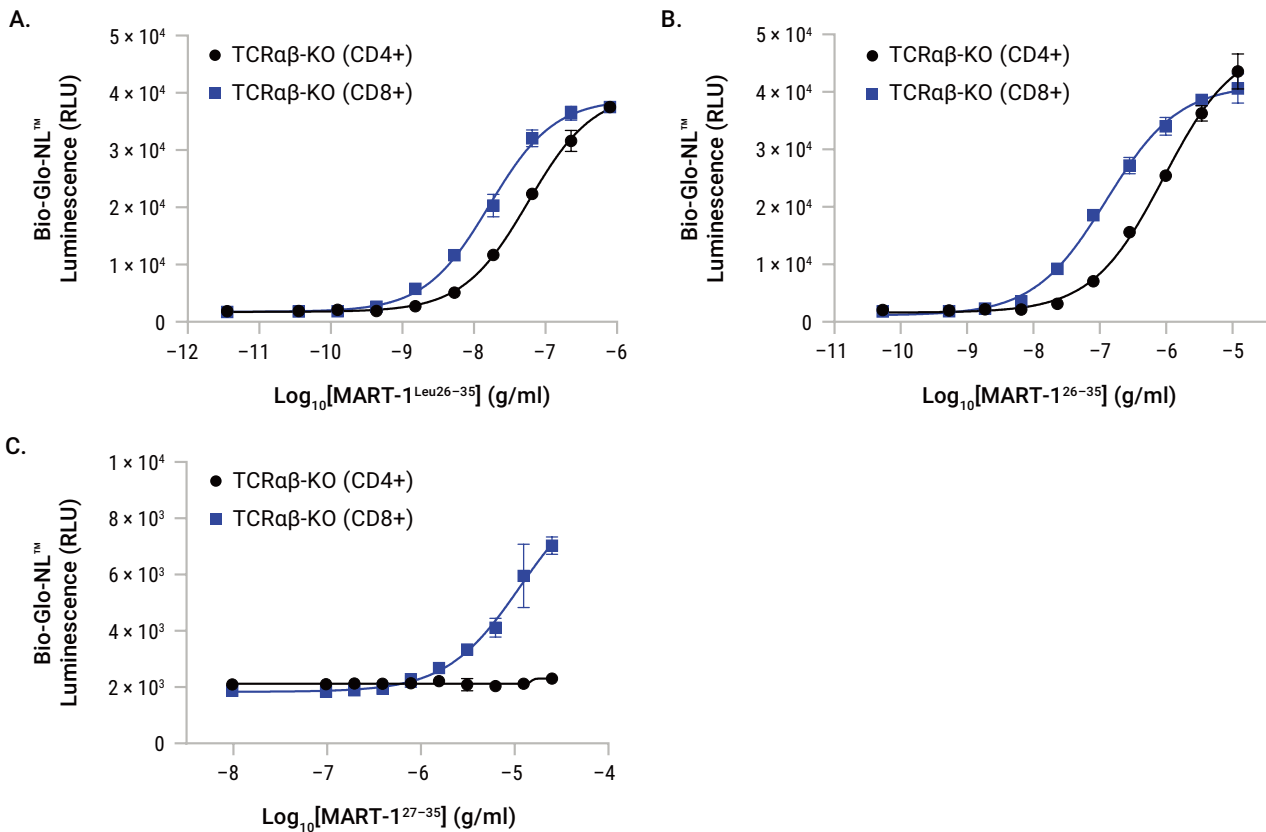


图 5. TCRαβ-KO 细胞可进行抗原肽效力排名及安全性分析。图 A. 将 TCRαβ-KO (CD4+) 细胞用 HA1.7 (HA³⁰⁷⁻³¹⁹ 特异性) TCR 瞬时转染。48 小时后, 将转染的细胞与 HLA-DR 阳性细胞共同培养, 并滴定 HA³⁰⁷⁻³¹⁹ (母体肽) 或有氨基酸取代的衍生肽, 如图所示。细胞培养 6 小时后, 加入 Bio-Glo-NL™ Reagent 并使用 GloMax® Discover System 对发光信号进行定量检测。使用 GraphPad Prism® 软件将数据拟合为四参数逻辑曲线。HA³⁰⁷⁻³¹⁹ 衍生物为多种多肽, 这些多肽包括 HA1.7TCR 的更有效(衍生物 4)和效力较低(衍生物 1)的激活剂。图 B. 将 TCRαβ-KO (CD8+) 细胞用 DMF5 (MART-1 特异性) TCR 瞬时转染。如图所示, 48 小时后将转染的细胞与 HLA-A2 阳性细胞共同培养并用 Melan-A (MART-1) 肽进行滴定。MART-1^{Leu26-35} 在其天然序列的第 2 位含有亮氨酸。细胞培养 6 小时后, 加入 Bio-Glo-NL™ Reagent 并使用 GloMax® Discover System 对发光信号进行定量检测。使用 GraphPad Prism® 软件将数据拟合为四参数逻辑曲线。MART-1^{Leu26-35} 和 MART-1²⁶⁻³⁵ 的 EC₅₀ 值分别为 16 ng/mL 和 130 ng/mL。



17507MA

图 6. DMF4 TCR 在 TCRαβ-KO 细胞中表现出 CD8 依赖性。将 TCRαβ-KO (CD4+) 细胞和 TCRαβ-KO (CD8+) 细胞用 CD8 依赖性 TCR DMF4 (MART-1 特异性) 瞬时转染。48 小时后将转染的细胞与 HLA-A2 阳性细胞共同培养并用三种独立的 Melan-A (MART-1) 肽进行滴定：MART-1^{Leu26-35} (图 A)、MART-1²⁶⁻³⁵ (图 B) 和 MART-1²⁷⁻³⁵ (图 C)。MART-1^{Leu26-35} 在其天然序列的第 2 位含有亮氨酸。细胞培养 6 小时后，加入 Bio-Glo-NL™ Reagent 并使用 GloMax® Discover System 对发光信号进行定量检测。使用 GraphPad Prism® 软件将数据拟合为四参数逻辑曲线。CD8 辅助受体的存在增强了 DMF4 TCR 激活 TCRαβ-KO 细胞的敏感性。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
T Cell Activation Bioassay (TCRαβ-KO, CD8+), Propagation Model	1 盒	GA1162

不得用于医学诊断。包括：

- 2 瓶 TCRαβ-KO (CD8+) (CPM), 1.0×10^7 个细胞 /mL (每瓶 1.0mL)

产品	规格	目录号
T Cell Activation Bioassay (TCRαβ-KO, CD4+), Propagation Model	1 盒	GA1172

不得用于医学诊断。包括：

- 2 瓶 TCRαβ-KO (CD4+)(CPM), 1.0×10^7 个细胞 /mL (每瓶 1.0mL)

产品	规格	目录号
T Cell Activation Bioassay (TCRαβ-KO, CD4+, CD8+), Propagation Model	1 盒	GA1182

不得用于医学诊断。包括：

- 2 瓶 TCRαβ-KO (CD4+ CD8+) (CPM), 1.0×10^7 个细胞 /mL (每瓶 1.0mL)

产品	规格	目录号
T Cell Activation Bioassay (TCRαβ-KO, CD8+), Cell Bank	1 盒	GA1220

不得用于医学诊断。包括：

- 50 瓶 TCRαβ-KO (CD8+), 1.0×10^7 个细胞 /mL (每瓶 1.0mL)

产品	规格	目录号
T Cell Activation Bioassay (TCRαβ-KO, CD4+), Cell Bank	1 盒	GA1210

不得用于医学诊断。包括：

- 50 瓶 TCRαβ-KO (CD4+), 1.0×10^7 个细胞 /mL (每瓶 1.0mL)

产品	规格	目录号
T Cell Activation Bioassay (TCRαβ-KO, CD4+, CD8+), Cell Bank	1 盒	GA1230

不得用于医学诊断。包括：

- 50 瓶 TCRαβ-KO (CD4+ CD8+), 1.0×10^7 个细胞 /mL (每瓶 1.0mL)

说明：使用繁殖模型（CPM）时，一瓶细胞可在用于检测之前解冻并扩增繁殖以创建冷冻细胞库。第二瓶应保留以备将来使用。

储存条件：送达后，立即将细胞冻存管转移至不高于 -140°C 的低温条件下（冷冻柜或气相液氮）进行长期保存。不得将细胞冻存管浸没于液氮中保存。不得将细胞冻存管置于在 -80°C 条件下保存，因为这会对细胞存活率和细胞性能造成不利影响。

3. 开始实验前

使用前，请仔细阅读完整检测方案以便熟悉产品组成和检测流程。

从装有细胞冻存管的盒子上取下产品标签，或记下标签上的目录号和批号。此信息可用于从网站下载指定产品的文件，例如分析证书。

! **说明：** T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO) 应使用 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay System (目录号 J3081、J3082、J3083) 进行检测。**请勿使用 Bio-Glo™ Luciferase Assay System.**

T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO), Propagation Model 可与用户提供的 TCR 构建体共同使用。TCR 可以通过转染或转导引入。此说明书提供了通过 Lonza Nucleofection 进行质粒转染的优化方法。并且我们已经成功地使用了可作为替代方法的电穿孔转染法。我们不建议用这些细胞系进行脂质转染。

我公司可单独提供 TCR Transfection Positive Control Kit，可通过 Promega Elite Access 方式购买。（若需更多信息请联系：eliteaccess@promega.com）该试剂盒包括一份 Positive Control TCR Plasmid、一份 Positive Control Peptide 和解冻即用型 APC。我们建议在前几次检测中将这些试剂作为阳性对照品，以熟悉该检测试剂盒的使用。使用这些试剂生成的数据显示在第 9.A 节中。

细胞解冻、繁殖和储存需完全按照第 4 节中的说明进行。细胞接种和繁殖密度已经过优化以确保稳定的细胞生长，通过稳定的细胞倍增率可反映这种情况并且以此使细胞达到最佳状态和一致性。常规细胞培养和最佳生物检测性能需要准确、可靠和可重复的细胞计数方法。

第 5 节和第 6 节中推荐的细胞接种密度、诱导时间和检测缓冲液成分是使用 TCR Transfection Positive Control Kit 建立的。您可能需要针对自己的 TCR 构建体和转染或转导方法，调整此处提供的参数并优化您自己的检测条件。

T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO) 可产生生物发光信号且需要灵敏的发光信号微孔板读数仪。此中文说明书中包含的生物检测试剂盒研发和性能数据由 GloMax® Discover System 生成（请参见第 9.C 节，相关产品）。每孔读数的整合时间为 0.5 秒。此生物检测试剂盒可与大多数其它发光检测仪兼容，但相对发光单位 (RLU) 读数会随每种仪器的灵敏度和设置而变化。如果使用增益可调的读数仪，我们建议使用高增益设置。不同仪器的使用和增益调整会影响原始数据的大小，但不应影响检测的 TCR 构建体的相对效力。

3.A. 用户需提供的材料

(缓冲液和溶液的组成请参见第 9.B 节)

试剂

- 由用户生成的 TCR 表达质粒或转导颗粒
- 用户定义的抗原蛋白 / 肽和 APC
- 含有 L- 谷氨酰胺和 HEPES 的 RPMI 1640 Medium (如 GIBCO™ 目录号 22400 105)
- 胎牛血清 (如 VWR 目录号 89510-194 或 HyClone 目录号 SH30071.03)
- 潮霉素 B (如 Invitrogen™ 目录号 10687010)
- 灭瘟素 S (如 GIBCO™ 目录号 A1113903) 用于 CD8+ 和 CD4+、CD8+ 细胞系
- 丙酮酸钠 (如 GIBCO™ 目录号 11360070)
- MEM 非必需氨基酸, 100X (如 GIBCO™ 目录号 11140050)
- DMSO (如 Sigma 目录号 D2650)
- 台盼蓝溶液 (如 Sigma, 目录号 T8154)
- Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay System (目录号 J3081、J3082、J3083)
- DPBS (如 GIBCO™, 目录号 14190250)
- **可选: TCR Transfection Positive Control Kit (电子邮件: eliteaccess@promega.com)**

耗材和仪器

- 纯白色、平底 96 孔检测板 (如 Corning® 目录号 3917)
- 用于制备抗原肽稀释液的无菌透明 V 型带盖 96 孔板, (如 Costar® 目录号 3896) 或稀释容器 (如 Dilux® 目录号 D-1003)
- 移液器 (单通道和 12 通道; 为获得最佳效果, 请根据需要使用手动和电动移液器)
- 15mL 和 50mL 无菌锥形管
- 无菌加样槽 (如 Corning® 目录号 4870)
- 37°C, 5% CO₂ 加湿培养箱
- 37°C 水浴
- 灵敏的具有辉光型发光检测功能的多孔板读数仪或发光检测仪 (如 GloMax® Discover System、目录号 GM3000 或类似系统)
- **可选: Nucleofector™ 2b Device (Lonza 目录号 AAB-1001)**

4. 准备 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞

进行相关操作时，包括使用个人防护设备（PPE）和生物危害性材料的废物处理，请遵循所在机构操作指南。

说明：细胞解冻、繁殖和储存说明适用于 TCR $\alpha\beta$ -KO (CD4+) 细胞、TCR $\alpha\beta$ -KO (CD8+) 细胞及 TCR $\alpha\beta$ -KO (CD4+、CD8+) 细胞。有关所需培养基的制备请参见第 9.B 节，缓冲液和溶液的组成。

4.A. 细胞解冻和原始细胞培养

1. 在预热至 37°C 的 22.5 mL RPMI 1640 培养基中加入 2.5 mL FBS，以制备 25 mL 原始细胞培养基。该原始细胞培养基是用于解冻后即时培养细胞。
2. 将 9 mL 已预热原始细胞培养基转移至无菌的 50 mL 锥形管中。
3. 从 -140°C 下的储存器中取出一瓶 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞，然后在 37°C 水浴中轻轻搅动（请勿倒置）解冻，直至恰好解冻（通常为 2-3 分钟）。
4. 将所有解冻的细胞（约 1 mL）转移至含 9 mL 预热原始细胞培养基的 50 mL 锥形管中。
5. 于 90 × g 的条件下离心 10 分钟。
6. 小心弃去培养基上清，并将细胞团块重悬于 15 mL 预热的原始细胞培养基中。
7. 将细胞悬液转移到 T75 组织培养瓶中，并将培养瓶水平放置在 37°C、5% CO₂ 的加湿培养箱中。
8. 在传代细胞前培养大约 48 小时。

4.B. 细胞维持与繁殖

对于从第二次细胞传代开始的细胞维持和繁殖，请使用含有抗生素的细胞生长培养基，并在繁殖过程中监测细胞活力和倍增率。细胞生长速度将在解冻后 7-10 天稳定下来，此时细胞活力通常 > 90%，平均细胞倍增率为 22-30 小时。每次细胞传代应记录传代数。根据我们的经验，如果按周一 - 周三 - 周五的时间表进行传代，细胞可以保持其功能长达 25 次传代或 54 次细胞倍增。

细胞传代时间表	细胞接种密度
2 天	4.0×10^5 cells/ml
3 天	2.5×10^5 cells/ml

1. 在细胞传代当天通过台盼蓝染色检测细胞活力和密度。
2. 如果以每两天传代（如周一至周三或周三至周五），接种细胞密度为 4×10^5 个 /mL，如果每三天传代（如周五至周一），则接种细胞密度为 2.5×10^5 个 /mL。始终保持培养瓶在培养箱中的水平位置。请勿使细胞密度增加超过 2×10^6 个 /mL。
3. 通过将新鲜细胞生长培养基添加到原始组织培养瓶中的细胞悬浮液或将细胞转移到新组织培养瓶中，同时保持培养体积与组织培养瓶表面积的比率一致，以此来维持细胞培养（如每个 T75 组织培养瓶 25 mL 体积或每个 T150 组织培养瓶 50 mL 体积）。
4. 将培养瓶置于 37 °C，5% CO₂ 的加湿培养箱中。

4.C. 细胞冷冻和储存

1. 细胞冻存当天，制备新鲜的细胞冷冻培养基，置于冰上保存。
2. 用移液器轻轻混合细胞，形成均匀的细胞悬液。
3. 取出细胞计数样品用于台盼蓝染色。根据所需的细胞冷冻密度 $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ 个 /mL 计算所需的细胞冷冻培养基体积。
4. 将细胞悬液转移到 50 mL 无菌锥形管或更大尺寸的离心管中，并以 $130 \times g$ 、4° C 离心 10 - 15 分钟。
5. 轻轻弃去培养基上清，注意不要搅动细胞沉淀。
6. 小心地将细胞沉淀重悬在冰冷的细胞冷冻培养基中，最终细胞密度为 $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ 个 /mL。将细胞悬液合并到一个管中并分配到冷冻管中。
7. 使用降温速度可控的冰箱（首选）或在 -80°C 冰箱中的 Mr. Frosty® 或 Styrofoam® 架冷冻细胞过夜。将冷冻管转移至 -140°C 或更低温度以进行长期储存。

5. TCR 质粒转染操作说明

该操作说明描述了使用 Lonza Nucleofector™ Platform 进行编码 TCR α 和 β 链的质粒转染反应，以及模拟（无质粒）转染对照反应。该操作说明应用范围可扩大，包括在不同的转染反应中对同一质粒或不同质粒的多次转染。

TCR Transfection Positive Control Kit 的质粒用作该操作流程的示例。其它转染或转导试剂和方案也有使用的可能性，但需要优化。

5.A. 制备细胞复苏培养基、电穿孔缓冲液和 TCR 质粒

- 细胞复苏培养基：**在转染当天，准备 20mL 细胞复苏培养基（90% RPMI 1640/10% FBS）。向两个 T25 培养瓶中分别转移 8mL 复苏培养基，并将这些培养瓶放入 37°C、5% CO₂ 的培养箱中。将剩余的细胞复苏培养基加热至 37°C 备用。
- 电穿孔缓冲液：**在转染当天，根据制造商的建议制备 Nucleofector™ Buffer V。在室温水浴中或在试验台上使其达到室温。
- TCR 质粒：**在转染当天，从 -20°C 的储存器中取出 TCR 质粒并在冰上解冻。

5.B. 使用 Nucleofector™ 2b Device 转染 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞

在维持 TCR $\alpha\beta$ -KO Cells 生长的时候，遵循推荐的细胞接种密度很重要。细胞培养体积或接种密度的变化会影响细胞生长速率和检测性能。仅使用在繁殖过程中倍增率稳定且细胞活力大于 90% 的细胞进行实验检测。

! 说明：请在无菌细胞培养罩中使用无菌技术执行以下步骤。

- 在进行转染前两天对细胞进行传代，操作方法如第 4.B 节所述。
- 通过台盼蓝染色计数 TCR $\alpha\beta$ -KO Cells 并计算细胞密度和活力。
- 将 1.2×10^7 TCR $\alpha\beta$ -KO Cells 转移到 15mL 锥形管中。
- 在环境温度下以 $130 \times g$ 离心 10 分钟来沉淀细胞，弃去培养基并将沉淀重悬在 10 mL DPBS 中进行洗涤。
- 在环境温度下以 $130 \times g$ 离心 10 分钟来沉淀细胞，弃去 DPBS 并将沉淀重悬在 200 μ L Nucleofector™ Buffer V 中。
- 向两个无菌微量离心管中分别加入 100 μ L 细胞。
- 将 10 μ L (20 μ g) Positive Control TCR Plasmid 添加到其中一根管中。通过上下移液充分混匀。模拟转染对照组细胞不会得到质粒。
- 将细胞转移到新的 2 mm 比色皿中。
- 使用程序 C-016 对 Nucleofector™ 2b Device 中的比色皿进行电穿孔转染。
- 向每个比色皿中加入 0.5mL 温热的细胞复苏培养基。使用无菌移液管，轻轻地将比色皿的全部内容物转移到含有 8mL 细胞复苏培养基的 T25 培养瓶中。
- 将 T25 培养瓶置于 37°C、5% CO₂ 的加湿培养箱中 48 小时。

6. T Cell Activation Bioassay

该检测试剂盒的使用流程介绍了检测通过同源肽和 APC 激活的模拟转染和 TCR 质粒转染的 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞的方法。示例流程中将来自 TCR Transfection Positive Control Kit 的 MHCII APC Cells 和 Positive Control Peptide 作为该检测方法的 APC 和抗原肽。也可以使用其它 APC 和蛋白质 / 肽抗原，但需要优化。

6.A. 制备检测缓冲液、抗原肽和 Bio-Glo-NL™ Reagent

1. **检测缓冲液**：在检测当天，需制备适量的检测缓冲液（99% RPMI 1640/1% FBS）。使用前充分混合并加热至 37°C。

2. **抗原肽**：使用检测缓冲液作为稀释剂，制备抗原肽的起始稀释液（dilution 1, 2X 终浓度）。

说明：将 Positive Control Peptide 在室温下解冻。通过将 1 μ L Positive Control Peptide 储备液 (2 mg/mL) 添加到 999 μ L 检测缓冲液中，制备 1 mL 2 μ g/mL 起始稀释液（dilution 1, 2X 最终浓度）。

3. **Bio-Glo-NL™ Reagent**：作为参考，10 mL Bio-Glo-NL™ Reagent 可满足分析 96 孔板的 120 个孔所需的量。将 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay Substrate 储存于 -20°C。在 6 小时的检测诱导过程中，在室温（不超过 25°C）下解冻 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay Buffer。建议在使用前制备新鲜的 Bio-Glo-NL™ Reagent。

! **说明**：T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO) 仅与 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay System（目录号 J3081、J3082、J3083）兼容。请勿使用 Bio-Glo™ Luciferase Assay System。

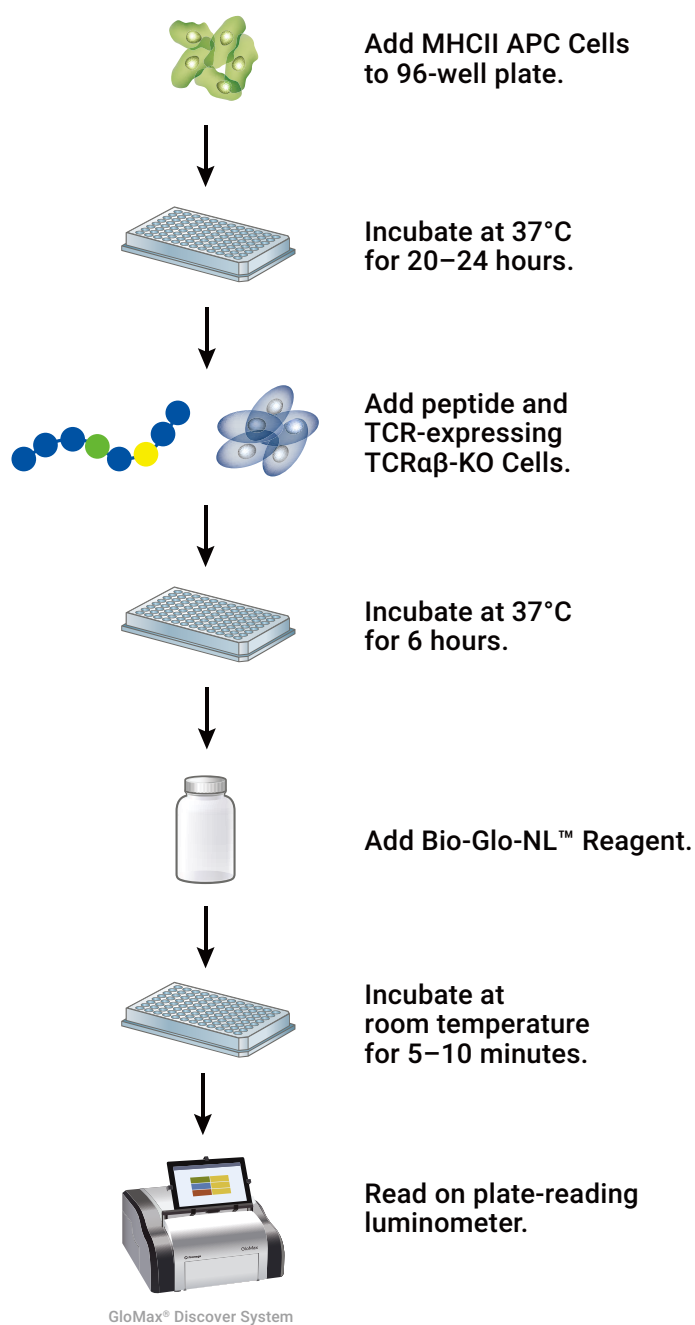


图 7.T Cell Activation Bioassay (TCRαβ-KO) 操作流程示意图。

6.B. 孔板布局设计

对于此处介绍的操作流程，请使用图 8 中所示的孔板布局作为指导。该操作流程介绍了 Positive Control Peptide 的连续复孔 (n = 3) 稀释，以生成模拟转染和 Positive Control TCR-transfected T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO) 细胞的十点剂量反应曲线。

推荐的孔板布局设计													
	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	无多肽	dilu9	dilu8	dilu7	dilu6	dilu5	dilu4	dilu3	dilu2	dilu1	B	模拟转染
C	B	无多肽	dilu9	dilu8	dilu7	dilu6	dilu5	dilu4	dilu3	dilu2	dilu1	B	TCR 转染
D	B	无多肽	dilu9	dilu8	dilu7	dilu6	dilu5	dilu4	dilu3	dilu2	dilu1	B	模拟转染
E	B	无多肽	dilu9	dilu8	dilu7	dilu6	dilu5	dilu4	dilu3	dilu2	dilu1	B	TCR 转染
F	B	无多肽	dilu9	dilu8	dilu7	dilu6	dilu5	dilu4	dilu3	dilu2	dilu1	B	模拟转染
G	B	无多肽	dilu9	dilu8	dilu7	dilu6	dilu5	dilu4	dilu3	dilu2	dilu1	B	TCR 转染
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	检测缓冲液 (B)

图 8. 显示模拟转染和 Positive Control TCR-transfected 细胞的非聚集样本位置的示例孔板布局，以及仅包含检测缓冲液（由“B”表示）的孔。

6.C. 铺板 MHCII APC 细胞

TCR Transfection Positive Control Kit 中包含的 MHCII APC 细胞以解冻即用形式提供，其中包括一瓶一次性使用的细胞以及 DMEM 和 FBS。瓶中有足够的细胞用于内部 60 孔格式的两个 96 孔检测板。可以使用其它 APC，包括贴壁和悬浮形式，但需要优化细胞数量和培养时间。

1. 在进行检测的前一天，在 50 mL 锥形管中将 1.5 mL FBS 加入 13 mL DMEM 中，制成 14.5 mL APC 铺板培养基（90% DMEM/10% FBS）。在 37°C 水浴中加热。
2. 从 -140°C 的储存器中取出一瓶 MHCII APC 细胞，然后用干冰转移到试验台上。在 37°C 水浴中加热细胞直至恰好解冻（约 2 分钟）。解冻时轻轻搅动并目视检查。
3. 通过移液器吹吸轻轻混匀细胞悬液，然后将细胞 (0.5 mL) 转移到含有 14.5 mL 预热 APC 铺板培养基的 50 mL 锥形管中。轻轻颠倒试管混匀。
4. 将细胞悬液转移到无菌加样槽中。使用多通道移液器，立即将 100 μ L 细胞悬液分配到 96 孔白色平底、组织培养处理过的检测板的内部 60 个孔中。
5. 将 100 μ L 预热 (37°C) DMEM 添加到检测板的每个外部孔中。
6. 用盖子盖住检测板，并将细胞在 37°C、5% CO₂ 的加湿培养箱中培养过夜（20-24 小时）。

6.D. 制备肽的连续稀释液

此处说明用于制备 Positive Control Peptide 的 3.5 倍连续稀释液，一式三份。对于其它稀释方案可相应地调整用量。

1. 在检测当天，需制备适量第 6.A 节指定的检测缓冲液。
2. 在一个无菌的稀释用容器中，将 700 μ L Positive Control Peptide 起始稀释液（dilu1，2X 最终浓度）添加到第 11 孔中（参见图 9）。
3. 将 500 μ L 检测缓冲液添加到从第 10 孔到第 2 孔中。
4. 将 200 μ L 的肽起始稀释液从第 11 孔转移到第 10 孔。通过移液器吹吸混匀。避免产生气泡。
5. 重复此过程，从右到左直到第 3 孔，制备得到等量 3.5 倍连续稀释液。请勿在第 2 孔中加入稀释物。
6. 在准备转染过的 T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO) Cells 时，用盖子盖住孔板并保持在环境温度 (22-25 $^{\circ}$ C)。

推荐的 Positive Control Peptide 稀释容器布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		无多肽	dilu9	dilu8	dilu7	dilu6	dilu5	dilu4	dilu3	dilu2	dilu1		Positive Control Peptide

图 9. 显示 Positive Control Peptide 连续稀释的布局示例。

6.E. 制备和铺板 TCR $\alpha\beta$ -KO Cells

1. 通过台盼蓝染色计数转染的 TCR $\alpha\beta$ -KO Cells 并计算细胞密度和活力。
2. 将细胞转移到锥形离心管中，并在环境温度下以 130 \times g 的速度沉淀细胞 10 分钟。
3. 去除培养基并将细胞重悬在检测缓冲液中，使最终细胞密度达到 1×10^6 个/ml。
4. 从培养箱中取出含有 MHCII APC 细胞的 96 孔检测板。在水槽上方的倒置检测板以去除培养基。然后将倒置的孔板放在纸巾上 5-10 秒，以排出每个孔中剩余的培养基。请勿使用真空吸引器移除培养基。
5. 将模拟转染和 TCR 转染的 TCR $\alpha\beta$ -KO Cells 转移到无菌加样槽中。使用多通道移液器，根据图 8 中的孔板布局将 40 μ L 适当的细胞添加到预铺板的 MHCII APC 细胞中。
6. 使用多通道移液器，向含有 MHCII APC 细胞和 TCR $\alpha\beta$ -KO 细胞的孔中加入 40 μ L Positive Control Peptide 稀释液（在第 6.D 节中制备）。
7. 将 80 μ L 检测缓冲液添加到检测板的每个外部孔中。
8. 用盖子盖住检测板，然后放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中 6 小时。

6.F. 制备和添加 Bio-Glo-NL™ Reagent

建议在使用前即时制备 Bio-Glo-NL™ Reagent。在配制重组试剂之前，确保 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay Buffer 平衡至室温（不超过 25°C）。不要储存配制好的试剂。重组后的试剂在室温下约 8 小时内将失去 10% 的活性。

! **说明：** T Cell Activation Bioassay (TCRαβ-KO) 仅与 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay System（目录号 J3081、J3082）兼容。请勿使用 Bio-Glo™ Luciferase Assay System。

1. 从 -20°C 储存器中取出 Bio-Glo-NL™ Luciferase Assay Substrate 并通过移液器吹吸混匀。如果底物附着在盖子中或管的侧面，则先对管进行短暂离心。
2. 将底物与缓冲液以 1: 50 的比例混合，制备所需量的重组 Bio-Glo-NL™ Reagent。例如，若试剂用量为 10 mL，那么则应取 200 μL 底物加入至 10 mL 缓冲液中。10 毫升（10 mL）Bio-Glo-NL™ Reagent 足以用于 120 个孔（两个检测板，使用每个板的内部 60 个孔）。
3. 混合培养时间结束后从培养箱中取出检测板，并在室温下平衡 10-15 分钟。
4. 使用手动多道移液器，将 80μL Bio-Glo-NL™ Reagent 添加到检测板的内部 60 孔中，注意不要产生气泡。
5. 将 80μL Bio-Glo-NL™ Reagent 添加到每个检测板的 B1、D1 和 F1 孔中以检测背景信号。
6. 等待 5-10 分钟，然后在 GloMax® Discover System 或具有辉光型发光信号读取功能的读数仪中检测发光信号。发光信号强度会逐渐衰减，室温下的信号半衰期约为 120 分钟。

说明： 改变 Bio-Glo-NL™ Reagent 孵育时间会影响原始相对光单位 (RLU) 值，但不应显著改变 EC₅₀ 值和最大诱导倍数。

6.G. 数据分析

1. 通过计算 B1、D1 和 F1 孔的平均 RLU 来确定孔板背景信号。

$$2. \text{ 计算诱导倍数} = \frac{\text{RLU (诱导组 - 背景组)}}{\text{RLU (无肽对照组 - 背景信号组)}}$$

3. 将数据绘制为 RLU 比 Log₁₀ [肽] 和诱导倍数比 Log₁₀ [肽]。使用适当的曲线拟合软件（例如 GraphPad Prism® 软件）拟合曲线并确定反应的 EC₅₀ 值。

7. 疑难解答

如果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。电子邮箱：chinatechserv@promega.com

问题	原因和参考建议
发光信号检测值较低（RLU 读数）	选择专为发光信号检测而设计的孔板读数仪器。不推荐使用主要用于荧光检测的仪器。光度计测量和报告的发光强度是一个相对值，实际 RLU 数会因仪器而异。应避免使用某些低灵敏度型号的光度计。如果使用增益可调的读数仪，我们建议使用高增益设置。
	每孔细胞不足会导致低 RLU 值。根据说明处理和铺板细胞，以确保每孔有足量活细胞。优化转染 / 转导方法以确保有足量活细胞用于检测
	低活性 Bio-Glo-NL™ Reagent 可导致低 RLU 值。按照说明储存和处理 Bio-Glo-NL™ Reagent。 请确保该检测中使用的是 Bio-Glo-NL™ Reagent。T Cell Activation Bioassay (TCRαβ-KO) 与 Bio-Glo™ Reagent 不能兼容。
检测反应弱（低诱导倍数）	优化抗原蛋白 / 肽的浓度范围，以实现达到完全上限和下限的剂量反应。在 T Cell Activation Bioassay (TCRαβ-KO) 中获得的 EC ₅₀ 值可能与使用其它方法（如基于原代 T 细胞的检测方法）获得的 EC ₅₀ 值不同。
	通过流式细胞仪确保转染的 TCR 构建体的表面表达。可以观察到因为 TCR 序列、质粒构建以及转染 / 转导方法而导致的表面 TCR 表达的差异。优化转染 / 转导方法和 TCR 质粒设计，以确保足够的 TCR 表面表达。
检测性能的可变性	细胞生长条件（包括细胞铺板、收获密度、细胞活力和细胞倍增时间）的变化会导致转染 / 转导效率和检测性能发生变化。尽可能避免一日细胞传代。一日传代后请勿转染细胞。使用高质量的细胞培养试剂（尤其是血清）和塑料器皿来维持细胞培养。严格按照说明处理细胞，确保细胞生长一致。
	细胞收获过程中细胞处理不当，包括离心时间长和离心速度快，会导致检测性能差和检测变化大。严格按照说明离心细胞。
	不适当的细胞冷冻 / DMSO 暴露会导致检测性能低和检测变异性高。严格按照说明冷冻细胞。
	需要稳定可靠的 TCR 基因转移方法（转染或转导）才能获得一致的检测性能。
	使用 CD4+ 或 CD8+ TCRαβ-KO Cells 得到的 EC ₅₀ 反应会有变化，具体取决于所检测的 TCR 构建体。
	不适当的细胞计数方法会导致培养和检测中细胞数量的变化，并导致检测结果变化较大。确保使用一致且准确的细胞计数方法。

8. 参考文献

1. United States Food and Drug Administration “Approved Cellular and Gene Therapy Products” web page: www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products (Internet; accessed April 2, 2021).
2. van Loenen, M.M. *et al.* (2010) Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 10972-7.
3. Ahmadi, M. *et al.* (2011) CD3 limits the efficacy of TCR gene therapy in vivo. *Blood* **118**, 3528-37.
4. Legut, M. *et al.* (2018) CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells. *Blood* **131**, 311-22.
5. Hebeisen, M. *et al.* (2013) Molecular insights for optimizing T cell receptor specificity against cancer. *Front. Immunol.* **4**, 154.
6. Zhong, S. *et al.* (2013) T-cell receptor affinity and avidity defines antitumor responses and autoimmunity in T-cell immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 6973-8.
7. Labrecque, N. *et al.* (2001) How much TCR does a T cell need? *Immunity* **15**, 71-82.
8. Thomas, S. *et al.* (2010) Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer. *Immunology* **129**, 170-7.

9. 附录

9.A. 代表性检测结果

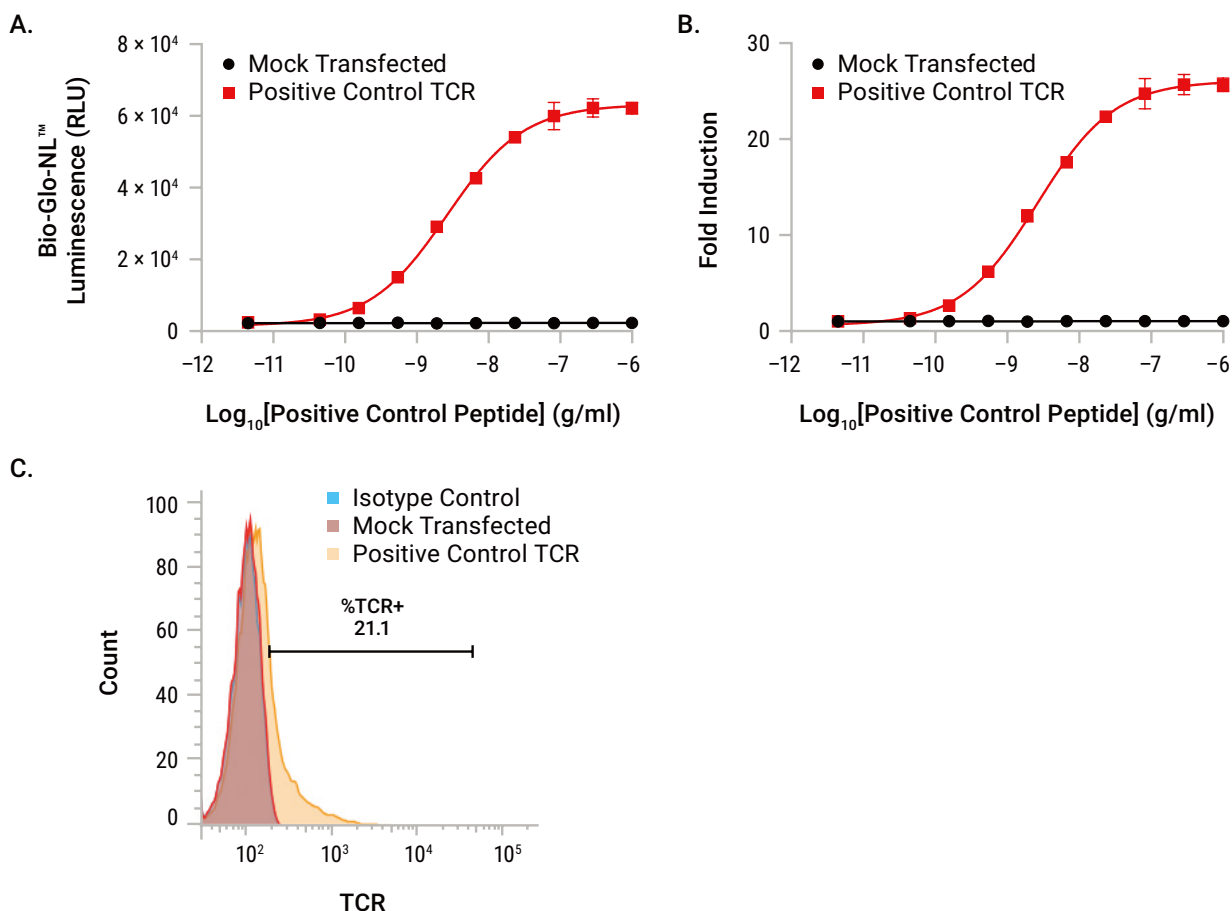
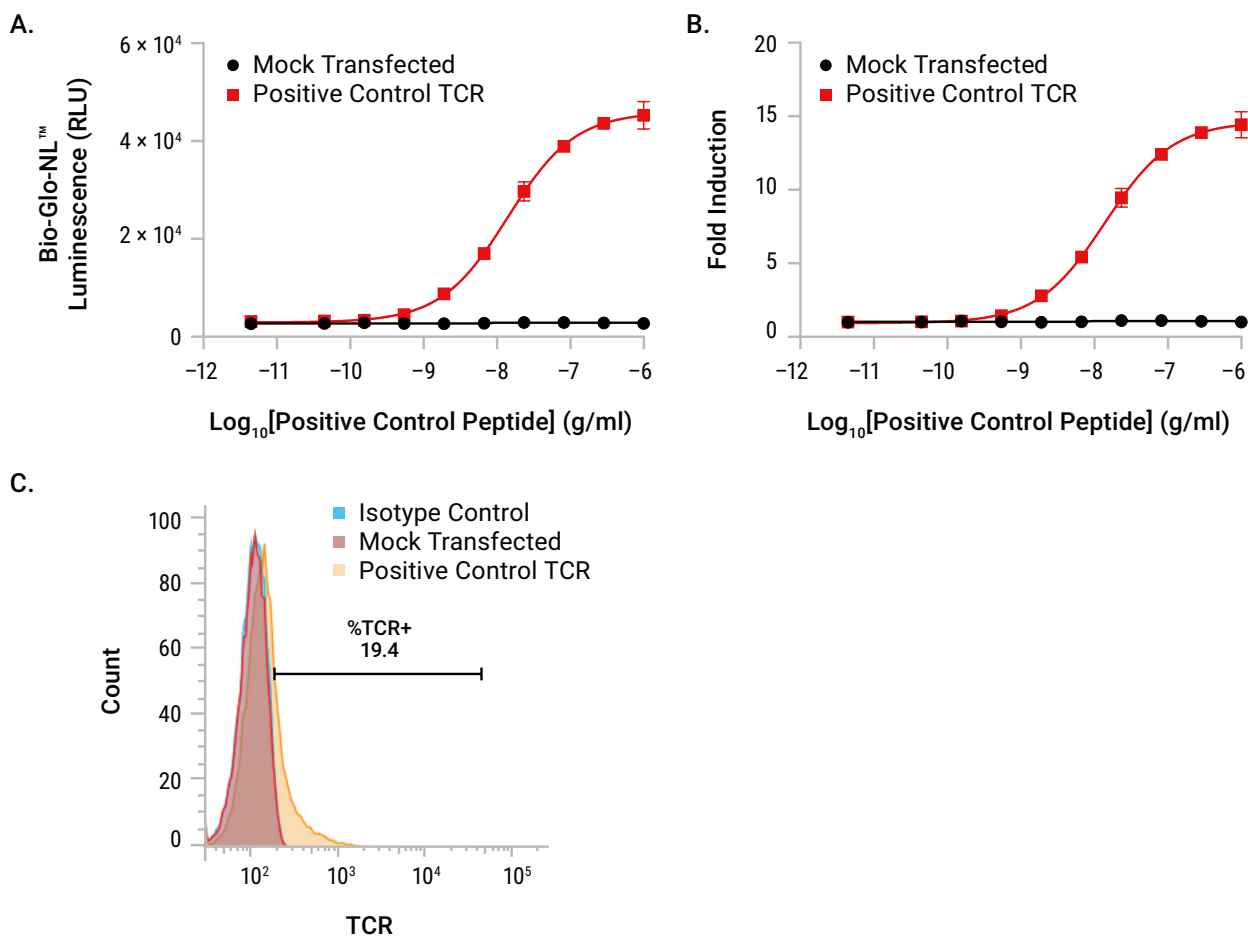
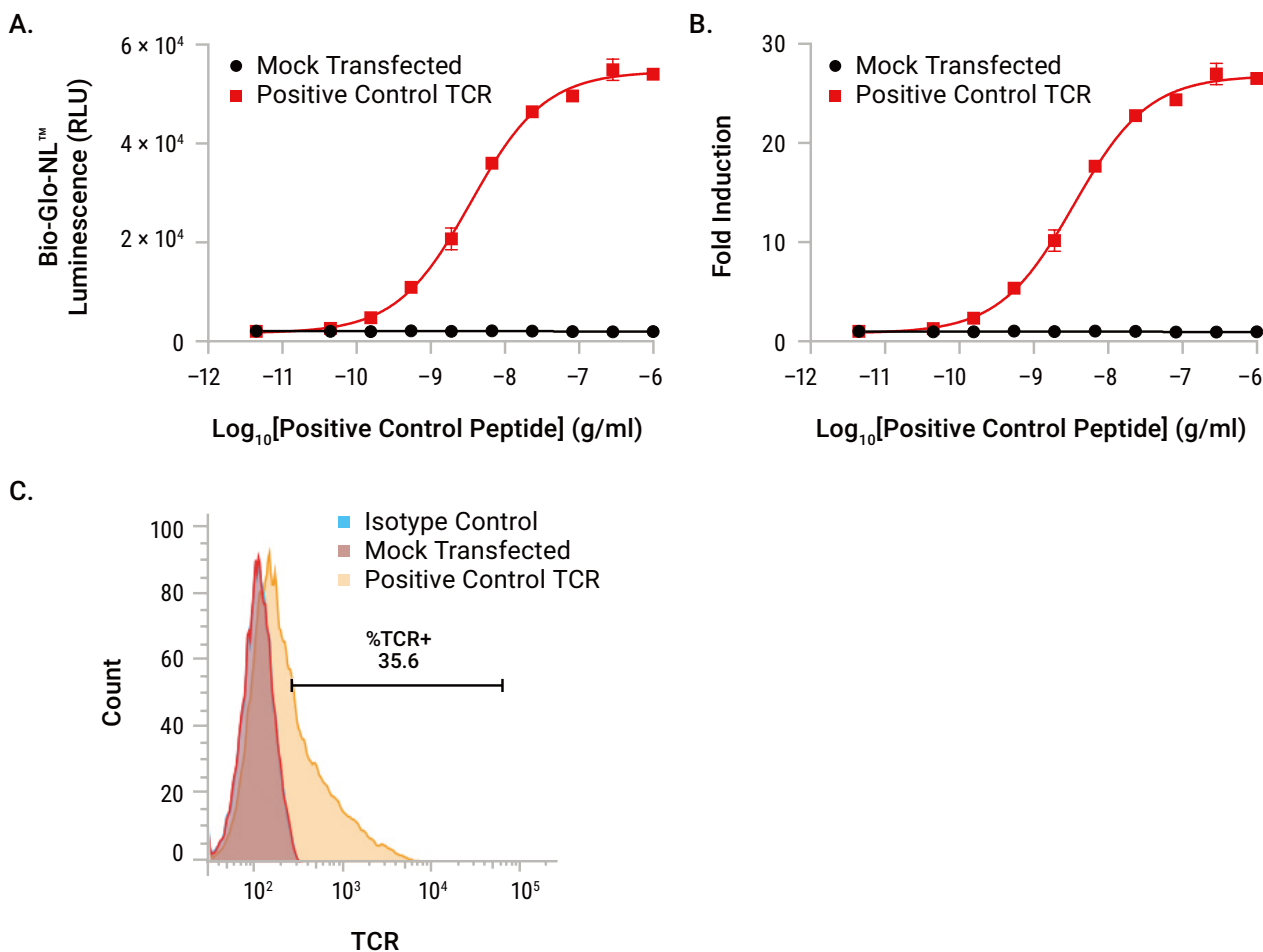


图 10. T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO, CD8+, 目录号 GA1162) 的代表性数据。 图 A 和图 B 使用 Lonza Nucleofector™ 2b Device 和 Positive Control TCR Plasmid (或模拟转染) 转染 TCR $\alpha\beta$ -KO (CD8+) Cells。转染 48 小时后, 将该细胞与 MHCII APC Cells 共同培养并滴定 Positive Control Peptide。在 37°C 下、细胞培养 6 小时后, 加入 Bio-Glo-NL™ Reagent 并使用 GloMax® Discover System 对发光信号进行检测。使用 GraphPad Prism® 软件将数据拟合为四参数逻辑曲线。对于 Positive Control TCR-transfected 细胞, EC₅₀ 为 2.6 ng/mL, 诱导倍数为 26。图 C. 表面 TCR 表达的流式细胞分析。TCR $\alpha\beta$ -KO (CD8+) 细胞被瞬时转染, 如图 A 中所述。转染 48 小时后, 用偶联荧光染料的抗 -TCR 抗体 (克隆 IP26) 标记细胞并在 BD LSRFortessa™ X-20 流式细胞仪上进行分析。使用 FlowJo™ 软件进行数据分析。



175107A

图 11. T Cell Activation Bioassay (TCR $\alpha\beta$ -KO, CD4+, 目录号 GA1172) 的代表性数据。图 A 和图 B 使用 Lonza Nucleofector™ 2b Device 和 Positive Control TCR Plasmid (或模拟转染) 转染 TCR $\alpha\beta$ -KO (CD4+) Cells。转染 48 小时后, 将该细胞与 MHCII APC Cells 共同培养并滴定 Positive Control Peptide。在 37°C 下、细胞培养 6 小时后, 加入 Bio-Glo-NL™ Reagent 并使用 GloMax® Discover System 对发光信号进行检测。使用 GraphPad Prism® 软件将数据拟合为四参数逻辑曲线。对于 Positive Control TCR-transfected 细胞, EC₅₀ 为 14 ng/mL, 诱导倍数为 15。图 C. 表面 TCR 表达的流式细胞分析。TCR $\alpha\beta$ -KO (CD4+) 细胞被瞬时转染, 如图 A 和 B 中所述。转染 48 小时后, 用偶联荧光染料的抗 -TCR 抗体 (克隆 IP26) 标记细胞并在 BD LSRFortessa™ X-20 流式细胞仪上进行分析。使用 FlowJo™ 软件进行数据分析。



17511TA

图 12. T Cell Activation Bioassay (TCRαβ-KO, CD4+ CD8+, 目录号 GA1182) 的代表性数据。 图 A 和图 B 使用 Lonza Nucleofector™ 2b Device 和 Positive Control TCR Plasmid (或模拟转染) 转染 TCRαβ-KO (CD4+, CD8+) Cells。转染 48 小时后, 将该细胞与 MHCII APC Cells 共同培养并滴定 Positive Control Peptide。在 37°C 下、细胞培养 6 小时后, 加入 Bio-Glo-NL™ Reagent 并使用 GloMax® Discover System 对发光信号进行检测。使用 GraphPad Prism® 软件将数据拟合为四参数逻辑曲线。对于 Positive Control TCR-transfected 细胞, EC₅₀ 为 3.5 ng/mL, 诱导倍数为 27。图 C. 表面 TCR 表达的流式细胞分析。TCRαβ-KO (CD4+, CD8+) 细胞被瞬时转染, 如图 A 和 B 中所述。转染 48 小时后, 用偶联荧光染料的抗-TCR 抗体 (克隆 IP26) 标记细胞并在 BD LSRFortessa™ X-20 流式细胞仪上进行分析。使用 FlowJo™ 软件进行数据分析。

9.B. 缓冲液和溶液组成

TCR $\alpha\beta$ -KO Cells 的原始细胞培养基

90%	RPMI 1640 (含 L- 谷氨酰胺和 HEPES)
10%	FBS

TCR $\alpha\beta$ -KO (CD4+) Cells 的细胞生长培养基

90%	RPMI 1640 (含 L- 谷氨酰胺和 HEPES)
10%	FBS
400 μ g/ml	潮霉素 B
1 mM	丙酮酸钠
0.1 mM	MEM 非必需氨基酸

TCR $\alpha\beta$ -KO Cells 的细胞冷冻培养基

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

TCR $\alpha\beta$ -KO (CD8+) Cells 及 TCR $\alpha\beta$ -KO (CD4+, CD8+) Cells 的细胞生长培养基

90%	RPMI 1640 (含 L- 谷氨酰胺和 HEPES)
10%	FBS
400 μ g/ml	潮霉素 B
1 mM	丙酮酸钠
0.1 mM	MEM 非必需氨基酸
10 μ g/ml	灭瘟素 S

检测缓冲液

99%	RPMI 1640 (含 L- 谷氨酰胺和 HEPES)
1%	FBS

9.C. 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
FcγRIIIa-H ADCP Reporter Bioassay, Complete Kit**	1 each	G9901
FcγRIIIa-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

*For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

**Not for Medical Diagnostic Use.

Additional kit formats are available.

Fc Effector Immunoassay

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

Not for Medical Diagnostic Use. Additional kit formats and sizes are available.

Immune Checkpoint Bioassays

产品	规格	目录号
4-1BB Bioassay	1 each	JA2351
CD28 Bioassay	1 each	JA6701
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	J1250
PD-1+TIGIT Combination Bioassay	1 each	J2211
PD-L1 Negative Cells	1 each	J1191
TIGIT/CD155 Blockade Bioassay	1 each	J2201

Not for Medical Diagnostic Use. Additional kit formats are available.

T Cell Activation Bioassays

产品	规格	目录号
T Cell Activation Bioassay (IL-2)	1 each	J1651
T Cell Activation Bioassay (NFAT)	1 each	J1621

Not for Medical Diagnostic Use. Additional kit formats are available.

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

Not for Medical Diagnostic Use. Additional kit formats are available.

Control Antibodies and Proteins

产品	规格	目录号
Control Ab, Anti-4-1BB	50µg	K1161
Control Ab, Anti-CD20	5 µg	GA1130
Control Ab, Anti-OX40	50µg	K1191
Control Ab, Anti-CD40	50µg	K1181
Control Ab, Anti-CTLA-4	100µg	JA1020
Control Ab, Anti-LAG-3	100µg	K1150
Control Ab, Anti-PD-1	100µg	J1201
Control Ab, Anti-TIGIT	100µg	J2051
Control Ab, Anti-TIM-3	100µg	K1210
Recombinant VEGF	10µg	J2371

Detection Reagent

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
	1,000ml	J3083

Not for Medical Diagnostic Use.

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

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Note: Additional Fc Effector, Immune Checkpoint, T Cell Activation and Cytokine Bioassays are available through Promega Elite Access. To view and order Promega Bioassay products visit: www.promega.com/products/reporter-bioassays / or email: eliteaccess@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 may genetically engineer the cell line using exogenous nucleic acid sequences provided by recipient. 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 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 REGARD TO THIS PRODUCT. The terms of this agreement shall be governed under the laws of the State of Wisconsin, USA.

^(b)Broad Limited License.

By purchase of this material, Promega Corporation ("Promega") conveys to purchaser (the "Limited Licensee") the non-transferable right to use the material purchased from Promega and derivatives made by Limited Licensee solely for research conducted by Limited Licensee in accordance with the following requirements: (i) Limited Licensee shall not sell or otherwise transfer material or derivatives to any other person or entity, or use material or derivatives to perform services for the benefit of any other person or entity, except to transfer the material or derivatives to a Limited Licensee affiliate provided such affiliate agrees to be bound by the terms of this Limited License; (ii) Limited Licensee shall use material and derivatives only for its internal research within the Customer Field, which may include internal research within the Customer Field in connection with product research, and not for any Commercial Purposes; (iii) Limited Licensee shall use material and derivatives in compliance with all applicable laws and regulations, including without limitation applicable human health and animal welfare laws and regulations; (iv) Institutions shall provide no warranties of any kind to Limited Licensee (statutory or implied) concerning the Intellectual Property or material or derivatives, including without limitation, as to product quality, condition, description, merchantability, fitness for a particular purpose, noninfringement of intellectual property rights or the absence of latent or other defects, and all such warranties are hereby expressly disclaimed; (v) Institutions shall expressly disclaim any warranty regarding results obtained through the use of material or derivatives, including without limitation any claim of inaccurate, invalid or incomplete results; (vi) Institutions and their directors, trustees, officers, employees, agents, faculty, affiliated investigators and students shall have no liability to Limited Licensee, including without limitation, for any loss of use or profits, business interruption or any consequential, incidental, special or other indirect damages of any kind, regardless of how caused and regardless of whether an action in contract, tort, strict product liability or otherwise; (vii) Limited Licensee shall indemnify, defend and hold harmless the Indemnitees and HHMI Indemnitees against any liability, damage, loss or expense (including without limitation reasonable attorneys' fees and expenses) incurred by or imposed upon any of the Indemnitees or HHMI Indemnitees, as applicable, in connection with any claims, suits, investigations, actions, demands or judgments arising out of or related to the exercise of any rights granted to Limited Licensee under this limited license or any breach of limited license by such Limited Licensee, provided that, to the extent the foregoing is not permitted by law, Limited Licensee agrees, to the extent permitted by law, that it, and not the Indemnitees or HHMI Indemnitees, as applicable, shall be responsible for any liability, damage, loss or expense arising out of or related to the exercise of any rights granted to Limited Licensee under this limited license or any breach of this limited license by Limited Licensee; and (viii) material and derivatives and their use may be the subject of one or more issued patents or pending patent applications owned by one or more Institutions, and the purchase of material does not convey a license under any claims in the foregoing patents or patent applications directed to the material or derivatives or use, production or commercialization thereof, except as expressly set forth in this limited license. Nothing in this limited license shall be construed to confer any rights upon Limited Licensee by implication, estoppel or otherwise as to any technology or patent rights of Broad or any other entity other than the Intellectual Property. In addition, nothing in this limited license shall be construed to confer upon Limited Licensee or any third party any rights under or to the Intellectual Property outside of the Customer Field.

Commercial Purposes means (a) the practice, performance or provision of any methods, process or service; or (b) the manufacture, production, sale, use, distribution, disposition or importing of any product, in each case (a) or (b) for consideration of any kind, for the purpose of sale or commercial exploitation, or on any other commercial basis.

Customer Field means use as a research tool for research purposes and use for quality control/quality assurance testing and product lot release assays, provided, however, that notwithstanding the foregoing, the Customer Field shall expressly exclude:

- 1) Any human or clinical use, including, without limitation, any administration into humans or any diagnostic or prognostic use;
- 2) Any human germline modification, including modifying the DNA of human embryos or human reproductive cells;
- 3) Any in vivo veterinary or livestock use;
- 4) The development, manufacture (including any bioproduction), distribution, importation, exportation, transportation, sale, offer for sale, marketing, promotion or other exploitation or use of the Intellectual Property or the material or derivatives as a therapeutic or diagnostic for humans or animals;
- 5) Products that provide nutritional benefits and are regulated by a regulatory authority as a drug or biologic pursuant to Section 505 of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act of 1938, as amended, Section 351 of the Public Health Service Act of 1944, as amended, or any successor laws, or equivalent laws or regulations in jurisdiction outside the United States;
- 6) Any agricultural use, including but not limited to, the use or application in the cultivation, growth, manufacture, exportation, or production of any tobacco product; and
- 7) Any use or application relating to gene drive.

HHMI Indemnitees means Howard Hughes Medical Institute and its trustees, officers, employees and agents.

Indemnitees means each Institution, their affiliates, and their current and former trustees, directors, officers, faculty, affiliated investigators, students, employees, medical and professional staff and agents and their respective successors, heirs and assigns.

Institutions means each of The Broad Institute, Inc., Massachusetts Institute of Technology, Harvard College, University of Iowa Research Foundation, University of Tokyo, The Rockefeller University, New York University, New York Genome Center, and Whitehead Institute of Biomedical Research collectively.

Intellectual Property means (a) any patents and patent applications listed on Appendix A; (b) any substitutions, divisions, continuations, reissues, renewals, re-examinations or extensions of any patents or patent applications of (a), any continuations-in-part of any patents or patent applications of (a) to the extent the claims are directed to subject matter specifically described in a patent or patent application set forth on Appendix A, and any application claiming priority to a provisional application set forth on Appendix A to the extent the claims are directed to subject matter specifically described in a provisional patent application set forth on Appendix A; (c) any letters patents and/or the equivalent issuing therefrom in any jurisdiction based on, and only to the extent of, any of the foregoing; and (d) any foreign or international equivalents of any of the foregoing, including without limitation any applications filed under the Patent Cooperation Treaty.

Appendix A: Broad IP List

BROAD TECHID	APPLICANTS	EXEMPLARY FAMILY SERIAL NO
BI-2011/008	Broad, MIT, Harvard and Rockefeller	PCT/US2013/074611; WO2014093595
BI-2011/008B	Broad, MIT and Harvard	14/259,420
BI-2011/008A	Broad and MIT	PCT/US2013/074743; WO2014093661
BI-2011/008C	Broad, MIT, and Harvard	PCT/US2013/074790; WO2014093694
BI-2011/020	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2013/051418; WO2014018423
BI-2012/084A	Broad and MIT	PCT/US2013/074825; WO2014093718
BI-2012/084B	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2013/074812; WO2014093709
BI-2013/003	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2013/074667; WO2014093622
BI-2013/003D	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2014/041803; WO2014201425
BI-2013/004E	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2013/074691; WO2014093635
BI-2013/004F	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2013/074736; Wo2014093655
BI-2013/004G	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2013/074819; WO2014093712
BI-2013/007	Broad, MIT and Harvard	14/855,046; US20160068822
BI-2013/066	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2014/041800; WO2014204724
BI-2013/073	Broad and MIT	PCT/US2014/041806; WO2014204727
BI-2013/085	Broad, MIT and Whitehead	15/141,348; US20160251648
BI-2013/087J	Broad, Editas*, Iowa and MIT	PCT/US2014/064663; WO2015070083
BI-2013/087M	Broad, Iowa and MIT	PCT/US2014/069902; WO2015089354
BI-2013/087V	Broad, Iowa and MIT	PCT/US2014/069897; WO2015089351
BI-2013/093	Broad, MIT and Tokyo	15/171,141; US20160340660
BI-2013/094	Broad, MIT and Rockefeller	PCT/US2014/070135; Wo2015089465
BI-2013/098	Broad and MIT	PCT/US2014/070068; WO2015089427
BI-2013/099	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2014/041804; WO2014204726
BI-2013/101	Broad and MIT	PCT/US2014/070127; WO2015089462
BI-2013/103	Broad and MIT	PCT/US2014/041808; WO201404728
BI-2013/105	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2014/041809; WO2014204729
BI-2013/107	Broad and MIT	PCT/US2014/070057; WO2015089419
BI-2013/112	Broad and MIT	PCT/US2013/074800; WO2014093701
BI-2013/113	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2014/070152; WO2015089473
BI-2014/005	Broad, MIT, Harvard and Tokyo	PCT/US2014/070175; WO2015089486
BI-2014/061	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2015/045504; WO2016028682
BI-2014/069	Broad and MIT	15/467,888; US20180010134
BI-2014/071	Broad and MIT	15/349,603; US20170107536
BI-2014/072	Broad and MIT	15/467,949; US20180044662
BI-2014/084	Broad, MIT and Harvard	15/469,081; US20180057810
BI-2014/097	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2015/067177; WO2016106244
BI-2014/100	Broad, MIT and Harvard	PCT/US2015/065385; WO2016094867
BI-2014/101	Broad, MIT and Harvard	15/632,067; US20170306335
BI-2014/103	Broad and MIT	PCT/US2015/067138; WO2016100974
BI-2014/106	Broad and MIT	PCT/US2015/065393; WO2016094872
BI-2014/107	Broad and MIT	15/619,735; US20170349894
BI-2014/108	Broad and MIT	15/619,737; US20170349914
BI-2014/113	Broad and MIT	15/640,103; US20180112255
BI-2015/002	Broad, MIT, Harvard and Tokyo	PCT/US2016/038252; WO2016205759
BI-2015/052	Broad and MIT	PCT/US2016/038034; WO2016205613
BI-2015/053	MIT	PCT/US2016/038205; WO2016205728
10086	Broad and MIT	PCT/US2017/047458; WO2018035387
10114	Broad and MIT	PCT/US2017/053795; WO2018064208
10125	Broad and MIT	62/502,064
62/564,102		
10209	Broad, Harvard, MIT, New York University and NY Genome Center	62/529,573

* Broad does not purport to grant any rights in the asterisked applicant's interest in these applications in this Agreement.

^(c) This Product and its use are the subject of one or more of the following patents and applications controlled by Sigma-Aldrich Co., LLC (SIGMA): Patent applications and issued patents that entered their respective National Stage from PCT International Pub. No. WO 2014/089290, including, but not limited to, the following, and substitutions, divisions, continuations, continuations-in-part, reissues, reexaminations, and extensions thereof: Australia Patent Nos. 2013355214; 2017204031; and 2018229489; Canada Patent No. 2,891,347; China Patent No. CN105142669; European Patent Nos. EP 3 138 910 B1, 3 138 911 B1, and EP 3 138 910 B1; Israel Patent No. IL238856; Singapore Patent No. 11201503824S; South Korea Patent No. 10-1844123; and U.S. Patent Application Serial Nos. 15/188,911; 15/188,924; 15/188,927; 15/188,931; and 15/456,204 (the "Patent Rights").

BEFORE OPENING OR USING THIS PRODUCT, PLEASE READ THE TERMS AND CONDITIONS SET FORTH IN THIS LICENSE AGREEMENT. YOUR USE OF THIS PRODUCT SHALL CONSTITUTE ACKNOWLEDGMENT AND ACCEPTANCE OF THESE TERMS AND CONDITIONS. If you do not agree to use this Product pursuant to the terms and conditions set out in this License Agreement, please contact Promega Corporation within ten (10) days of receipt to return the unused and unopened Product for a full refund, provided, however, that custom-made Products may not be returned for a refund.

The purchase of this Product conveys to you (the "Buyer") the NON-TRANSFERABLE right to use the Product for Licensed Research Use (see definition below) subject to the conditions set out in this License Agreement. If you wish to use this Product for any purpose other than Licensed Research Use, you must first obtain an appropriate license (see information set out below).

This Product may not be used for any purpose other than Licensed Research Use. Your right to use this Product for Licensed Research Use is subject to the following conditions and restrictions:

1. "Licensed Research Use" means any use for research purposes, with the following exceptions: (i) Buyer may not sell or otherwise transfer the Product (including without limitation any material that contains the Product in whole or part) or any Related Material to any other third party; (ii) Buyer may use the Product, components of the Product, and any Related Material, only for your internal research within the Field, and not for any Commercial Purposes (for any use of Product, components of a Product and any Related Material by any entity, including but not limited to contract service providers ("CRO") offering services for consideration, please contact Promega for additional information), and this License Agreement does not grant or in any way convey any rights to Buyer to further edit Products, components of Products or Related Materials under any claims in the foregoing patents and patent applications; (iii) Buyer shall use the Product and any Related Material in compliance with all applicable laws and regulations, including without limitation applicable human health and animal welfare laws and regulations; (iv) SIGMA shall provide no warranties of any kind to the Buyer (statutory or implied) concerning the Patent Rights, the Product or any Related Materials, including without limitation, as to product quality, condition, description, merchantability, fitness for a particular purpose, noninfringement of intellectual property rights or the absence of latent or other defects, and all such warranties are hereby expressly disclaimed; (v) SIGMA shall expressly disclaim any warranty regarding results obtained through the use of the Product or Related Materials, including without limitation any claim of inaccurate, invalid or incomplete results; (vi) SIGMA, and their directors, officers, employees and agents, shall have no liability to the Buyer, including, without limitation, for any loss of use or profits, business interruption or any consequential, incidental, special or other indirect damages of any kind, regardless of how caused and regardless of whether an action in contract, tort, strict product liability or otherwise; (vii) the Buyer shall indemnify, defend, and hold harmless SIGMA and their current and former directors, officers, employees and agents, and their respective successors, heirs and assigns (the "Indemnitees") against any liability, damage, loss, or expense (including without limitation reasonable attorneys' fees and expenses) incurred by or imposed upon any of the Indemnitees in connection with any claims, suits, investigations, actions, demands or judgments arising out of or related to the exercise of any rights granted to the Buyer hereunder or any breach of this License Agreement by such Buyer, provided that, to the extent the foregoing is not permitted by law, the Buyer agrees, to the extent permitted by law, that it, and not the Indemnitees shall be responsible for any liability, damage, loss or expense arising out of or related to the exercise of any rights granted to the Buyer under this License Agreement or any breach of this License Agreement by Buyer, and (viii) the Product and its creation and/or use may be the subject of one or more issued patents and/or pending patent applications owned by SIGMA and the purchase of the Product and its use as defined in this License Agreement does not convey to the Buyer any license under any claims in the foregoing patents or patent applications except for the limited rights as described in this License Agreement directed toward use of the Licensed Product or commercialization thereof.

2. For purposes of Section 1 above, the following definitions shall apply:

- "Commercial Purposes" means (a) the practice, performance or provision of any method, process or service or (b) the manufacture, sale, distribution, disposition or importing of any product, in each case (a) or (b) for consideration, e.g., a fee, or on any other commercial basis.
- "Field" means use as a research tool for research purposes which includes, but is not limited to drug discovery and development, quality control/ quality assurance testing and product lot release assays, provided, however, that notwithstanding the foregoing, the Field shall expressly exclude (a) any in vivo and ex vivo human or clinical use, including, without limitation, any administration into humans or any diagnostic or prognostic use, (b) the creation of transgenic rodent models and/or derivatives thereof (such derivatives including, but not limited to, rodents' cells and rodents' organs), (c) any in vivo veterinary or livestock use, or non-research agricultural use, or (d) the manufacture, distribution, importation, exportation, transportation, sale, offer for sale, marketing, promotion or other exploitation or use of, or as, a therapeutic or diagnostic for humans or animals.

- “Related Materials” means any progeny, modification or derivative of a Product.

3. Your right to use the Product will terminate immediately if you fail to comply with these terms and conditions. For information on purchasing a license (a) to this Product for purposes other than Licensed Research Use, or (b) to the foregoing patents and patent applications generally, contact your local SIGMA sales representative, who will refer you to the proper licensing representative, or in the USA call 800-325-3010.

^(d)BEFORE OPENING OR USING THIS PRODUCT, PLEASE READ THE TERMS AND CONDITIONS SET FORTH IN THIS LIMITED USE LABEL LICENSE. YOUR USE OF THIS PRODUCT SHALL CONSTITUTE ACKNOWLEDGMENT AND ACCEPTANCE OF THESE TERMS AND CONDITIONS. If you do not agree to use this Product pursuant to the terms and conditions set out in this Limited Use Label License, please contact Promega Corporation within ten (10) calendar days of receipt to return the unused and unopened Product for a full refund; provided, however, that custom-made Products may not be returned for a refund.

Promega is selling this Product under a research use only license from Caribou Biosciences, Inc., under certain patents and patent applications owned or controlled by Caribou. For information on obtaining rights beyond those set forth in this Limited Use Label License please contact licensing@promega.com or Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711 USA, Attn: Licensing.

The purchase of this Product conveys to you, the Buyer, the NON-TRANSFERABLE right to use this Product solely for Research Use, subject to the conditions set out in this Limited Use Label License. If you wish to use this Product for any purpose other than Research Use, you must first obtain an appropriate license. This Product may not be used for any purpose other than Research Use. Your right to use this Product for Research Use is subject to the following conditions and restrictions:

Research Use means any use for internal research purposes, (e.g., for screening, characterization, quality control/quality assurance testing, product lot release assays, and/or toxicology purposes) for the sole benefit of you, the Buyer.