

产品手册

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat 细胞系（低表达）

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.2

目录

一、	产品基本信息及组分	3
二、	包装、运输及储存	3
三、	产品描述	4
四、	材料准备	5
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备	5
2.	试剂耗材准备	5
五、	细胞复苏、传代、冻存	6
1.	细胞复苏	6
2.	细胞传代	6
3.	细胞冻存	6
六、	使用方法（示例）	7
1.	抗体激动剂验证实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	9
2.	配体激动剂验证实验	10
1)	加样步骤	10
2)	报告基因检测	11
3)	验证结果	12
3.	抗体激动剂 Crosslink 验证实验	13
1)	加样步骤	13
2)	报告基因检测	15
3)	验证结果	15
附录 1	流式验证	16
相关产品		17
使用许可协议:		17

一、产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-C09468	H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C09468	H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C

二、包装、运输及储存

1. 细胞系产品干冰运输，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
2. 接触产品请带手套。请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
3. 本产品相关 Assay，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

三、 产品描述

4-1BB 又称为 CD137 或 TNFRSF9，是一种可诱导的共刺激受体，属于肿瘤坏死因子受体超家族的成员，在 T 细胞，自然杀伤(NK)细胞和先天免疫细胞中均有表达。4-1BB 与 4-1BB 配体(4-1BBL)的相互作用，能够促进细胞增殖、存活和细胞因子产生。目前针对 4-1BB 的药物研发主要是用于治疗炎症或自身免疫病，以及用于癌症治疗。靶向 4-1BB 的激动型抗体在治疗炎症或自身免疫病方面进展喜人，靶向 4-1BB 和免疫检查点或共刺激靶点的联合疗法将发挥更强的抗肿瘤作用。

吉满生物 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat (Low Expression)报告基因细胞系，是基于 4-1BBL/4-1BB 构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。该细胞稳定表达 4-1BB 基因及 Luciferase 报告基因，可用于靶向 4-1BB 的单抗等治疗性抗体的体外激活效果评价。

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)可配合 H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line (Genomeditech/GM-C16925)使用，检测抗体与 FcγRIIb 受体交联时，与受体的相互作用，对抗体的 Crosslink 体外激活效果进行评价。

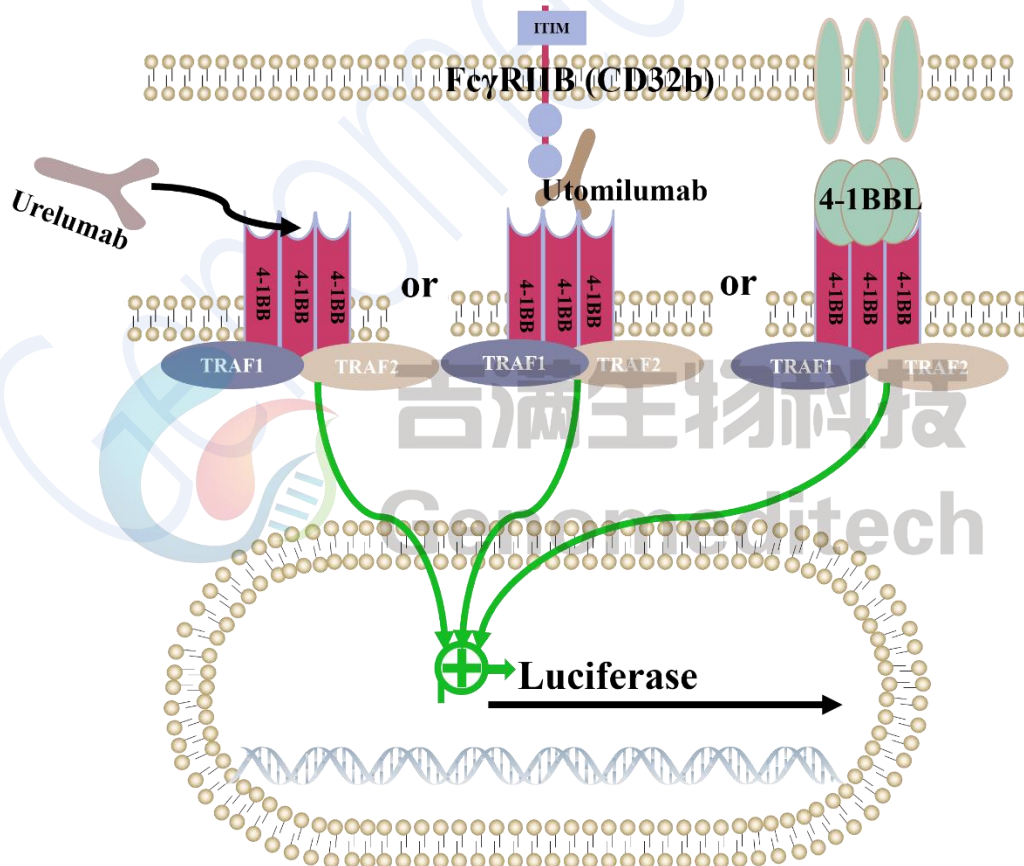


Fig 1. 原理示意图

四、 材料准备

1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

细胞复苏培养基:	RPMI 1640 +10% FBS +1% P.S
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+3.5 µg/mL Blasticidin+0.75 µg/mL Puromycin
细胞冻存培养基:	FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640 +1% FBS +1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
RPMI-1640 medium	500 mL	Biological Industries/01-100-1ACS
H ₂ FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line	5E6 cells/mL	Genomeditech/GM-C16925
4-1BBL	100 µg	Sino Biological/15693-H01H
Anti-H ₂ 4-1BB Antibody(Utomilumab)	hIgG2 /	Genomeditech/GM-26840AB
Urelumab (anti-TNFRSF9)	100 µg	Aladdin/Ab170654
Human 4-1BB Ligand/TNFSF9 Trimer Protein	100 µg	Kactus/BBL-HM141
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

五、细胞复苏、传代、冻存

1. 细胞复苏

- 37°C水浴锅预热复苏培养基，加入预热后的复苏培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37°C 恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下轻轻摇动解冻，直到刚刚融化（通常 2-3 分钟）。
- 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀， $176 \times g$ ，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 复苏培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $4-6 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL 悬液），竖瓶培养。

3. 细胞冻存

- 使用 $176 \times g$ ，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中，-80°C 下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

2. 细胞传代

注：细胞复苏后的 1 至 2 代，使用复苏培养基，待细胞状态稳定后，再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 此细胞为淋巴细胞状，悬浮生长。
- 首次复苏后，约 48-72 h 可进行第一次传代，此次传代后细胞培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加复苏培养基，瓶体改为横向放置。
- 当细胞密度达到 $1.5-2 \times 10^6$ cells/mL，1 传 3，隔 2-3 天继续传代，不要让其密度超 2×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养。
- 该细胞为悬浮细胞，传代时推荐使用【半换液法】对细胞状态较为有利。传代时可以直接向培养瓶中添加生长培养基，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。

注意事项：

- 该细胞对密度较为敏感，培养、传代时请注意保持细胞密度在合适的范围。
- 首次传代时注意营养，不处理时务必隔天适当补加复苏培养基。
- FBS 血清需 56°C 加热 30 分钟，可灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

六、 使用方法（示例）

1. 抗体激动剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat (Low Expression) 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Urelumab (anti-TNFRSF9)（以下简称为 Urelumab; 150kDa）作为阳性抗体。以 Urelumab 为例，Conc.01 浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μL PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	Urelumab	PBS	30 μg/mL	10 μg/mL	3.33 μg/mL	1.11 μg/mL	370.37 ng/mL	123.46 ng/mL	41.15 ng/mL	13.72 ng/mL	4.57 ng/mL	0	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 1-2 h，离心收集 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)，以 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，调整细胞浓度至 2×10^6 cells/mL。
- 使用无菌 96 孔板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Urelumab	10.63 mg/mL	1.063 mg/mL	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 90 μL 的 Assay buffer，B3-B11 加入 60 μL 的 Assay buffer。
- 吸取 5.38 μL 待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2）。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 30 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	5.38 μL Urelumab		90 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 30 μ L 液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 B3），充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- i) 准备 96 圆底孔板，根据孔板布局，加入步骤 a 准备好的 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat (Low Expression) 细胞 50 μ L/孔。
- j) 将步骤 h 准备好的梯度稀释液每孔加入 50 μ L。
- k) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- l) 使用报告基因检测试剂盒收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)	0 μ g/mL	30 μ g/mL	4.57 ng/mL
	4455	12273	4830

3) 验证结果

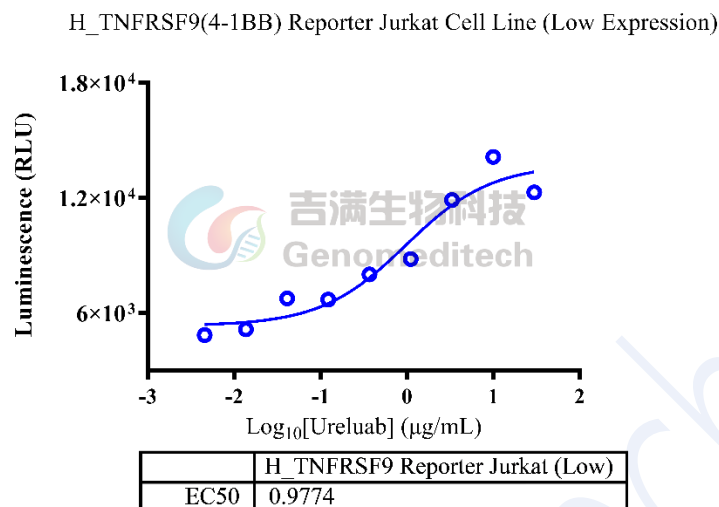


Fig 2. Response to Urelumab (anti-TNFRSF9). The H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression) (Cat. GM-C09468) at a concentration of 1E5 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Urelumab (anti-TNFRSF9) (Aladdin/Ab170654) in assay buffer (RPMI 1640 + 1% FBS + 1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech).
 The maximum induction fold was approximately [2.8]. Data are shown by drug mass concentration.

2. 配体激动剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat (Low Expression) 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 4-1BBL (47.9 kDa) 作为阳性药物。Conc.01 浓度为 300 nM，8 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μ L PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	4-1BBL	PBS	300 nM	37.5 nM	4.69 nM	585.94 pM	73.24 pM	9.16 pM	1.14 pM	143.05 fM	17.88 fM	0	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 1-2 h，离心收集 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)，以 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，调整细胞浓度至 2×10^6 cells/mL。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
4-1BBL	0.25 mg/mL(5.21 μ M)	/	直接使用储液

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 55.6 μ L 的 Assay buffer，B3-B11 加入 55 μ L 的 Assay buffer。
- 吸取不同体积的待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2 中加入 7.24 μ L 4-1BBL），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 7.86 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	7.24 μL 4-1BBL	加入	55.6 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 7.86 μ L 溶液，加入到第二个梯度稀释孔中（如 B3），充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- i) 准备 96 孔板，根据孔板布局，加入步骤 a 准备好的 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat (Low Expression) 细胞 50 μ L。
- j) 然后在加入步骤 h 准备好的梯度稀释液，每孔 50 μ L。
- k) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 7 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)+4-1BBL	0 nM	300 nM	17.88 fM
	24404	264926	19758

3) 验证结果

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)

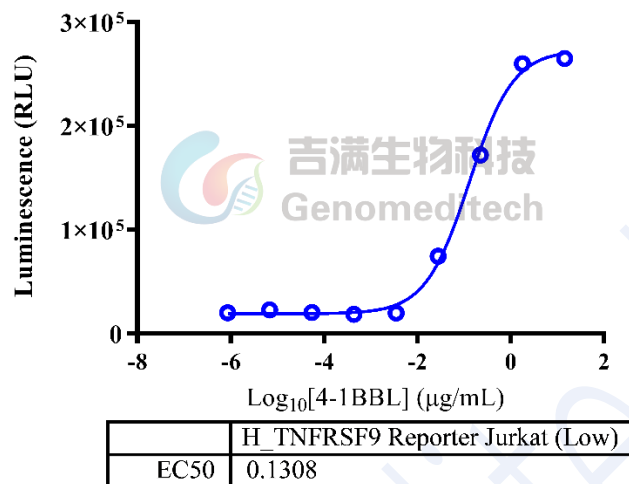


Fig 3. Response to Recombinant Human 4-1BB Ligand/TNFSF9 Protein. The H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression) (Cat. GM-C09468) at a concentration of 1E5 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Recombinant Human 4-1BB Ligand/TNFSF9 Protein (ECD, hFc Tag) (Sino Biological/15693-H01H) in assay buffer (RPMI 1640 + 1% FBS + 1% P.S) for 7 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [10.8]. Data are shown by drug mass concentration.

3. 抗体激动剂 Crosslink 验证实验

对于本实验，推荐 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression) 细胞量为 1×10^5 cells/孔，H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line 和 CHO-K1 Cell Line 细胞量各为 1.5×10^4 cells/孔。Anti-H_4-1BB hIgG2 Antibody(Utomilumab) (以下简称为 Utomilumab; 150 kDa) 作为本次实验的抗体，Conc.01 终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，5 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μL PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line+Utomilumab	PBS	100 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	800 ng/mL	160 ng/mL	32 ng/mL	6.4 ng/mL	1.28 ng/mL	256 pg/mL	0	PBS
C	CHO-K1 Cell Line+Utomilumab	PBS	100 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	800 ng/mL	160 ng/mL	32 ng/mL	6.4 ng/mL	1.28 ng/mL	256 pg/mL	0	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 在实验前 16-24 h，将靶细胞 H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line 和 CHO-K1 从培养瓶中分别消化下来，以新鲜培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数。离心收集细胞，再以新鲜培养基调整细胞浓度为 1×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔（FCGR2B CHO: B2-B10; CHO: C2-C10）。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h，从细胞培养瓶中转移 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression) 细胞至 50 mL 离心管中，计算细胞密度及活力。以 Assay Buffer 重悬细胞，调整至 2×10^6 cells/mL。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行，单重复可以检测 6 个药物）。

e) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Utomilumab	3.07 mg/mL	/	直接使用储液

f) 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 64.3 μ L 的 Assay buffer，B3-B11 加入 55 μ L 的 Assay buffer。

g) 吸取不同体积的待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2）。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 13.8 μL，加入次孔										对照孔	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4.5 μL Utomilumab	加入	64.3 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	
4.5 μL Utomilumab	加入	64.3 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	

h) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 13.8 μ L 液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 B3），充分混匀。

i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（如 B10）。

j) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出，每孔吸弃 90 μ L 培养基。

k) 加入步骤 b 准备好的 H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat (Low Expression) 细胞 50 μ L， 1×10^5 cells/孔。

l) 将步骤 i 准备好的抗体梯度稀释液每孔加入 50 μ L。

m) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。

n) 使用报告基因检测试剂盒收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)+Utomilumab+CHO FCGR2B	0 µg/mL	100 µg/mL	256 pg/mL
	7915	1620511	8384
H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)+Utomilumab+CHO	0 µg/mL	100 µg/mL	256 pg/mL
	10829	18061	11356

3) 验证结果

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression)

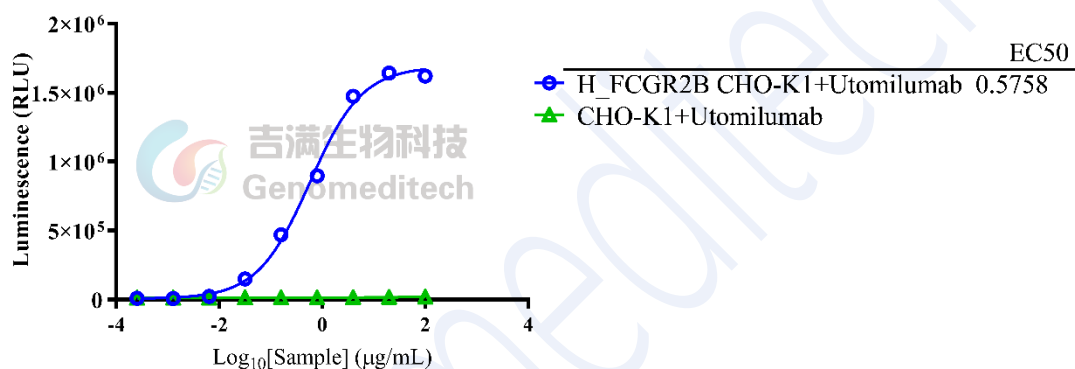


Fig 4. Response to Anti-H_4-1BB hIgG2 Antibody(Utomilumab). H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C21996) and CHO-K1 Cell Line were seeded at a density of 1.5E4 cells/well in a 96-well plate and incubated overnight. The next day, serial dilutions of the Anti-H_4-1BB hIgG2 Antibody(Utomilumab) (Cat. GM-26840AB) were incubated with 1E5 cells/well of the H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression) (Cat. GM-C09468) in a 96-well plate, and then added to the pre-seeded cells. The mixture was incubated for an additional 6 hours. Firefly luciferase activity is then measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The results indicated maximum blocking folds of approximately [193.3]. Data are shown by drug mass concentration.

附录 1 流式验证

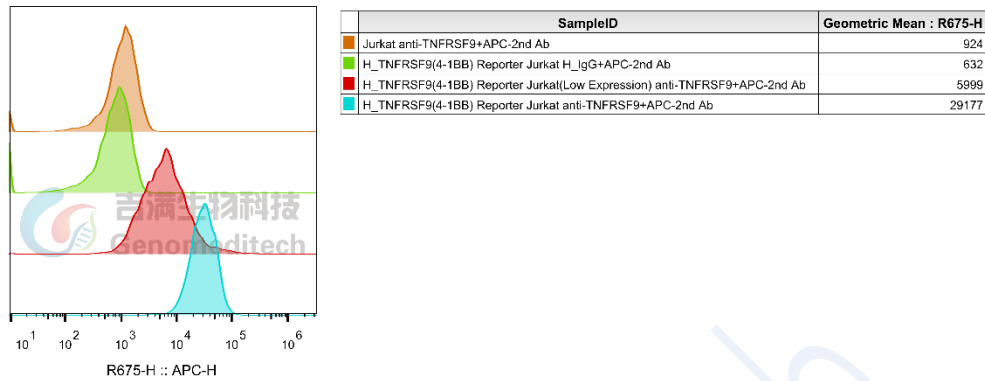


Fig 5. H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Low Expression) (Cat. GM-C41657) and H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell Line (Cat. GM-C45175) was determined by flow cytometry using Urelumab (anti-TNFRSF9) (Aladdin/Ab170654).

相关产品

4-1BB	
H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell line	Cynomolgus_TNFRSF9(4-1BB) CHO-K1 Cell Line
H_TNFRSF9(4-1BB) CHO-K1 Cell Line	
Anti-H_4-1BB hIgG2 Antibody(Utomilumab)	Anti-H_TNFRSF9(4-1BB) hIgG4 Antibody(Urelumab)
Anti-TNFRSF9(4-1BB) hIgG4 Reference Antibody (Urelbio)	
CD3	
H_CD3D CD3E KO Jurkat Cell Line	Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line
Cynomolgus_CD3 HEK-293 Cell Line	Cynomolgus_CD3E(Membrane Bound ECD) CHO-K1 Cell Line
H_CD3 CHO-K1 Cell Line	H_CD3 HEK-293 Cell Line
H_CD3E(Membrane Bound ECD) CHO-K1 Cell Line	Mouse_CD3 HEK-293 Cell Line
Anti-CD3 epsilon hIgG1 Antibody [OKT-3 (muromonab)]	Anti-CD3 hIgG1 Antibody(CH2527)
Anti-mouse CD3ε mIgG2a Antibody(145-2C11)	

使用许可协议:

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策：

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。