

技术手册

Mouse_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay

Genomeditech

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.8.3

Table of Contents

一、	产品描述.....	3
二、	产品基本信息及组分.....	4
三、	包装、运输及储存.....	4
四、	细胞信息.....	4
五、	实验仪器及试剂.....	5
1.	试剂和耗材.....	5
2.	重要仪器.....	5
3.	细胞复苏、传代、冻存.....	6
六、	使用方法.....	9
1.	概要-Anti-PDL1	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	11
2.	概要-Anti-Mouse_PD1	12
1)	加样步骤.....	12
2)	报告基因检测.....	13
3)	验证结果.....	14
附录一	Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 表达情况.....	15
附录二	Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 表达情况.....	16
附录三	Anti-H_CD274(PDL1) cross Mouse_PDL1 验证结果.....	17
使用许可协议:	18

一、 产品描述

PD-1 是激活的 T 细胞和 B 细胞表达的一种免疫抑制性受体，在对肿瘤抗体和自身抗原的免疫反应的调节中起关键作用。邻近细胞间的 PD-1 与其配体 PD-L1 或 PD-L2 的相互作用会抑制 TCR 信号通路的传导以及 TCR 介导的细胞增殖、转录激活和细胞因子产生等效应。用于阻断 PD-1/PD-L1 相互作用的治疗抗体和 Fc 融合蛋白在治疗各种癌症的临床试验中已表达出很好的应用前景。目前用于检测 anti-PD-1 或 anti-PD-L1 生物制品活性的方法依赖于初级人类 T 细胞和功能终点的测量，如细胞增殖、细胞表面标志物表达、干扰素 γ (IFN γ) 和白介素-2 (IL-2) 的产生。由于依赖于供体原代细胞、复杂的试验方案和不合格的试验试剂，这些试验既费力又易变。因此，这些测定方法很难在质量控制的药物开发环境中建立。

Mouse_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay 是一种生物相关的、以 MOA (mechanism of action) 为基础的检测方法，可用于测定阻断 PD-1/PD-L1 相互作用的抗体及其他生物制剂的效能和稳定性。该试验由两种基因工程细胞系：PD-1 效应细胞(PD-1 Effector Cells)，即稳定表达小鼠 PD-1 受体和转录因子诱导的荧光素酶报告基因的 Jurkat T 细胞；PD-L1 aAPC/CHO-K1 细胞 (Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line)，是一种稳定表达小鼠 PD-L1 和一种以抗原非依赖方式激活同源 TCR 的细胞表面蛋白的 CHO-K1 细胞。

当两种细胞共培养时，PD-1/PD-L1 之间的相互作用会抑制 TCR 信号通路的转导及转录因子介导的 luciferase 表达。加入阻断 PD-1/PD-L1 的抗体后，这种抑制会被解除，引起 TCR 信号通路的转导及转录因子介导的 luciferase 的表达。

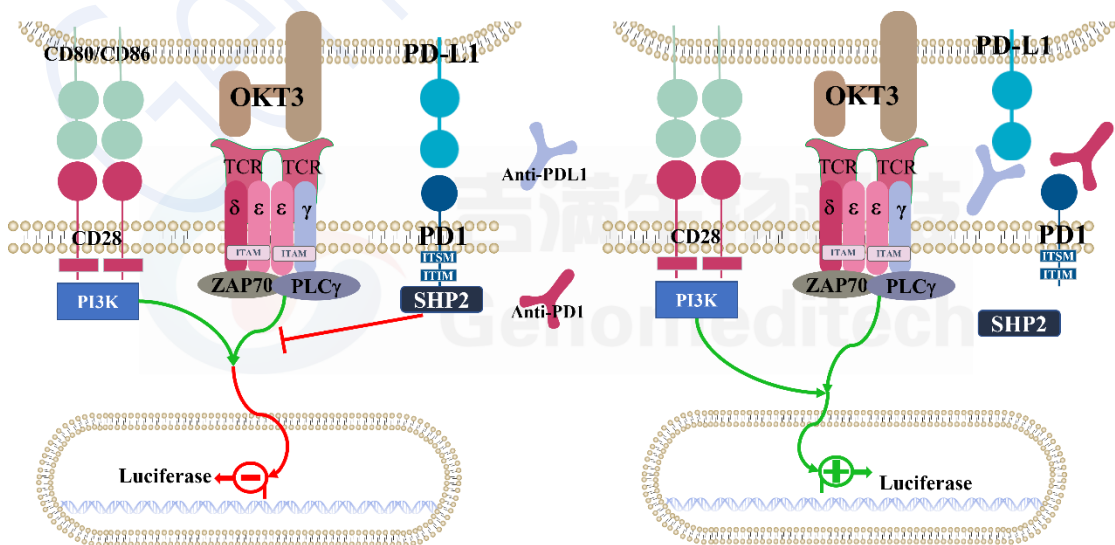


Fig 1. 原理示意图

二、 产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-032AS010	Mouse_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay (CHO-aAPC)	1 kit

组成成分

名称	Cat.	数量
Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line	GM-C25661	1 管 (5E6 Cell/mL)
Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line	GM-C25791	1 管 (5E6 Cell/mL)

三、 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. 接触产品请戴手套。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。

四、 细胞信息

Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin+0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

Jurkat 来自中国科学院细胞库，悬浮细胞

Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line

细胞复苏培养基: F12K+10% FBS+1% P.S

细胞生长培养基: F12K+10% FBS+1% P.S+4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin+4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

CHO-K1 来自中国科学院细胞库，贴壁细胞

Assay Buffer

RPMI 1640+1% FBS+1% P.S

五、 实验仪器及试剂

1. 试剂和耗材

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech /GM-040404-1
RPMI 1640	500 mL	Biological Industries/01-100-1ACS
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 Well White Polystyrene Microplate	96-well	Corning/3903
Cell Culture Dish	10 cm	NEST/704001
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	100 mL	Promega/ E6120
Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-31740AB
Anti-Mouse_PD1 mIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-28206AB

2. 重要仪器

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

3. 细胞复苏、传代、冻存

1) Jurkat 细胞复苏

- a) 细胞冻存密度为 5×10^6 cells/mL，冻存管分装 1 mL。
- b) 在 37°C 水浴锅预热培养基，加入预热完全培养基 5 mL 到 15 mL 离心管。
- c) 从液氮中取出冻存的细胞并迅速放入 37°C 恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。
- d) 用 70% 乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。
- e) 在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到预先加有预热好的 15 mL 离心管中，轻轻混匀，1000 rpm，离心 5 min 使细胞沉淀，弃上清。
- f) 使用 1 mL 完全培养基重悬细胞沉淀，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞。
- g) 调整活细胞密度到 $4-6 \times 10^5$ cells/mL，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL，培养面积 25 cm²），竖瓶培养。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完全培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加培养基，瓶体改为横向放置。

2) Jurkat 细胞传代

- a) 推荐细胞接种密度在 $2.5-4 \times 10^5$ cells/mL，对于 Raji 细胞而言，当细胞密度达到 $1-1.2 \times 10^6$ cells/mL、1 传 3-1 传 4，2-3 天传代，不要让其密度超 1.5×10^6 cells/mL。对于 Jurkat 细胞而言，当细胞密度达到 $1.5-2 \times 10^6$ cells/mL 时进行传代，1 传 3，2-3 天传代，不要让其密度超过 2×10^6 cells/mL。推荐使用 T25 瓶进行传代培养，也可通过计数控制细胞传代密度。
- b) 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新鲜培养液，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。
- c) 细胞倍增率稳定后再用于检测或冻存，一般在 7-10 天左右。常规的稳定倍增率是 24±8 小时。细胞在 20 代之内能够保持其功能。增殖时一般细胞活力在 80%。

3) Jurkat 细胞冻存

- a) 细胞冻存液：90% FBS+10% DMSO。
- b) 使用 1000 rpm，3 min 离心收集细胞。

- c) 使用预冷细胞冻存液重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL。
 - d) 每管 1 mL 分装到细胞冻存管中，冻存体积为 1 mL，冻存密度为 5×10^6 cells/mL。
拧紧盖子，适当标记后，将细胞冻存管置于梯度降温盒中，在 -80°C 下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。
- 4) CHO-K1 Cell Line 细胞复苏
- a) 细胞冻存密度为 5×10^6 cells/mL，冻存管分装 1 mL。
 - b) 在 37°C 水浴锅预热培养基，加入预热完全培养基 5 mL 到 15 mL 离心管。
 - c) 从液氮中取出冻存的细胞并迅速放入 37°C 恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。
 - d) 用 70% 乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。
 - e) 在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到预先加有预热好的 15 mL 离心管中，轻轻混匀，1000 rpm，离心 5 min 使细胞沉淀，弃上清。
 - f) 冻存细胞离心后收集沉淀，使用 1 mL 完全培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，活细胞大于 3×10^6 cells/mL。
 - g) 通过补加完全培养基的形式，调整活细胞密度到 $2-3 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中，参考体系：10 cm 皿（8-10 mL 悬液）；6 cm 皿/T25 瓶（5 mL 悬液）。后续细胞传代可根据培养皿中细胞聚合度调整。
- 5) CHO-K1 Cell Line 细胞传代
- a) 放入 37°C 恒温培养箱中孵育 24 h，镜下观察细胞贴壁情况。如已贴壁，根据细胞密度，小心更换培养基或进行细胞传代。当细胞密度大于 60% 时，即可进行传代。如未贴壁，继续孵育观察。
 - d) 细胞消化液：0.25% Trypsin-EDTA，消化时间为：2-3 min。
 - e) 贴壁细胞按细胞密度（汇合度）进行传代，推荐细胞传代比例为 1:4-1:5，2-3 天传代传代。
 - f) 将皿或培养瓶中的培养基用移液管或吸管弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
 - g) 弃 PBS，加 1 mL 消化液润洗一遍，吸弃，再次吸取 1 mL 消化液， 37°C 消化 2-3 min，显微镜下观察，待细胞变圆，细胞间隙明显，部分细胞刚开始脱离瓶壁。

- h) 加 2 mL 左右完全培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，1000 rpm 室温离心 3 min。
- i) 弃上清，细胞沉淀用完全培养基重悬，根据传代前细胞密度分盘（根据培养皿面积和细胞密度计算，传代后细胞密度为 20-30%）。

	培养基	面积	接种细胞量	汇合度 100%
35mm Dish	2 mL	9.6 cm ²	0.3 × 10 ⁶	1.2 × 10 ⁶
60 mm Dish	5 mL	28 cm ²	0.8 × 10 ⁶	3.2 × 10 ⁶
100 mm Dish	10 mL	78 cm ²	2.2 × 10 ⁶	8.8 × 10 ⁶
T-25 Flask	5 mL	25 cm ²	0.7 × 10 ⁶	2.8 × 10 ⁶
T-75 Flask	10 mL	75 cm ²	2.1 × 10 ⁶	8.4 × 10 ⁶

6) CHO-K1 Cell Line 细胞冻存

- a) 细胞冻存液：90% FBS+10% DMSO。
- b) 使用 1000 rpm，3 min 离心收集细胞。
- c) 使用预冷细胞冻存液重悬细胞，细胞密度调整为 5 × 10⁶ cells/mL。
- d) 每管 1 mL 分装到细胞冻存管中，冻存体积为 1 mL，冻存密度为 5 × 10⁶ cells/mL。拧紧盖子，适当标记后，将细胞冻存管置于梯度降温盒中，在 -80°C 下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

六、 使用方法

1. 概要-Anti-PDL1

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 2×10^4 cells/Well 的 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line (接种密度)进行实验。

使用 Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody (以下简称 Anti-PDL1;150 kDa), 起始终浓度(Conc.01)为 $30 \mu\text{g/mL}$, 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照。周围为 $100 \mu\text{L}$ PBS, 以防止边孔蒸发。

孔板布局:

	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	Anti-PDL1	PBS	30 $\mu\text{g/mL}$	7.5 $\mu\text{g/mL}$	1.88 $\mu\text{g/mL}$	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.3 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 pg/mL	0	PBS
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D													
E													
F													
G													
H													

针对不同抗体样品和细胞, 可调整优化操作步骤以获得更好的结果。如果是针对固定的抗体和细胞进行检测, 建议先优化两种细胞之间的比例。

1) 加样步骤

- 在实验前 16-24 h, 将 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞从培养瓶中消化下来, 以新鲜培养基重悬细胞, 检测细胞活力并计数, 再以新鲜培养基调整细胞浓度为 2×10^5 cells/mL。以排枪加 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 在实验前 1-2 h, 将 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞从培养瓶中取出, 离心收集细胞沉淀, 使用 Assay Buffer 重悬, 检测细胞活力并计数, 再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 2×10^6 cells/mL, 备用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B10)。

e) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-PDL1	1.49 mg/mL	/	直接使用储液

f) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 70.4 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 μL 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 中加入 2.95 μL Anti-PDL1），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.3 μL ，加入次孔										对照孔			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A															
B	2.95 μL Anti-PDL1	加入	70.4 μL	55 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															

h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.3 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。

i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。

j) 将步骤 a 孵育过夜的 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 孔板取出，每孔吸弃 90 μL 培养基。加入之前准备好的 Anti-PDL1 梯度稀释液，每孔 50 μL ，孵育 1 小时。

k) 1 h 后将步骤 j 细胞孔板取出，B2-B11 每孔加入步骤 b 调整浓度后的细胞，50 μL 。

l) 将混匀后的孔板盖板上盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中继续孵育 6 h。

m) 使用 ONE-Glo™ 报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

Mouse_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay	PBS Control	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	457.76 pg/mL
	10859	250222	11356

3) 验证结果

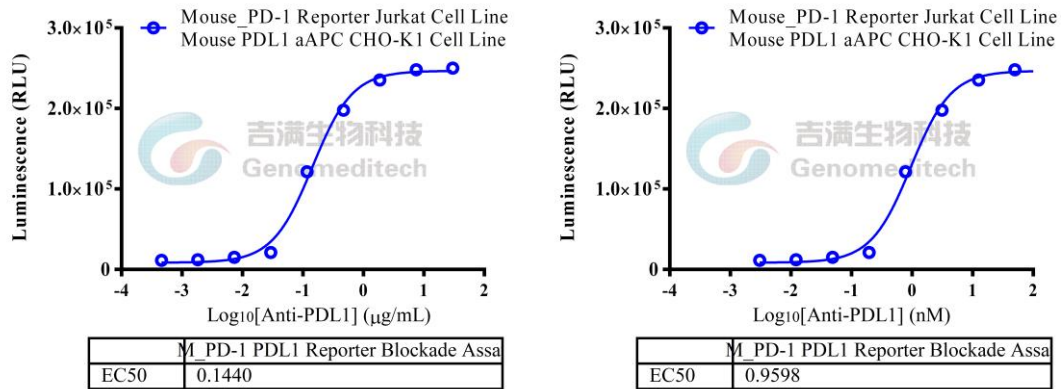


Fig 2. 验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

2. 概要-Anti-Mouse_PD1

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 2×10^4 cells/Well 的 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line (接种密度)进行实验。

使用 Anti-Mouse_PD1 mIgG1 Antibody (以下简称 Anti-Mouse_PD1;150 kDa) 作为阳性药物。Conc.01 终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 4 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	Anti-Mouse_PD1	100 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{g/mL}$	1.56 $\mu\text{g/mL}$	390.63 ng/mL	97.66 ng/mL	24.41 ng/mL	6.1 ng/mL	1.53 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

- 在实验前 16-24 h, 将 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞从培养瓶中消化下来, 以新鲜培养基重悬细胞, 检测细胞活力并计数, 再以新鲜培养基调整细胞浓度为 2×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上市盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 在实验前 1-2 h, 将 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞从培养瓶中取出, 离心收集细胞沉淀, 使用 Assay Buffer 重悬, 检测细胞活力并计数, 再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 2×10^6 cells/mL, 以排枪加 50 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上市盖, 于孵箱中备用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B10)。

e) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-Mouse_PD1	5 mg/mL	/	直接使用储液

f) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 70.4 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 μL 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 中加入 2.95 μL Anti-Mouse_PD1），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.3 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	2.95 μL Anti-Mouse_PD1	加入	70.4 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													

h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.3 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。

i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。

j) 将步骤 b Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞孔板从培养箱取出，加入步骤 i 准备好的 Anti-Mouse_PD1 梯度稀释液，每孔 50 μL ，孵育 1 小时。

k) 1 h 后将步骤 a 孵育过夜的 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 孔板取出，每孔吸弃 90 μL 培养基。加入步骤 j 的混合液，每孔 100 μL 。

l) 将混匀后的孔板盖板上板盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中继续孵育 6 h。

m) 使用 ONE-Glo™ 报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

Mouse_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay	0 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	1.53 ng/mL
	11496	79968	11886

3) 验证结果

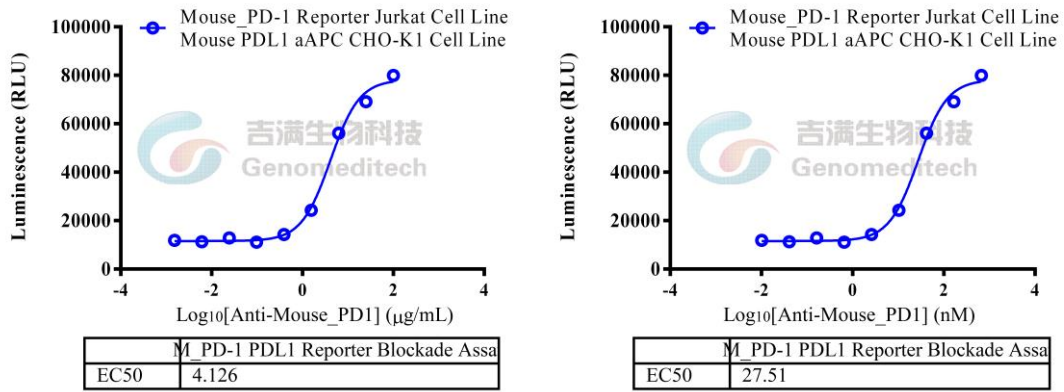


Fig 3. 验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录一 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 表达情况

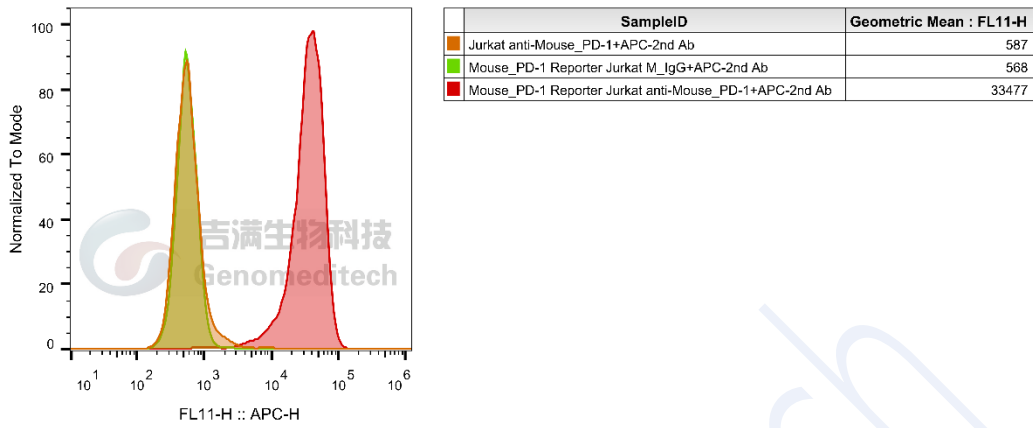


Fig 4. Mouse_PD-1 Reporter Jurkat 细胞使用 Anti-Mouse_PD1 mIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-28206AB) 验证结果

附录二 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 表达情况

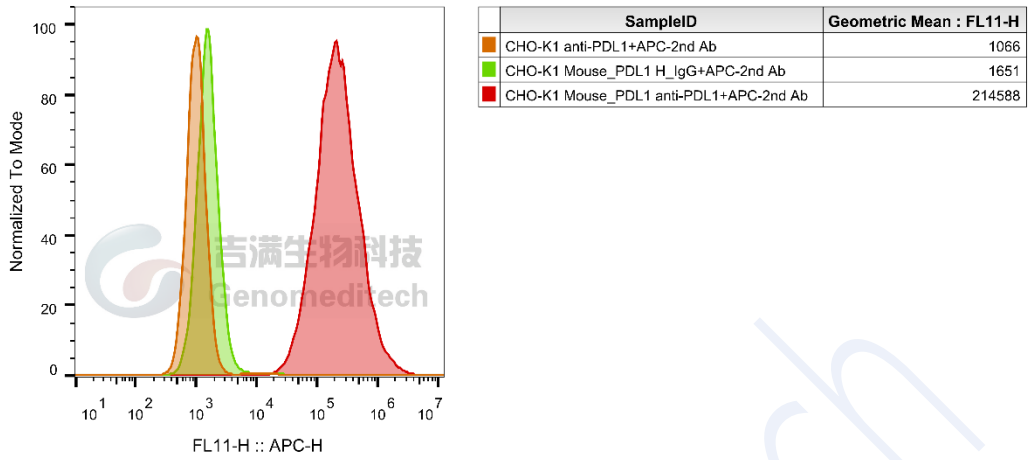


Fig 5. Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 细胞使用 Anti-PDL1 (Genomeditech/GM-31740AB) 验证结果

附录三 Anti-H_CD274(PDL1) cross Mouse_PDL1 验证结果

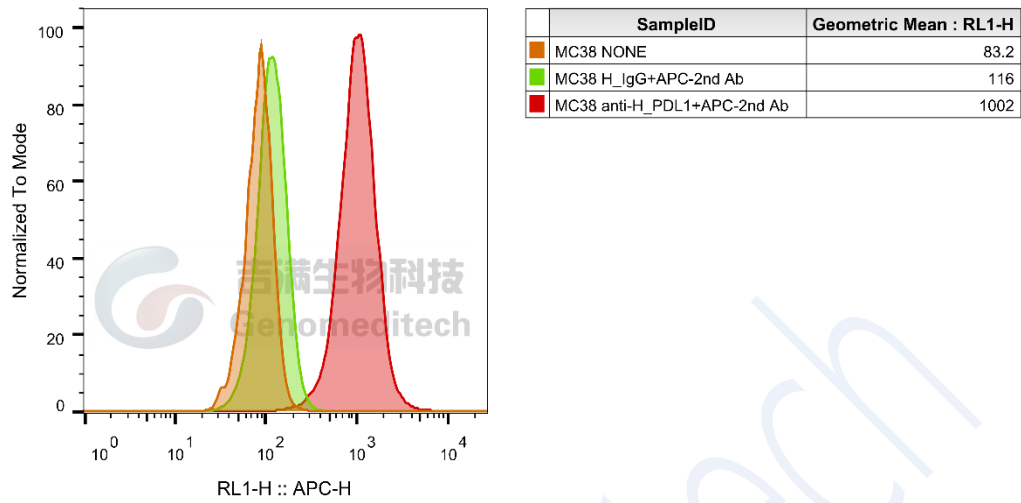


Fig 6.在 MC38 细胞中, 使用 Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-31740AB)验证 Mouse_PDL1 表达

使用许可协议:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech