

技术手册

H_CTLA4 CD80 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..... | 5 |
| 六、 | 使用方法..... | 8 |
| 1. | 概要..... | 8 |
| 2. | 加样步骤..... | 8 |
| 3. | 报告基因检测..... | 9 |
| 4. | 验证结果..... | 10 |
| 附录一 | H_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line 表达情况..... | 11 |
| 附录二 | H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 表达情况..... | 12 |
| 使用许可协议: | | 13 |

一、 产品描述

CTLA-4, 也被称为 CD152, 是一种在调节性 T 细胞(treg)上组成型表达的免疫抑制受体。在免疫反应的调节中起关键作用。当 CTLA4 在 T 细胞表面表达上调, T 细胞以更高的亲和力与 CD80(B7-1)或 CD86(B7-2)结合, 胜过 CD28 的阳性共刺激信号, 因此诱导 T 细胞无反应性。研究发现, 用于阻断 CTLA4/CD80 和 CD86 相互作用的抗体和 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。

目前用于测量靶向 CTLA-4 的潜在生物抗体活性的方法依赖于原始人类 T 细胞和功能终产物的测量, 如细胞增殖, 细胞表面标记物表达和干扰素 γ (IFN γ)和白细胞介素-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抗体开发环境中建立。

吉满生物 H_CTLA4 CD80 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 CTLA-4/CD80 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:

CTLA4 效应细胞(CTLA4 Effector Cells), 即稳定表达人 CTLA4 受体和响应 TCR/CD28 激活的启动子荧光素酶报告基因 Jurkat T 细胞;

H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞, 是一种稳定表达人 CD80 和 OKT3 的细胞。

当两种细胞共培养时, CTLA4/CD80 之间的相互作用会抑制 TCR 信号通路的转导及荧光素酶(Luciferase)的表达。加入阻断 CTLA4 的抗体后, 这种抑制会被解除, 引起 TCR 信号通路的传导及 Luciferase 的表达。

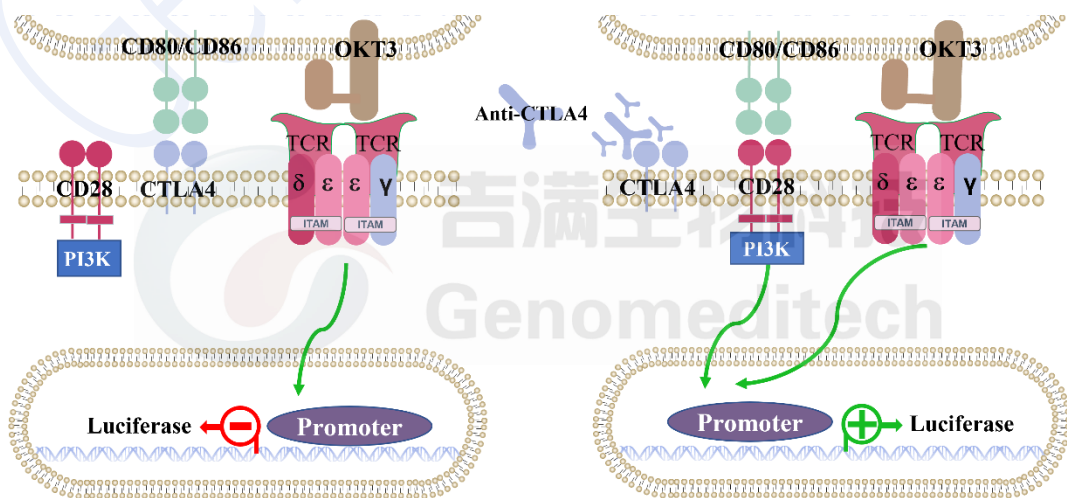


Fig 1. 原理示意图

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-032AS011 | H_CTLA4 CD80 Reporter Blockade Assay | 1 kit |

组成成分

| 名称 | Cat. | 数量 |
|-----------------------------------|-----------|-------------------|
| H_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line | GM-C23902 | 1 管 (5E6 Cell/mL) |
| H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line | GM-C24688 | 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

H_CTLA4 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

H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line

细胞复苏培养基: RPMI 1640+10% FBS+1% P.S

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

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 |
| Passive Lysis 5X Buffer | 30 mL | Promega/E1941 |
| Firefly Luciferase Assay Reagent | 100 mL | Genomeditech/G0483M002 |
| Anti-H_CTLA-4 hIgG1 Antibody | / | Genomeditech/GM-27203AB |

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) 37°C水浴锅预热培养基，加入预热后的完全培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- b) 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不断摇动至融化。
- c) 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，1000 rpm，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
使用 1 mL 完全培养基重悬。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。
- d) 通过补加培养基的形式调整活细胞密度为 $4 - 6 \times 10^5$ cells/mL，将细胞悬液接种至 1 - 2 个 T25 中（3 - 5 mL 悬液），竖瓶培养。

2) Jurkat 细胞传代

- a) 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。
 - 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) 注意营养, 不处理时务必隔天适当补加培养基。
- 3) Jurkat 细胞冻存
- a) 使用 1000 rpm, 3 min 离心收集细胞。
 - b) 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。
 - c) 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。
- 4) CHO-K1 细胞复苏
- a) 37°C 水浴锅预热培养基, 加入预热后的完全培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
 - b) 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不断摇动至融化。
 - c) 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, 1000 rpm, 离心 3 min, 使细胞沉淀, 弃上清。
 - d) 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 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
 - e) 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。
- 5) CHO-K1 细胞传代
- a) 当细胞密度大于 60%时, 即可进行传代。推荐细胞传代比例为 1:4 - 1:5, 2-3 天传代传代。
 - b) 将皿或培养瓶中的培养基弃去, 10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
 - c) 弃 PBS, 加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 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。

- d) 待细胞变圆，细胞间隙明显，部分细胞刚开始脱离瓶壁时，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。
 - e) 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%）。
- 6) CHO-K1 细胞冻存
- a) 使用 1000 rpm, 3 min 离心收集细胞。
 - b) 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。
 - c) 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。

六、 使用方法

1. 概要

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line 和 1×10^4 cells/Well 的 H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line (接种密度)进行实验。

使用 Anti-H_CTLA-4 hIgG1 Antibody (以下简称为 Anti-CTLA4;150 kDa), 起始终浓度 (Conc.01)为 30 $\mu\text{g/mL}$, 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11, B12 为 0 浓度对照。周围为 100 μL 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-CTLA4 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 | 114.44 pg/ml | 28.61 pg/ml | 0 |
| 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的话,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。

2. 加样步骤

- 实验前 16–24 h, 离心收集 H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞, 以 Assay Buffer 重悬细胞, 计算细胞密度及活力, 通过补加 Assay Buffer 的方式, 调整 H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞密度到 1×10^5 cells/mL, 以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔, 周围的孔加 100 μL PBS, 盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h, 离心收集 H_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line, 以 Assay Buffer 重悬细胞, 计算细胞密度及活力, 通过补加 Assay Buffer 的方式, 调整 H_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line 到 2×10^6 cells/mL。
- 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 B1-B11)。

e) 准备母液

| 抗体名称 | 储液 | 母液 | 配置方法 |
|------------------------------|---------|----|--------|
| Anti-H_CTLA-4 hIgG1 Antibody | 1 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 B1 孔加入 68.9 μ L Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 55 μ L 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 B1 中加入 4.4 μ L Anti-CTLA4），混匀。

| | 母液吸取 | 梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.3 μ L，加入次孔 | | | | | | | | | | 对照孔 | |
|---|------------------------|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | | |
| B | 4.4 μ L Anti-CTLA4 | 68.9 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L |
| C | | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | | |

h) 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 18.3 μ L，加入到第二个梯度稀释孔 B2，充分混匀。

i) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11）。

j) 将步骤 b 准备好的 H_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line 细胞取出，向步骤 i 的梯度稀释的抗体孔板中，依次加入 55 μ L 细胞（B1-B11），孵育 1 h。

k) 1 h 后将步骤 a 准备好的 H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞孔板取出，每孔吸弃 100 μ L 细胞，然后将步骤 j 孵育好的混合液，吸取 100 μ L/孔加入到步骤 a 的细胞孔板中，盖上盖板，继续孵育 16 h。

l) 使用报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

3. 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

| | | | |
|--------------------------------------|--------------|---------------|-------------|
| H_CTLA4 CD80 Reporter Blockade Assay | 0 μ g/mL | 30 μ g/mL | 28.61 pg/mL |
| | 186232 | 1487867 | 182329 |

4. 验证结果

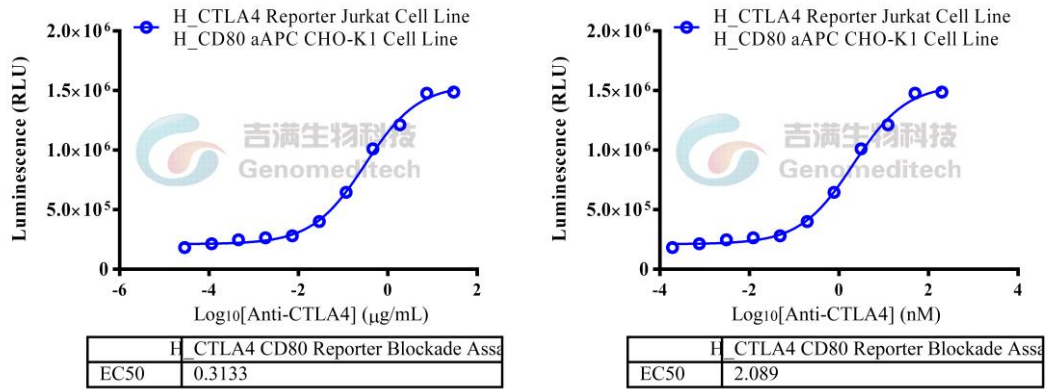


Fig 2. 验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录一 H_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line 表达情况

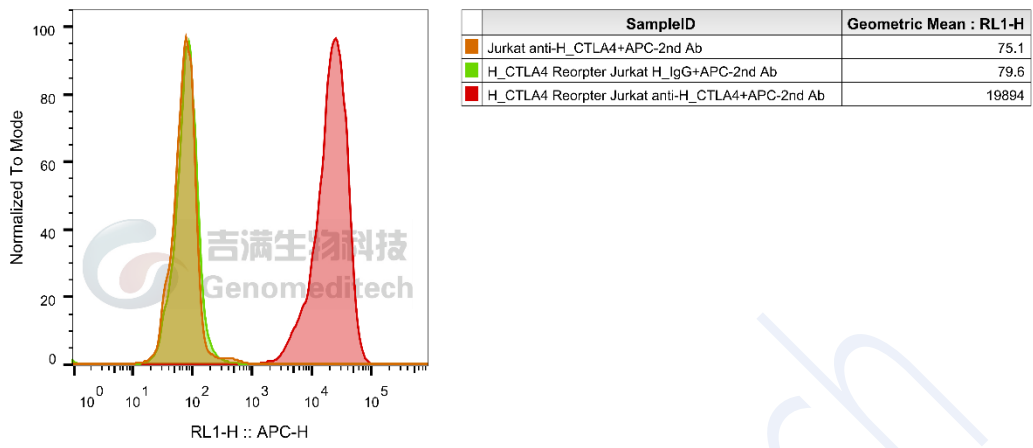


Fig 3. H_CTLA4 Reporter Jurkat 细胞使用 Anti-H_CTLA-4 (Genomeditech/GM-27203AB)验证结果

附录二 H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 表达情况

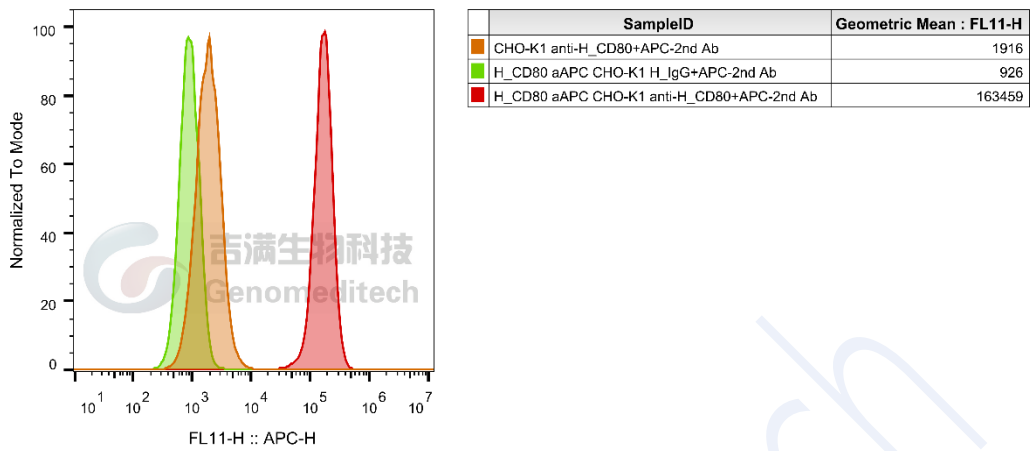


Fig 4. H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞使用 Anti-H_CD80 hIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-46075AB) 抗体验证结果

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