

产品手册

H_BCMA Reporter Cell Line

H_BCMA Reporter 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.8.1

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.	H_BCMA Reporter Cell Line 细胞复苏.....	6
2.	H_BCMA Reporter Cell Line 细胞传代.....	6
3.	H_BCMA Reporter Cell Line 细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	7
1.	配体激活验证实验——APRIL.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	配体激活验证实验——BAFF.....	9
1)	报告基因检测.....	9
2)	验证结果.....	9
3.	APRIL 激活, 抗体 block 实验.....	10
1)	加样步骤.....	10
2)	报告基因检测.....	11
3)	验证结果.....	12
4.	BAFF 激活, 抗体 block 实验.....	13
1)	报告基因检测.....	13
2)	验证结果.....	13
附录	H_BCMA Reporter Cell Line 流式结果.....	14
	使用许可协议:	15

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-C25349	H_BCMA Reporter Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C25349	H_BCMA Reporter Cell Line	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

B 细胞成熟蛋白 (BCMA、CD269、TNFRSF17) 是 TNF 受体超家族的成员之一。BCMA 在免疫器官和成熟 B 淋巴细胞中表达。对 B 细胞发育和自身免疫反应很重要。BCMA 被其配体激活, 可促进 B 细胞的分化和增殖。

BCMA 的配体是由巨噬细胞和树突状细胞产生的 BAFF (b 细胞激活因子) 和 APRIL(增殖诱导配体), BAFF 和 APRIL 具有可溶性同三聚体的生物活性。

在多发性骨髓瘤中, BCMA 在恶性浆细胞上以较高水平广泛表达, 并且 BCMA 表达随着从正常细胞向活性多发性骨髓瘤的进展而增加。因此 BCMA 是较好的肿瘤靶标。此外, γ -分泌酶可以裂解细胞表面的 BCMA 形成可溶形式的 BCMA (sBCMA), sBCMA 由 BCMA 胞外结构域和一部分跨膜结构域组成, 它不仅降低了靶抗原的密度, 而且还会作为一种可溶性诱饵抵抗免疫细胞。因此 BCMA 靶向抗体联用 γ -分泌酶抑制剂也是一种新的治疗模式。

吉满生物 H_BCMA Reporter Cell Line 是一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 BAFF 或 APRIL 结合 BCMA 受体后, 激活下游信号通路, 从而激活荧光素酶 (Luciferase) 的表达, 使用阻断型的抗体可以阻断这一信号的传导。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果, 因此可用于 BCMA 相关药物的体外效果评价。

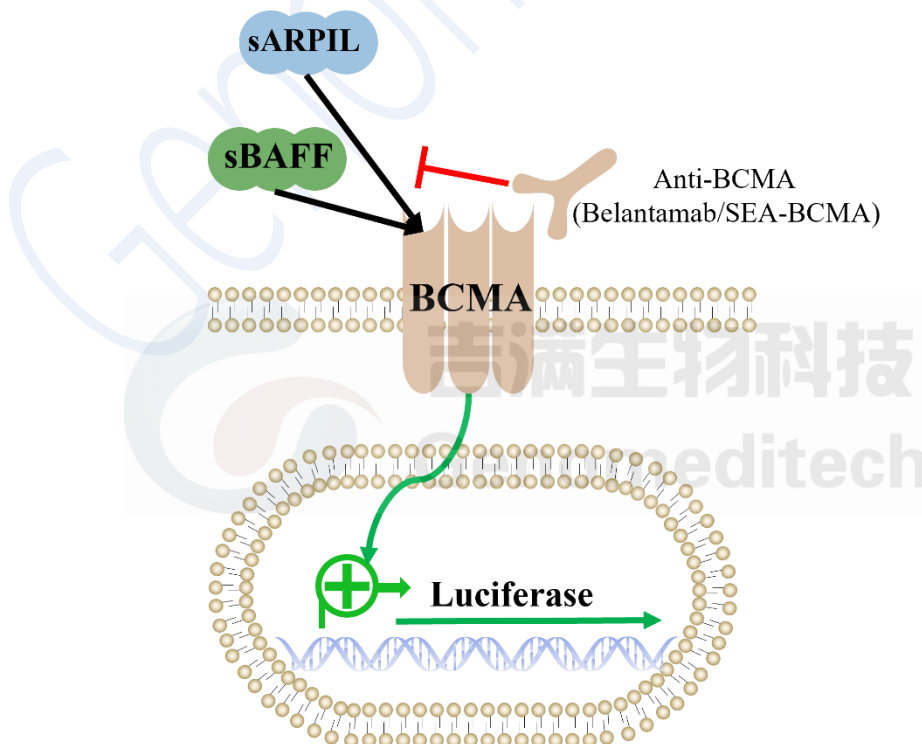


Fig 1.BCMA 信号通路图

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+0.75 µg/mL Puromycin+3.5 µg/mL Blasticidin
细胞冻存培养基:	90% 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	Thermo/10099141
RPMI 1640	500 mL	gibco/C11875500BT/8121699
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
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	/	Genomeditech/GM-040503
Recombinant Human APRIL (N-Flag-His)	/	Novoprotein/CU89
Recombinant Human BAFF (N-Fc)	/	Novoprotein/CU71
Anti-BCMA hIgG1 Antibody(SEA-BCMA)	/	Genomeditech/GM-49486AB
Anti-BCMA hIgG1 Antibody(Belantamab)	/	Genomeditech/GM-52396AB

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. H_BCMA Reporter Cell Line 细胞复苏

- 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。
- 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。
- 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。
- 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. H_BCMA Reporter Cell Line 细胞传代

- 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。
- 注意营养，不处理时务必隔天适当补加培养基。

3. H_BCMA Reporter Cell Line 细胞冻存

- 使用 1000 rpm，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。

六、使用方法

1. 配体激活验证实验——APRIL

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐目的细胞 H_BCMA Reporter Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。使用 Recombinant Human APRIL (50 kDa; 以下简称为 APRIL) 作为激活药物。起始终浓度(Conc.01)为 50 $\mu\text{g/mL}$ ，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	APRIL 50 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	3.13 $\mu\text{g/mL}$	781.25 ng/mL	195.31 ng/mL	48.83 ng/mL	12.21 ng/mL	3.05 ng/mL	762.94 pg/mL	190.73 pg/mL	47.68 pg/mL	0
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_BCMA Reporter 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，调整细胞密度为 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，盖上板盖，于孵箱中孵育待用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B1-B11）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
APRIL	0.1 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1 孔不加 Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 55 μL Assay Buffer。

- f) 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 73.3 μL APRIL），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	73.3 μL APRIL	0 μL	55 μL	55 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														

- g) 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 18.3 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B2，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11）。
- i) 将步骤 a 准备好的 H_BCMA Reporter Cell Line 孔板取出，每孔加 50 μL 梯度稀释的抗体，混匀后孵育 6 h。
- j) 使用 One-step 报告基因试剂检测，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_BCMA Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	47.68 pg/mL
		25405	2511858

3) 验证结果

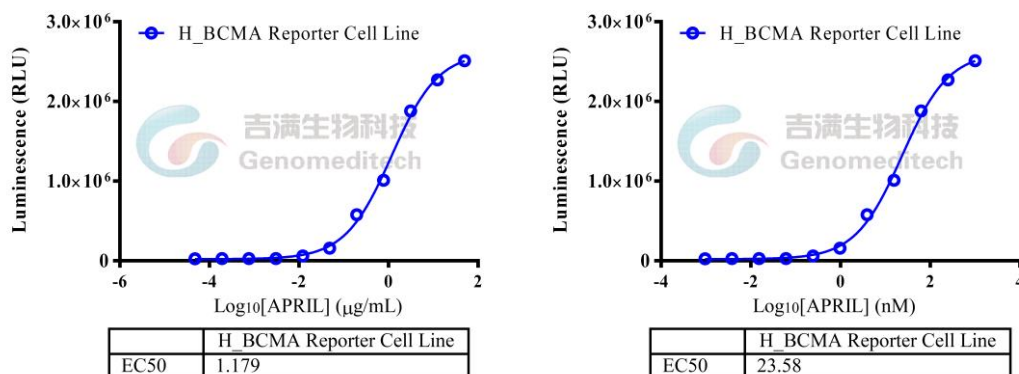


Fig 2. 验证结果

（右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. 配体激活验证实验——BAFF

操作步骤可参照 **APRIL 配体激活验证实验**，对于本实验，推荐目的细胞 H_BCMA Reporter Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。使用 Recombinant Human BAFF (43.3 kDa; 以下简称 BAFF) 作为激活药物。起始终浓度(Conc.01)为 $3 \mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释含 0 浓度对照。

1) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_BCMA Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	2.86 pg/mL
	76814	949696	60012

2) 验证结果

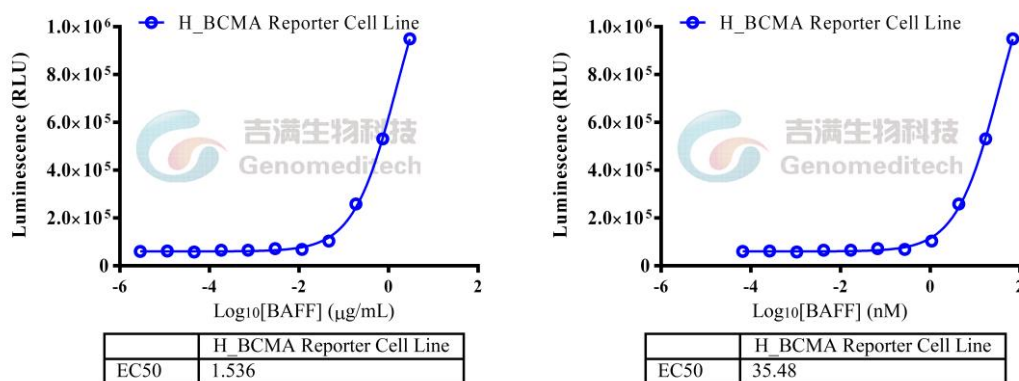


Fig 3. 验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

3. APRIL 激活, 抗体 block 实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐目的细胞 H_BCMA Reporter Cell Line 细胞量约为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 APRIL 作为激活药物, 激活浓度使用 100 ng/mL。使用 Anti-BCMA hIgG1 Antibody(SEA-BCMA) (150 kDa; 以下简称为 SEA-BCMA) 和 Anti-BCMA hIgG1 Antibody(Belantamab) (150 kDa; 以下简称为 Belantamab) 作为阳性抗体。以 SEA-BCMA 为例, 起始终浓度(Conc.01)为 30 $\mu\text{g/mL}$, 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照。周围为 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	SEA-BCMA	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	Belantamab	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
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 1-2 h, 离心收集 H_BCMA Reporter 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, 调整细胞密度为 3×10^6 Cells/mL, 以排枪加 33 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上盖板, 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)。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
SEA-BCMA	3.19 mg/mL	/	直接使用储液
Belantamab	3.73 mg/mL	/	直接使用储液
APRIL	0.5 mg/mL	/	直接使用储液

- e) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 47 μL Assay Buffer，B2-B11 孔，加入 36.3 μL Assay Buffer。
- f) 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 1.4 μL SEA-BCMA），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 12.1 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.4 μL SEA-BCMA 加入	47 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	
C	1.2 μL Belantamab 加入	47.2 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 12.1 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- i) 将步骤 a 准备好的 H_BCMA Reporter Cell Line 细胞孔板取出，每孔加入步骤 h 梯度稀释的抗体 33 μL ，于孵箱中孵育 1 h。
- j) 孵育期间，配置 APRIL 激活药物（3 \times 激活浓度），取 1.2 μL 药物，加入到 1934.8 μL Assay Buffer 中，混匀。
- k) 1 h 后，将孵箱中的细胞孔板取出，加入步骤 j 配置好的 APRIL 药物，每孔 33 μL ，混匀盖上盖板，放入孵箱中继续孵育 6 h。
- l) 使用 One-step 报告基因试剂检测，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_BCMA Reporter Cell Line+APRIL+SEA-BCMA	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	457.76 pg/mL
	138630	23786	267931
H_BCMA Reporter Cell Line+APRIL+Belantamab	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	457.76 pg/mL
	138630	18461	241463

3) 验证结果

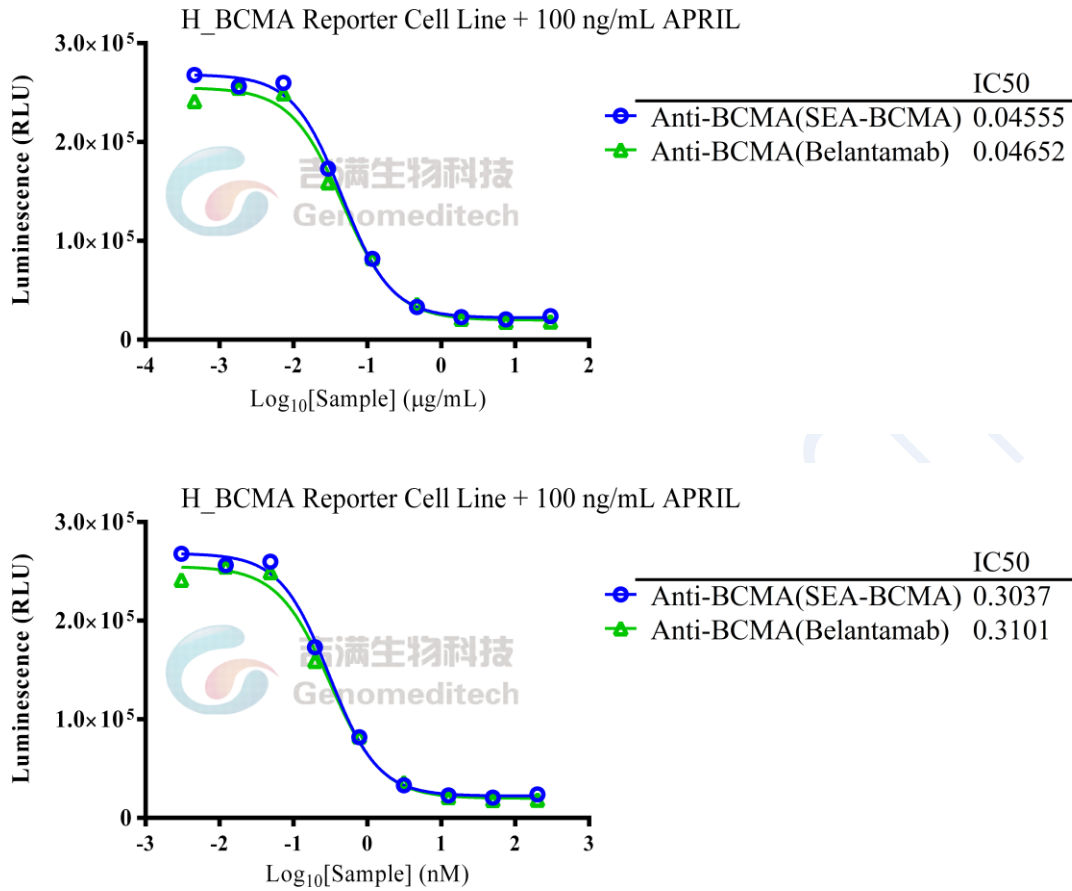


Fig 4. 验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

4. BAFF 激活, 抗体 block 实验

操作步骤可参照实验 3 (APRIL 激活, 抗体 block 实验), 对于本实验, 推荐目的细胞 H_BCMA Reporter Cell Line 细胞量约为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 BAFF 作为激活药物, 激活浓度使用 $1 \mu\text{g/mL}$ 。使用 Anti-BCMA hIgG1 Antibody(SEA-BCMA) (150 kDa; 以下简称为 SEA-BCMA) 和 Anti-BCMA hIgG1 Antibody(Belantamab) (150 kDa; 以下简称为 Belantamab) 作为阳性抗体。以 SEA-BCMA 为例, 起始终浓度(Conc.01)为 $30 \mu\text{g/mL}$, 4 倍梯度稀释, 含 0 浓度对照。

1) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_BCMA Reporter Cell Line+BAFF+SEA-BCMA	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	28.61 pg/mL
	210508	57592	138395
H_BCMA Reporter Cell Line+BAFF+Belantamab	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	28.61 pg/mL
	195102	58169	133985

2) 验证结果

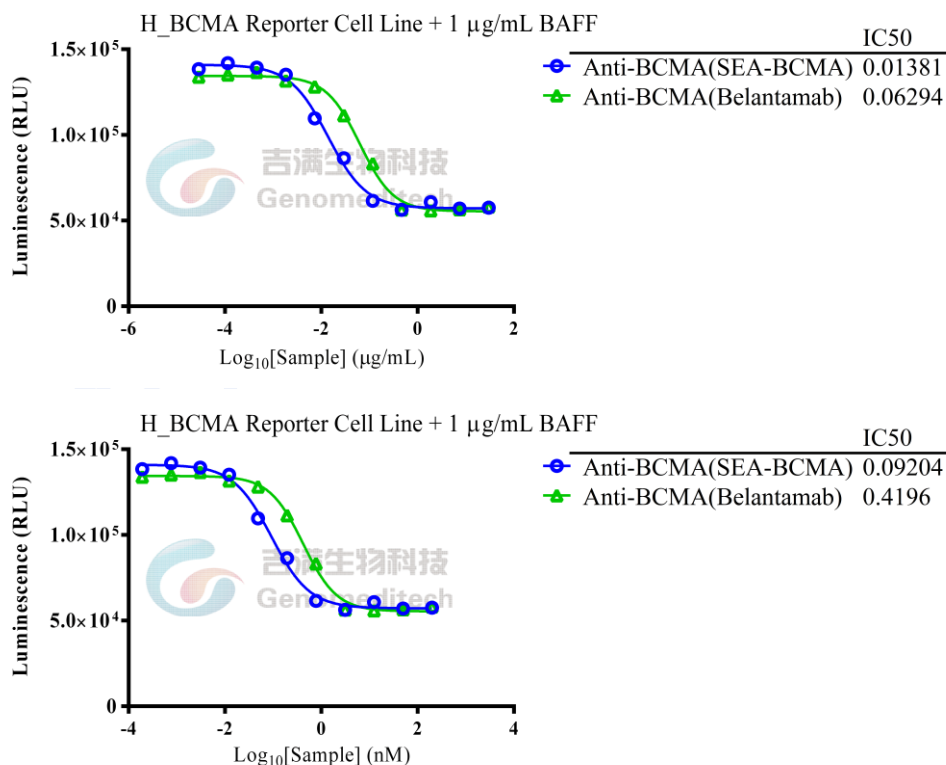


Fig 5. 验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 H_BCMA Reporter Cell Line 流式结果

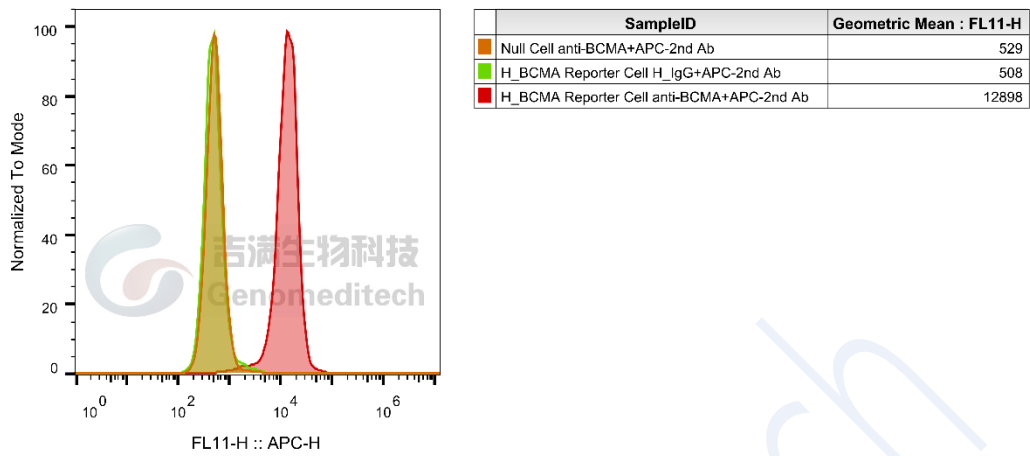


Fig 6.功能细胞 H_BCMA Reporter Cell Line 使用 Anti-BCMA hIgG1
 Antibody(Belantamab)(Genomeditech/GM-52396AB)流式验证结果

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