

产品手册

ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line

ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO)细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.1

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.	细胞复苏	6
2.	细胞传代	6
3.	细胞冻存	6
六、	使用方法	7
1.	Assay 验证（示例）	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	9
附录 1:	Epcoritamab ADCC 验证结果	10
附录 2:	流式验证结果	10
附录 3:	Sanger 结果	11
相关产品		12
使用许可协议:		12

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-C39293	ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C39293	ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) 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

ADCC 即抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 是指表达 Fc 受体的免疫细胞通过识别抗体的 Fc 段直接杀伤与抗体特异性结合的靶细胞的作用。现如今, ADCC 作用机制被用来检测、评定抗体或靶细胞的功效。抗体与细胞表面上的目标抗原结合。如果抗体的 Fc 段同时结合到效应细胞 (主要为自然杀伤细胞, natural killer cells) 表面的 Fc γ RIIIa 受体上, 两种类型的细胞即发生多重交联, 导致 ADCC 作用机制通路的激活。靶细胞的杀伤是此活化途径的终点, 这一指标被用在经典的 ADCC 生物活性检测中, 这些经典的检测方法利用供者的外周血单核细胞 (PBMC) 或自然杀伤 (NK) 细胞亚群作为效应细胞。这些细胞的应答变异性很大, 难于制备, 并容易引起很高的背景读数。

吉满生物 ADCC Fc γ RIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line 报告基因细胞系采用工程改造的 Jurkat 细胞作为效应细胞。该细胞稳定表达了 Fc γ RIIIa 受体(高亲和 158V)和由特定转录因子驱动表达的萤火虫荧光素酶, 同时敲除了内源性 CD3 复合物。这一设计使得细胞能专一响应受体介导的 ADCC 激活信号。通过检测细胞中荧光素酶的生物发光强度, 可以精准定量 ADCC 通路的抗体活性。该体系信号强、背景低, 特别适合用于双抗 TCE 药物的功能活性和机制验证研究。

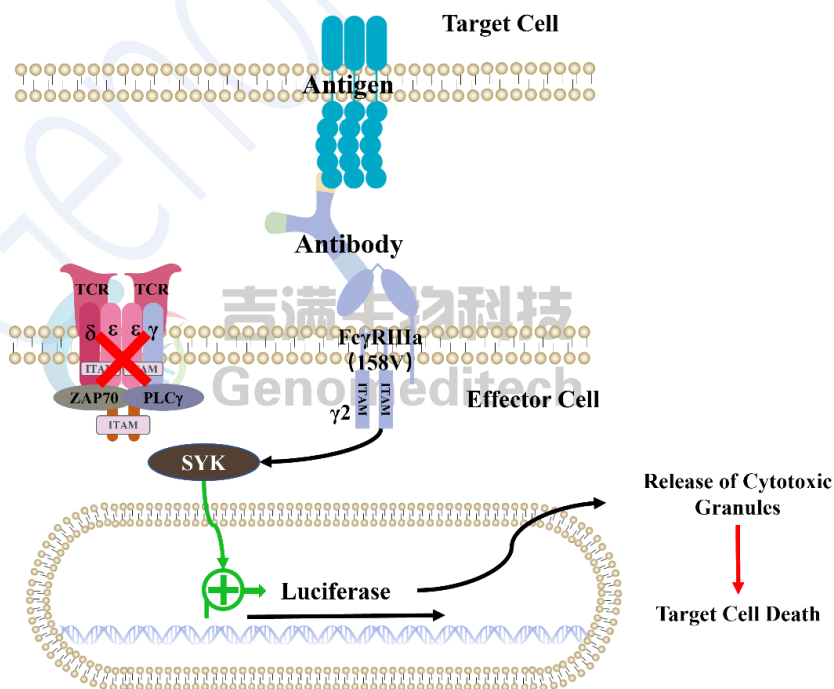


Fig 1. 信号通路图

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+3.5 µg/mL Blasticidin+400 µg/mL G418+200 µg/mL Hygromycin+0.75 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	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.
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep(P.S)	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404
G418 Sulfate	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Raji Cell Line	1 管 (5E6 Cells/mL)	Genomeditech/GM-C19100
ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line	1 管 (5E6 Cells/mL)	Genomeditech/GM-C05619
Anti-CD3xCD20 hlgG1 Bispecific Antibody (Epcobio)	/	Genomeditech/GM-88130MAB
Anti-CD20 hlgG1 Reference Antibody (Ocrebio)	/	Genomeditech/GM-87986MAB
PE anti-human CD16 Antibody	25 tests	Biolegend/302007
Abflo® 488 Rabbit anti-Human/Monkey CD3 mAb	100 T	Abclonal/A26283
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

1. Assay 验证（示例）

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。推荐 Raji Cell Line 细胞量为 2×10^4 cells/孔。

本次实验使用 Anti-CD20 hIgG1 Reference Antibody (Ocrebio) (以下简称为 Ocrelizumab, 分子量约 150 KDa) 作为阳性药物，无 ADCC 活性的 Anti-CD3×CD20 hIgG1 Bispecific Antibody (以下简称为 Epcoritamab; 分子量约 150 KDa) 做对照，Conc.01 浓度为 30 μg/mL，4 倍梯度稀释，Ocrelizumab 药物 Conc.01-Conc.11 分别排在 B1-B11, B12 为 0 浓度对照；Epcoritamab 药物 Conc.01-Conc.11 分别排在 C1-C11, C12 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	Ocrelizumab	30 μg/mL	7.5 μg/mL	1.88 μg/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	Epcoritamab	30 μg/mL	7.5 μg/mL	1.88 μg/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
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 1-2 h，离心收集 ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line，以 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，调整细胞浓度为 3.03×10^6 cells/mL。以排枪加 33 μL 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上班盖，于孵箱中孵育备用。
- 在实验前 1-2 h，离心收集 Raji Cell Line，以 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，调整细胞浓度为 6.05×10^4 cells/mL。于孵箱中孵育备用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（B 行、C 行）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Ocrelizumab	6 mg/mL	0.6 mg/mL	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer
Epcoritamab	8.7 mg/mL	0.87 mg/mL	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer

- f) 96 孔 V 孔板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1、C1 孔分别加入 52.8 μ L Assay Buffer，B2-B12、C2 - C12 孔，加入 39.6 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 9.4 μ L Ocrelizumab；C1 中加入 5.6 μ L Epcoritamab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 13.2 μ L，加入次孔											对照孔
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	9.4 μ L Ocrelizumab	52.8 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L
C	6.1 μ L Epcoritamab	52.8 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L
D													
E													
F													
G													
H													

- h) 从第一个梯度稀释孔 B1、C1 中分别吸取 13.2 μ L，加入到第二个梯度稀释孔 B2、C2 中，充分混匀。
- i) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11、C1）。
- j) 取出步骤 a 准备好的 ADCC Fc γ RIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line 细胞孔板，加入步骤 b 准备好的 Raji Cell Line 溶液，每孔 33 μ L。
- k) 然后再加入步骤 i 准备好的梯度稀释的药物，每孔 33 μ L。
- l) 盖上板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- m) 使用报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase 数值。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

	0 μ g/mL	30 μ g/mL	28.61 pg/mL
ADCC Fc γ RIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line + Ocrelizumab	933	68069	961
ADCC Fc γ RIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line + Epcoritamab	848	993	1022

3) 验证结果

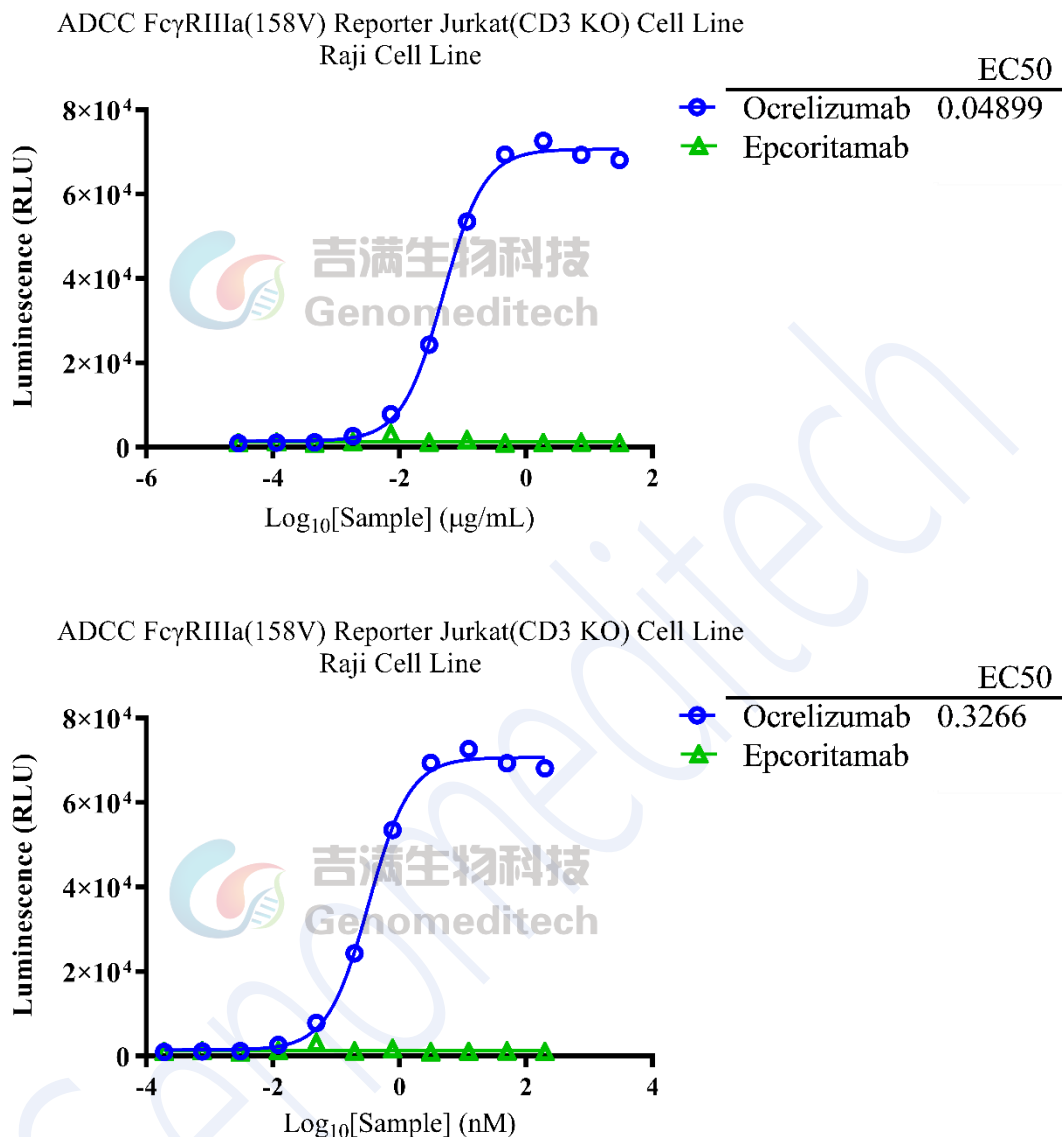


Fig 2. 使用 ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line 验证 Ocrelizumab 和 Epcoritamab 介导的 ADCC 响应。(药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算)

附录 1: Epcoritamab ADCC 验证结果

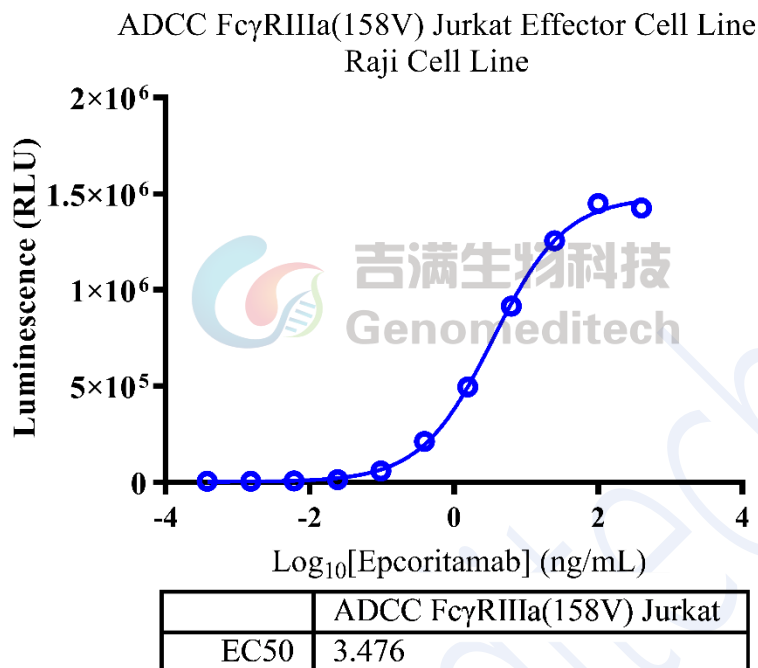


Fig 3. 使用 ADCC Fc γ RIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line 验证 Epcoritamab 介导的效应细胞激活反应。将 Anti-CD3 $\times$ CD20 hIgG1 双特异性抗体 (Epcobio, Cat. GM-88130AB) 进行系列稀释后, 与每孔 1×10^5 个 ADCC Fc γ RIIIa(158V) Jurkat 效应细胞 (Cat. GM-C05619) 和每孔 2×10^4 个 Raji 靶细胞 (Cat. GM-C19100) 共同孵育 6 小时。随后使用 GMOne-Step 2.0 荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Cat. GM-040513) 检测荧光素酶活性。Epcoritamab (Epcobio) 由于其结构经过工程化改造, 缺乏 ADCC 活性, 因此不能通过其 Fc 区诱导 ADCC。本实验中观察到的激活效应, 来源于 Epcoritamab 的 CD3 臂与 Jurkat 效应细胞 TCR 的结合, 以及与 Raji 靶细胞 CD20 的结合, 而非经典的 Fc 介导 ADCC 通路。

附录 2: 流式验证结果

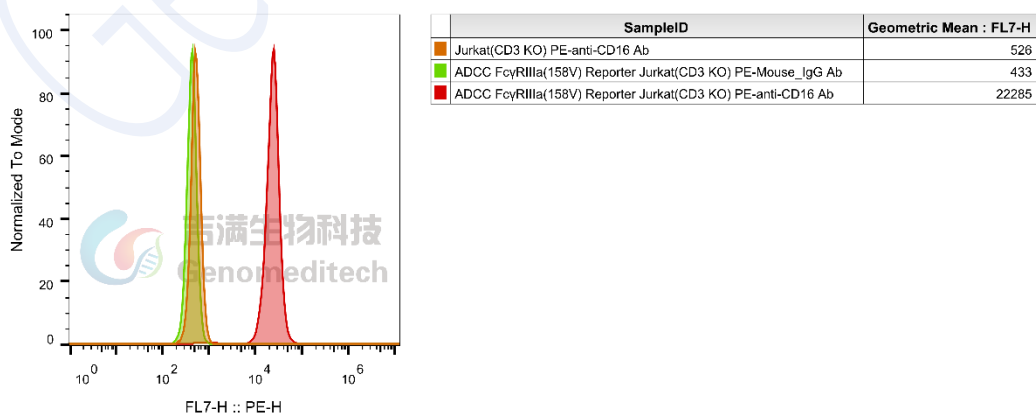


Fig 4. 使用 PE anti-human CD16 Antibody (Biolegend/302007) 抗体流式验证结果

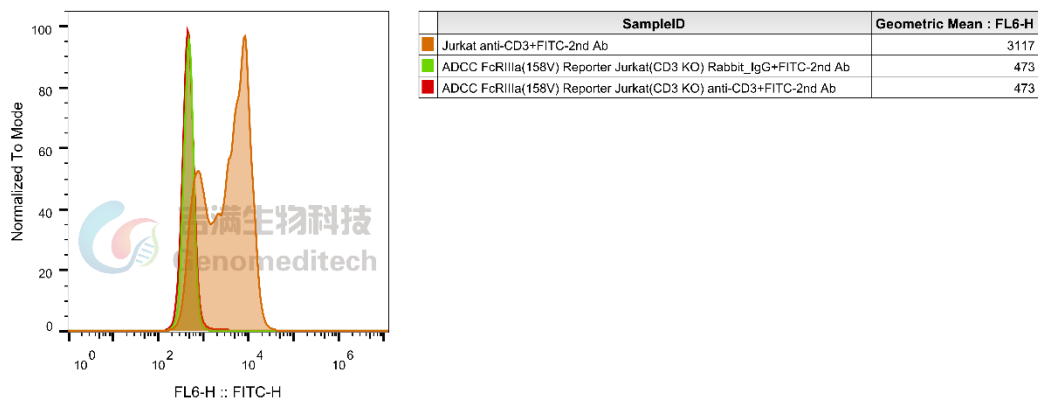


Fig 5. 使用 Abflo® 488 Rabbit anti-Human/Monkey CD3 mAb (Abclonal/A26283) 抗体流式验证 CD3 敲除成功

附录 3: Sanger 结果



Fig 7. ADCC FcγR11a(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line Sanger 测序验证 CD3ε 敲除效果

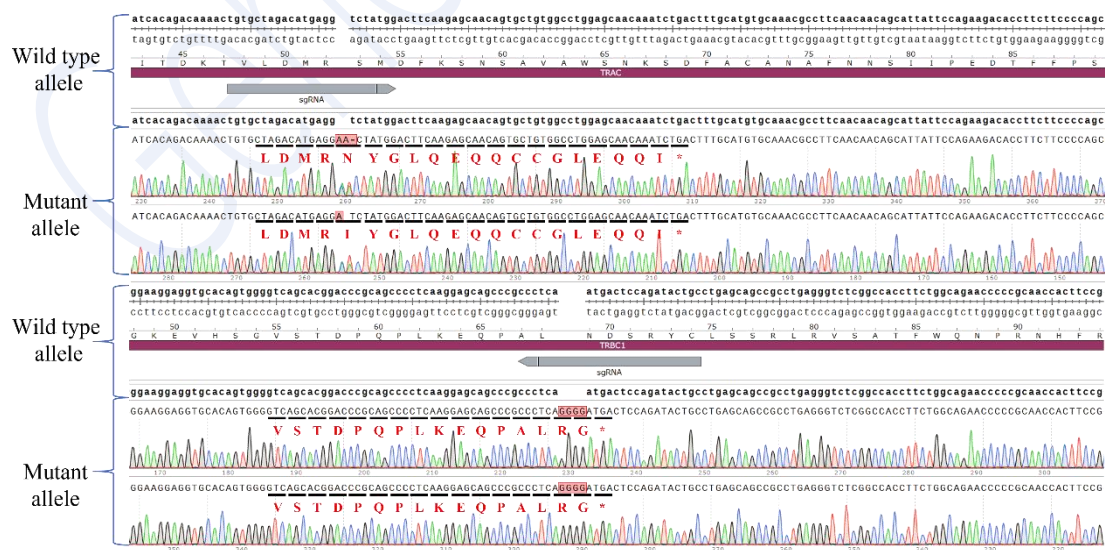


Fig 6. 母细胞测序验证 TCRα/β 敲除效果

相关产品

FcγR	
Cynomolgus_FcRn MDCK Cell Line	H_FCGR1A(CD64) CHO-K1 Cell Line
H_FCGR1A(CD64) HEK-293 Cell Line	H_FCGR2A(CD32A) CHO-K1 Cell Line
H_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line	H_FCGR3A(CD16a) 158F CHO-K1 Cell Line
H_FCGR3A(CD16a) 158V CHO-K1 Cell Line	H_FCGR3B(CD16b) CHO-K1 Cell Line
H_FcRn CHO-K1 Cell Line	H_FcRn MDCK Cell Line
Mouse_FcRn MDCK Cell Line	
Anti-FcRn hIgG4 Reference Antibody(Rozabio)	Anti-H_FcRn IgG4 Antibody(Rozanolixizumab)
Anti-Mouse CD1632 mIgG2b Antibody(2.4G2)	
ADCCP	
ADCC FcγRIIIa(158F) Jurkat Effector Cell Line	ADCC FcγRIIIa(158V) DDX35TM Jurkat Effector Cell Line
ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line	ADCC M_FcγRIV Jurkat Effector Cell Line
ADCP FcγRIIa DDX35TM Jurkat Effector Cell Line	ADCP FcγRIIa Jurkat Effector Cell Line
ADCP FcγRIIa R131 Jurkat Effector Cell Line	ADCP FcγRIIb Jurkat Effector Cell Line

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。