

产品手册

H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat(hPD1 OE) Cell
Line

H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat(hPD1 OE) 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（示例）	7
1.	激动剂激活实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	8
附录 1:	Anti-PD1-IL2v 验证结果	9
附录 2:	IL-2 蛋白验证结果	9
附录 3:	流式验证结果	10
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-C41979	H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat (hPD1 OE) Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C41979	H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat (hPD1 OE) 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

白细胞介素-2 (IL-2) 由活化 T 细胞在 TCR 识别抗原后产生, 是肿瘤浸润淋巴细胞的重要生长因子。它既促进效应与初始 T 细胞增殖存活, 也会激活调节性 T 细胞 (Tregs)。其受体 IL-2R 由 CD25 (IL-2R α)、CD122 (IL-2R β)、CD132 (γ_c) 组成。三种亚基可形成不同亲和力复合体: 高亲和力三聚体 CD25+CD122+CD132、中等亲和力二聚体 CD122+CD132、以及仅用于配体捕获的低亲和力 CD25 单体。

程序性死亡受体 1 (PD 1, 编码基因为 PDCD1) 是免疫检查点受体, 主要表达于活化的 T 细胞、B 细胞与部分髓系细胞表面。其胞外区为免疫球蛋白样结构域, 胞内含 ITIM/ITSM 基序, 可在与配体 PD L1 或 PD L2 结合后招募 SHP 2 等磷酸酶, 抑制 TCR 与 CD28 信号传导, 从而降低细胞增殖、细胞毒活性与细胞因子分泌, 维持外周耐受并防止免疫过度活化。

Anti-PD1-IL2v 是一类将抗 PD-1 单克隆抗体与经工程改造的变体白细胞介素-2 (IL-2 variant, IL2v) 通过融合蛋白或偶联形式整合于一体的新型免疫治疗药物。

吉满生物 H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat(hPD1 OE) Cell Line 报告基因细胞系同时表达 CD25、CD122、CD132 以及 PD1 四个受体基因, 当 Anti-PD-1-IL-2v 结合 PD-1 并将 IL-2v 递送至 IL-2R 时, 可激活下游 IL-2R 信号通路, 从而诱导荧光素酶表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果, 因此可用于相关药物的体外效果评价。

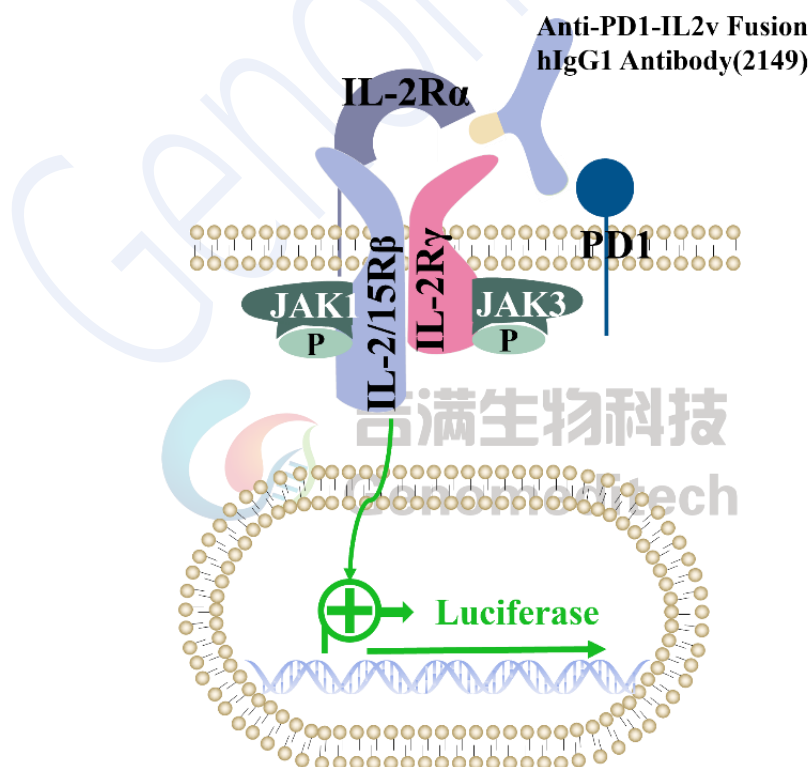


Fig 1. 原理示意图

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+400 µg/mL G418+200 µg/mL Hygromycin+0.75 µg/mL Puromycin+400 µg/mL Zeocin
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.
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
G418 Sulfate	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/ GM-040401-1
Zeocin	100 mg	Genomeditech/GM-040407-100MG
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
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
Anti-PD1-IL2v Fusion hIgG1 Antibody(2149)	/	Genomeditech/GM-88264AB
H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line	1 管 (5E6 Cells/mL)	Genomeditech/GM-C29055
Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody (Pembio)	/	Genomeditech/GM-87802MAB
Anti-CD25 hIgG1 Antibody(Basiliximab)	/	Genomeditech/GM-52329AB
Anti-CD122 hIgG1 Antibody(HuABC-2)	/	Genomeditech/GM-52319AB
Anti-CD132(IL2RG) Antibody(REGN7257)	hIgG4 /	Genomeditech/GM-52334AB
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 5 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. 激动剂激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat (hPD1 OE) Cell Line 细胞量为 1×10^5 Cells/孔。本次实验使用 Anti-PD1-IL2v Fusion hIgG1 Antibody(2149) (112.7 KDa；以下简称 Anti-PD1-IL2v Fusion (2149))作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 200 nM，5 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.9 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围为 100 μ 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-PD1-IL2v Fusion (2149)	PBS	200 nM	40 nM	8 nM	1.6 nM	320 pM	64 pM	12.8 pM	2.56 pM	512 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

- 在实验前 1-2 h，将细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用适量 Assay Buffer 重悬细胞，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 μ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖上班盖，放入培养箱中备用。
- 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（如 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-PD1-IL2v Fusion (2149)	20.41 μ M	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 75 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 60 μ L 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 1.5 μ L Anti-PD1-IL2v Fusion (2149)），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 15 μL，加入次孔										对照组	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.5 μL Anti-PD1-IL2v Fusion (2149)	加入	75 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 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 15 μ L，加入到第 2 个梯度稀释孔 B3，充分混匀。以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- h) 将步骤 a 准备的细胞孔板取出，加入步骤 g 准备好的梯度稀释液，每孔 50 μ L。
- i) 盖上板盖，于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 16 h。
- j) 使用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。

	0 nM	200 nM	512 fM
H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat (hPD1 OE) Cell Line	47352	495874	40441

3) 验证结果

H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat(hPD1 OE) Cell Line

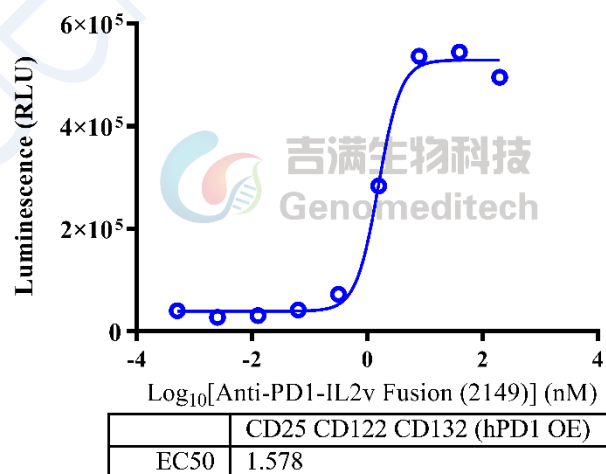


Fig 2.功能验证结果

附录 1: Anti-PD1-IL2v 验证结果

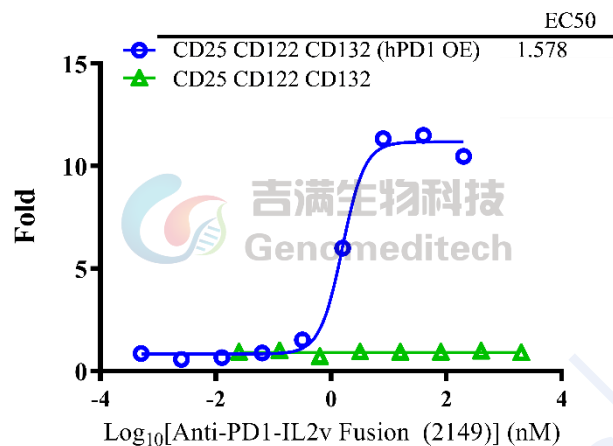


Fig 3. 制备 Anti-PD1-IL2v Fusion hIgG1 Antibody(2149) (Genomeditech/GM-88264AB) 梯度稀释液; 提前 1-2 h 配置 H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat(hPD1 OE) (Genomeditech/GM-C41979)、H_CD25 CD122 CD132 Reporter (Genomeditech/GM-C29055), 每孔细胞量 1×10^5 个。然后分别加入稀释好的 Anti-PD1-IL2v 溶液, 孵育 16 h 后检测 Luciferase 数值, 计算转换为倍率。

附录 2: IL-2 蛋白验证结果

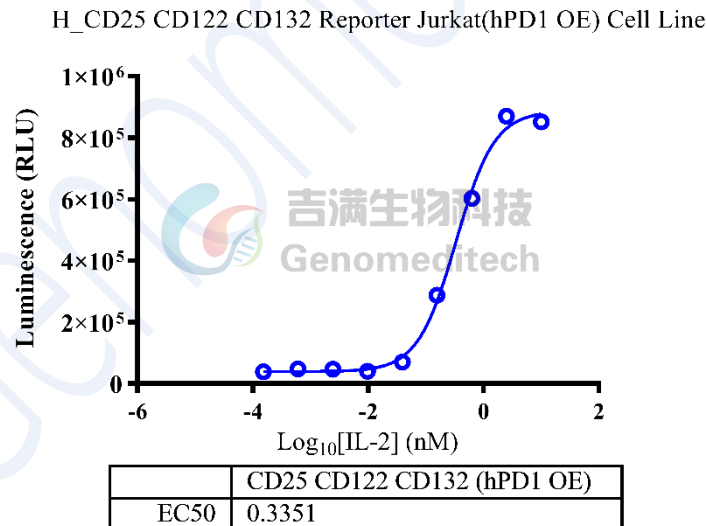


Fig 4. 制备 Recombinant Human IL-2 (Novoprotein/C013) 梯度稀释液; 提前 1-2 h 配置 H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat(hPD1 OE) (Genomeditech/GM-C41979), 每孔细胞量 1×10^5 个。然后加入稀释好的 IL-2 溶液, 孵育 16 h 后检测 Luciferase 数值。

H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line

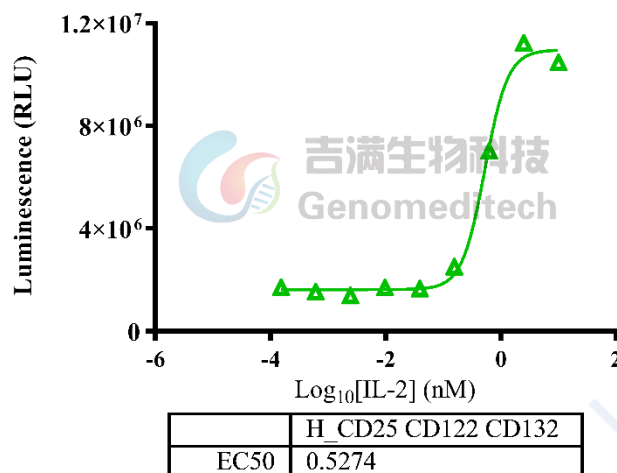


Fig 5. 制备 Recombinant Human IL-2 (Novoprotein/C013) 梯度稀释液; 提前 1-2 h 配置 H_CD25 CD122 CD132 Reporter (Genomeditech/GM-C29055), 每孔细胞量 1×10^5 个。然后加入稀释好的 IL-2 溶液, 孵育 16 h 后检测 Luciferase 数值。

附录 3: 流式验证结果

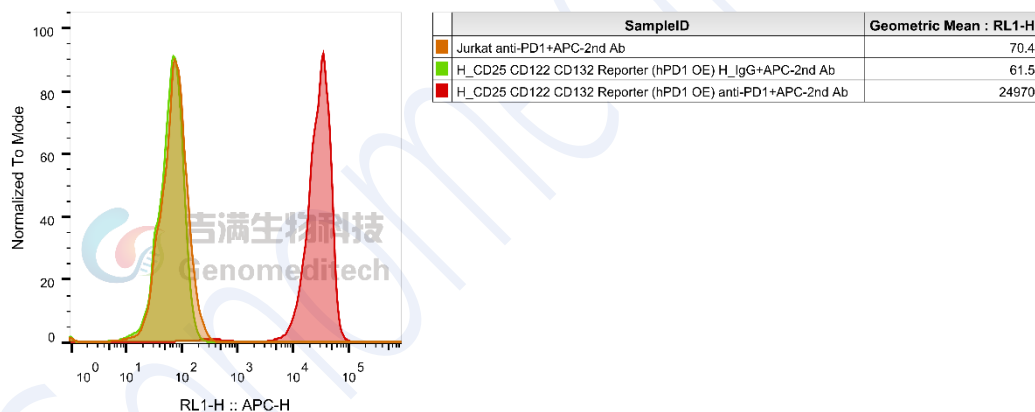


Fig 6.使用 Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody (Pembio) (Genomeditech/GM-87802MAB) 流式验证结果。

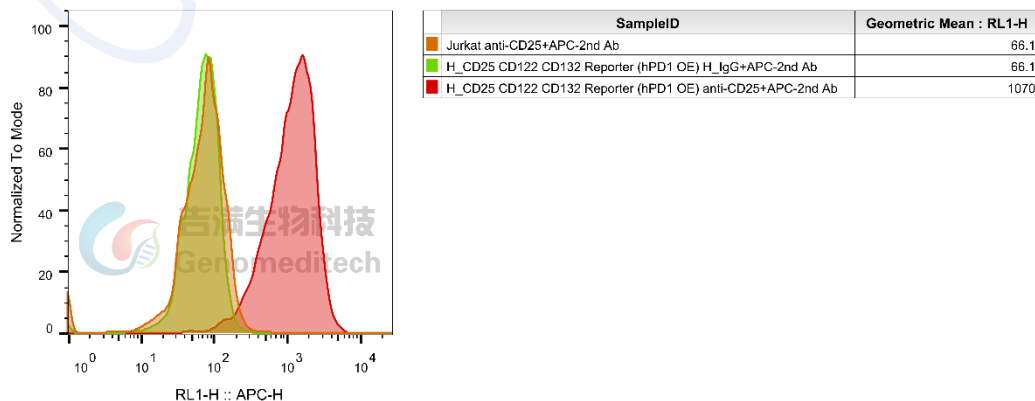


Fig 7.使用 Anti-CD25 hIgG1 Antibody(Basiliximab) (Genomeditech/GM-52329AB) 流式验证结果。

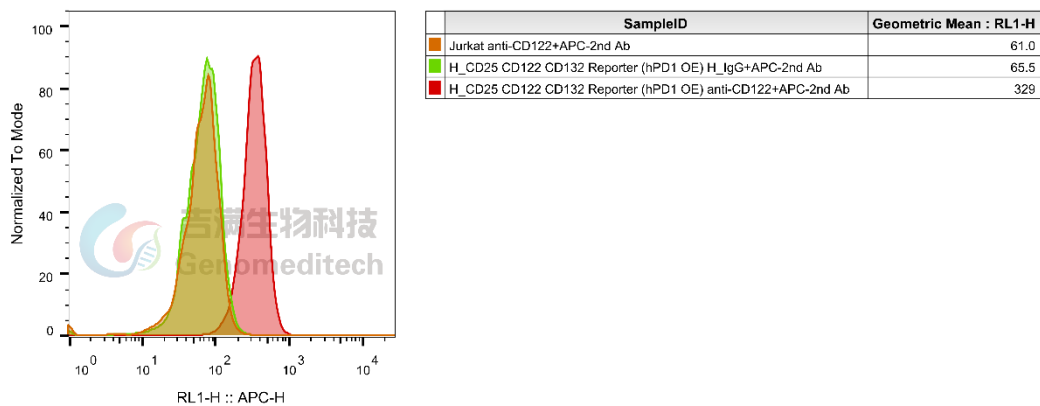


Fig 8.使用 Anti-CD122 hIgG1 Antibody(HuABC-2) (Genomeditech/GM-52319AB) 流式验证结果。

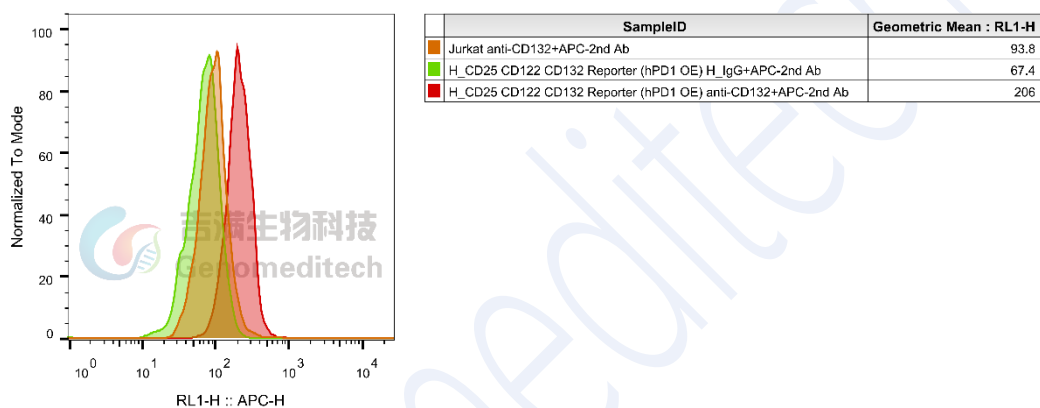


Fig 9.使用 Anti-CD132(IL2RG) hIgG4 Antibody(REGN7257) (Genomeditech/GM-52334AB) 流式验证结果。

相关产品

IL-15	
H_IL15 Reporter Cell Line	Cynomolgus_CD122 HEK-293 Cell Line
H_CD122 CHO-K1 Cell Line	H_CD122 HEK-293 Cell Line
H_CD215(IL15RA) HEK-293 Cell Line	
IL-2	
H_CD122 CD132 Reporter Cell Line	H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line
H_IL2 Reporter Cell Line	H_IL2 Reporter DDX35TM Cell Line
Cynomolgus_CD25 HEK-293 Cell Line	H_CD25 CHO-K1 Cell Line
H_CD25 HEK-293 Cell Line	
Anti-CD122 hIgG1 Antibody(HuABC-2)	Anti-CD132(IL2RG) hIgG4 Antibody(REGN7257)
Anti-CD25 hIgG1 Antibody(Basiliximab)	Anti-mouse CD25 mIgG2a Antibody(PC-61.5.3)
Anti-mouse CD25 RIgG1 Antibody(PC-61.5.3)	

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。