

## 产品手册

### H\_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line

### H\_CTLA4 Reporter Jurkat 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.2

## 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.	功能验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
附录 1	功能结果(Raji).....	10
附录 2	传代稳定性.....	10
附录 3	流式验证结果.....	11
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-C23902	H_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line	5E6 Cells/mL

### 组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C23902	H_CTLA4 Reporter Jurkat 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

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 的潜在生物药物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  $\gamma$ (IFN $\gamma$ )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药物开发环境中建立。

吉满生物 H\_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line 报告基因细胞系, 该细胞稳定表达 H\_CTLA4 基因及 Luciferase 报告基因。当与 H\_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞共培养时, CTLA4/CD80 或 CD86 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, 可用于测定阻断 CTLA-4 相互作用的抗体及其他生物制剂的效能和稳定性。

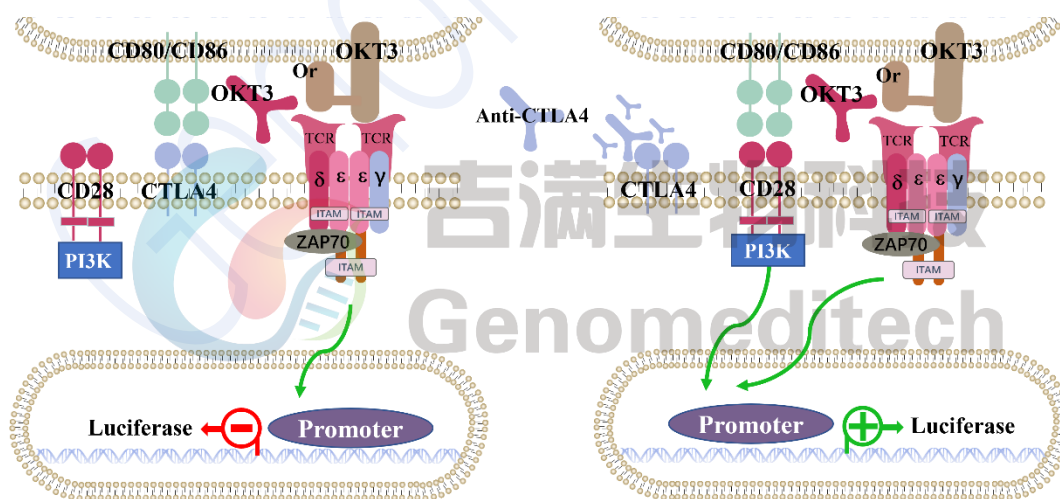


Fig 1.H\_CTLA4 信号通路图

## 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+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	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech /GM-040404-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
96 well round cell culture plate	Plate	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	Plate	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	Plate	Saining/1014010
H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line	1 管 (5E6 Cells/mL)	Genomeditech/GM-C24688
Raji Cell Line	/	Genomeditech/GM-C19100
Anti-H_CTLA-4 hIgG1 Antibody(Ipilimumab)	/	Genomeditech/GM-27203AB
Anti-CD3 epsilon Antibody [OKT-3 (muromonab)]	/	Genomeditech/GM-51478AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	/	Genomeditech/GM-040513

#### 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 × 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 × 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  $5 \times 10^6$  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  $2 \times 10^6$  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 需 56°C 水浴 30 分钟，可热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. 功能验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  cells/孔，H\_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^4$  cells/孔。使用 Anti-H\_CTLA-4 hIgG1 Antibody(Ipilimumab) (约 150 kDa，以下简称 Ipilimumab) 作为阳性抗体。起始浓度(Conc.01)为 60  $\mu\text{g/mL}$ ，3 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  $\mu\text{L}$  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	Ipilimumab	PBS	60.00 $\mu\text{g/mL}$	20.00 $\mu\text{g/mL}$	6.67 $\mu\text{g/mL}$	2.22 $\mu\text{g/mL}$	740.74 $\text{ng/mL}$	246.91 $\text{ng/mL}$	82.30 $\text{ng/mL}$	27.43 $\text{ng/mL}$	9.14 $\text{ng/mL}$	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

- 实验前 16-24 h，将 H\_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 从培养瓶中取出，消化离心收集细胞沉淀，使用适量完全培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以完全培养基调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  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。盖上市盖，于孵箱中孵育过夜使用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 U 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

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-H_CTLA-4 hIgG1 Antibody(Ipilimumab)	0.96 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 U 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 90  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 60  $\mu\text{L}$  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 12.86  $\mu\text{L}$  Ipilimumab），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 30 $\mu\text{L}$ ，加入次孔									对照孔		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	12.86 $\mu\text{L}$ Ipilimumab	加入	90 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 30  $\mu\text{L}$ ，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) 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，调整细胞浓度到  $2 \times 10^6$  cells/mL，以排枪加 50  $\mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔，周围的孔加 100  $\mu\text{L}$  PBS。
- j) 取出步骤 i 准备好的 H\_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line 细胞孔板，分别加入步骤 h 准备好的药物，每孔 50  $\mu\text{L}$ ，孵育 1 h。
- k) 1 h 后，取出步骤 a 的 H\_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞孔板，吸弃上清，然后加入将步骤 j 准备好混合液，每孔 100  $\mu\text{L}$ ，盖上盖板，继续孵育 6 h。
- l) 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line +	0 $\mu\text{g/mL}$	60.00 $\mu\text{g/mL}$	9.14 ng/mL
H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line	287183	7312214	259504

### 3) 验证结果

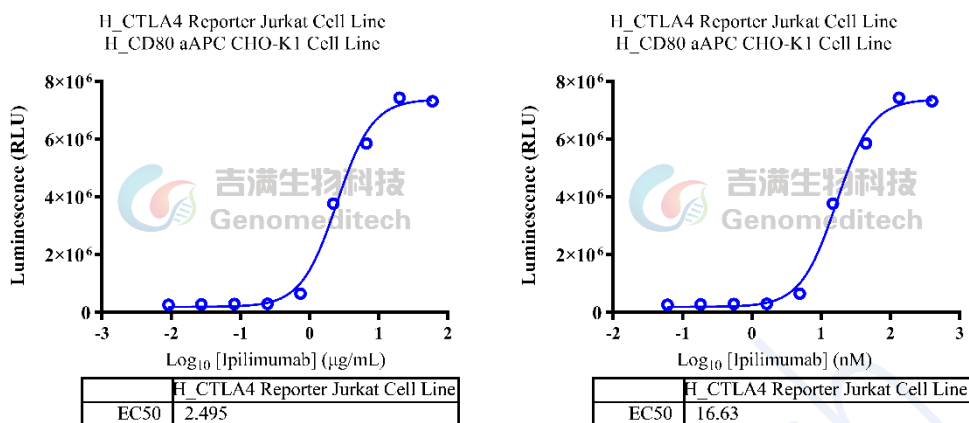


Fig 2. Response to Anti-H\_CTLA-4 hIgG1 Antibody(Ipilimumab) . The H\_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C24688) were seeded at a density of 1E4 cells per well in a 96-well plate and incubated overnight. The next day, serial dilutions of Anti-H\_CTLA-4 hIgG1 Antibody(Ipilimumab)(Cat. GM-27203AB)were incubated with 1E5 cells/well of the H\_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line (Cat. GM-C23902) in a 96-well plate for 1 hour. And then added to the pre-seeded cells, The mixture was incubated for an additional 6 hours. Firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [25.5].

## 附录 1 功能结果(Raji)

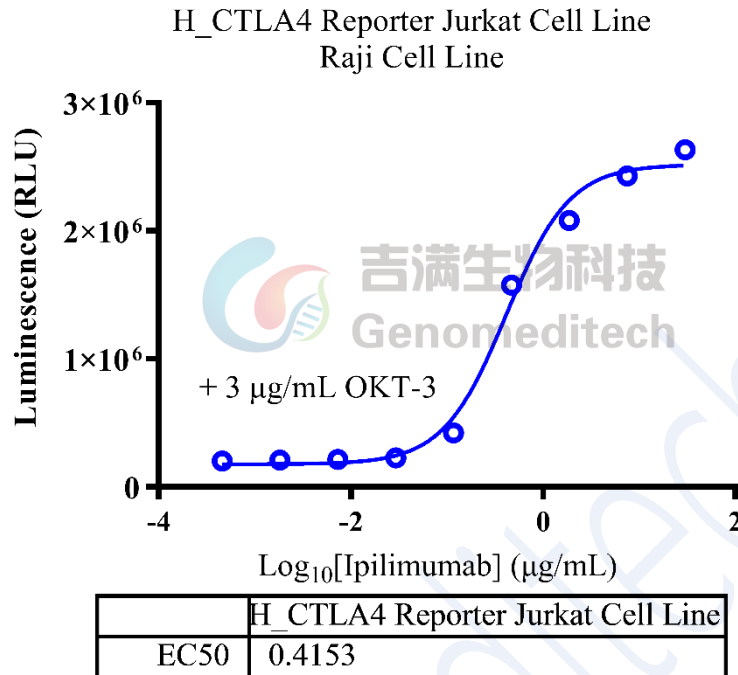


Fig 3. Response to Anti-H\_CTLA-4 hIgG1 Antibody. Serial dilutions of the Anti-H\_CTLA-4 hIgG1 Antibody (Ipilimumab) (Cat. GM-27203AB) were incubated with 1E5 cells/well of the H\_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line (Cat. GM-C23902) in a 96-well plate for 30 minutes, and then 2E4 cells/well Raji Cell Line and 300 ng/well of OKT-3 (Cat. GM-51478AB) were added. The mixture was incubated for an additional 6.5 hours. Firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The results indicated a maximum blocking fold of approximately [13.3].

## 附录 2 传代稳定性

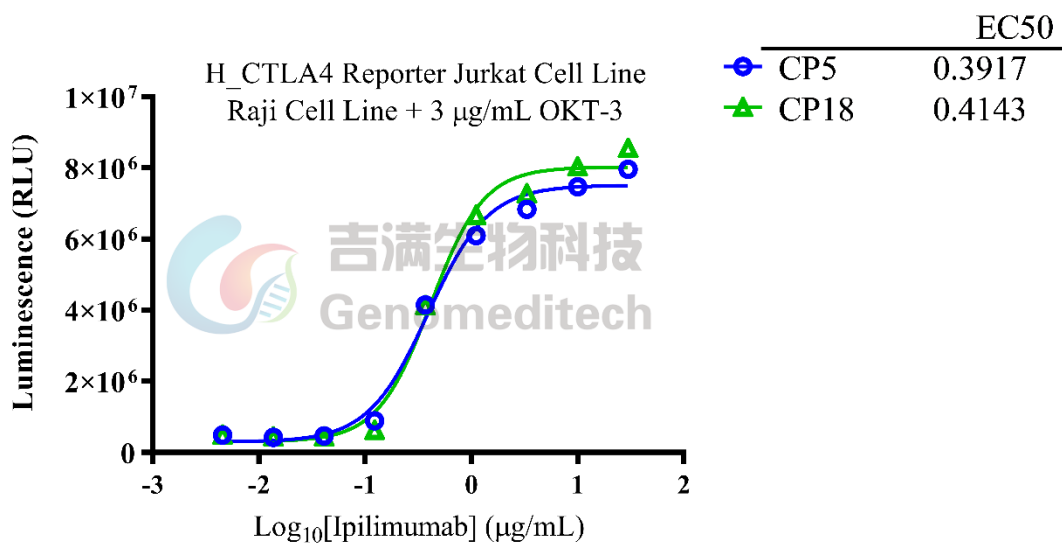


Fig 4. The passage stability of response to Anti-H\_CTLA-4 hIgG1 Antibody. Serial dilutions of the Anti-H\_CTLA-4 hIgG1 Antibody(Ipilimumab) (Cat. GM-27203AB) were incubated with 1E5 cells/well of the passage 5 and 18 of H\_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line (Cat. GM-C23902) in a 96-well plate for 30 minutes, and then 2E4 cells/well Raji Cell Line and 300 ng/well of OKT-3 (Cat. GM-51478AB) were added. The mixture was incubated for an additional 6.5 hours. Firefly luciferase activity is then measured using the GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit (Cat. GM-040503)

### 附录3 流式验证结果

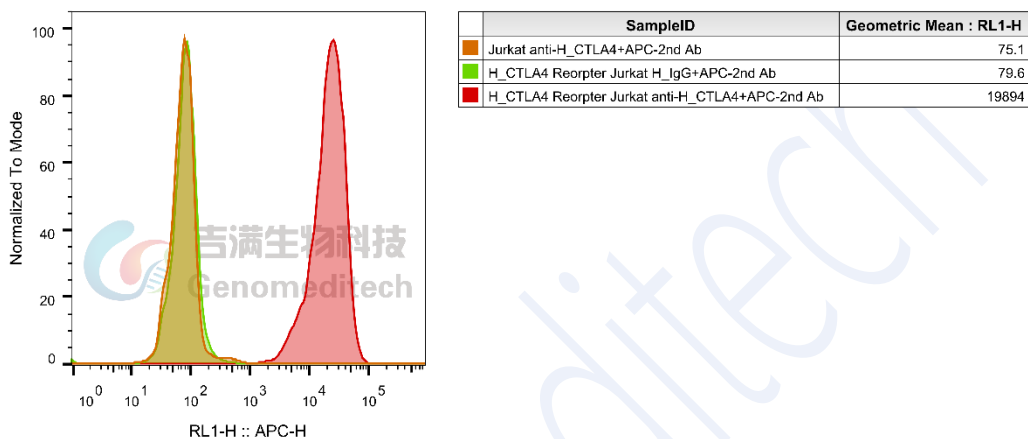


Fig 5. H\_CTLA4 Reporter Jurkat Cell Line (Cat. GM-C23902) was determined by flow cytometry using Anti-H\_CTLA-4 hIgG1 Antibody (Ipilimumab) (Cat. GM-27203AB).

## 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。

Genomeditech