

产品手册

Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line

Mouse_PD-1 Reporter Jurkat 细胞

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.11.2

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、	细胞培养、复苏、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-Anti-PDL1	7
	1) 加样步骤.....	7
	2) 报告基因检测.....	8
	3) 验证结果.....	8
	2. 功能验证实验-Anti-Mouse_PD1	9
	1) 加样步骤.....	9
	2) 报告基因检测.....	11
	3) 验证结果.....	11
	附录一 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 表达情况.....	12
	附录二 Anti-H_CD274(PDL1) cross Mouse_PDL1 验证结果	12
	相关产品.....	13
	使用许可协议:	14

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-C25661	Mouse_PD-1 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-C25661	Mouse_PD-1 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

PD-1 是激活的 T 细胞和 B 细胞表达的一种免疫抑制性受体，在对肿瘤抗体和自身抗原的免疫反应的调节中起关键作用。邻近细胞间的 PD-1 与其配体 PD-L1 或 PD-L2 的相互作用会抑制 TCR 信号通路的传导以及 TCR 介导的细胞增殖、转录激活和细胞因子产生等效应。用于阻断 PD-1/PD-L1 相互作用的治疗抗体和 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。目前用于检测 anti-PD-1 或 anti-PD-L1 生物制品活性的方法依赖于初级人类 T 细胞和功能终点的测量，如细胞增殖、细胞表面标志物表达、干扰素 γ (IFN γ) 和白介素-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 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 报告基因细胞系,该细胞稳定表达 Mouse_PD-1 基因及 Luciferase 报告基因。其配套细胞 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line (Genomeditech/GM-C25791), 是一种稳定表达小鼠 PD-L1 和一种以抗原非依赖方式激活同源 TCR 的细胞表面蛋白的 CHO-K1 细胞。当两种细胞共培养时, PD-1/PD-L1 之间的相互作用会抑制 TCR 信号通路的转导及转录因子介导的 luciferase 表达。加入阻断 PD-1/PD-L1 的抗体后, 这种抑制会被解除, 引起 TCR 信号通路的传导及转录因子介导的 luciferase 的表达, 可用于测定阻断 PD-1/PD-L1 相互作用的抗体及其他生物制剂的效能和稳定性。

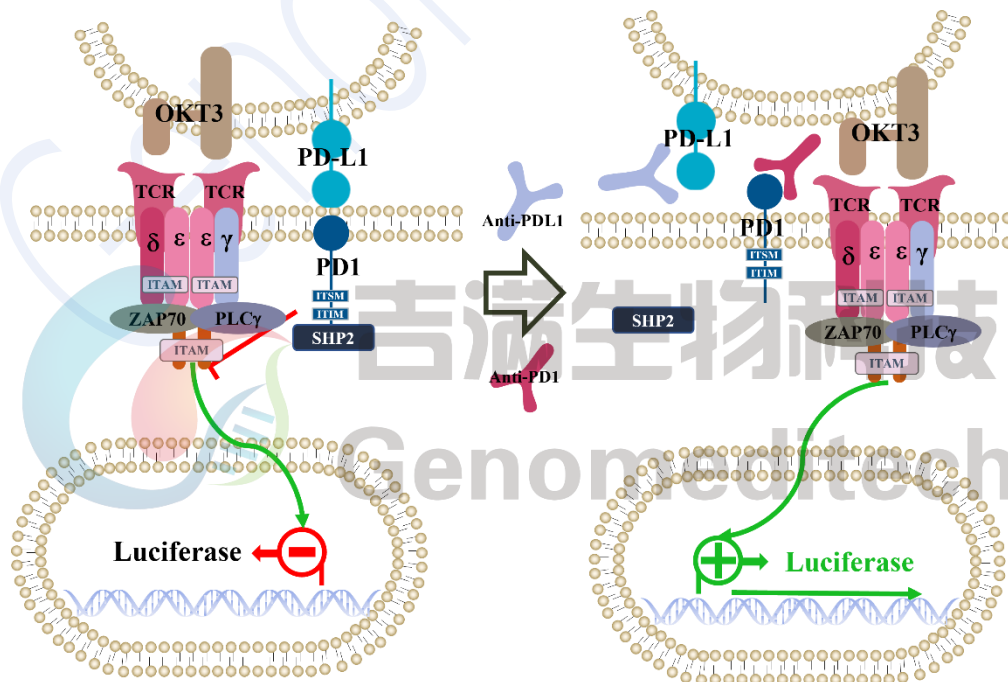


Fig 1. 原理示意图

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+0.75 µg/mL Puromycin+3.5 µg/mL Blasticidin
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	Viva Cell/C3010-0500
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
Pen/Strep	/	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401
Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL	Genomeditech/GM-C25791
Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-31740AB
Anti-Mouse_PD1 mIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-28206AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	Genomeditech/GM-040503C

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

五、 细胞培养、复苏、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. 功能验证实验-Anti-PDL1

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody（以下简称 Anti-PDL1;150 kDa）作为阳性药物。Conc.01 终浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，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	Anti-PDL1	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$	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	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 16-24 h，将 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞从培养瓶中消化下来，以新鲜培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以新鲜培养基调整细胞浓度为 2×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上市盖，于孵箱中孵育过夜。
- 在实验前 1-2 h，将 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用 Assay Buffer 重悬，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，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）。

e) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-PDL1	1.49 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 B2 孔加入 70.4 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 μL 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 B2 中加入 2.95 μL Anti-PDL1），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	2.95 μL Anti-PDL1	加入	70.4 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															

h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.3 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。

i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。

j) 将步骤 a 孵育过夜的 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 孔板取出，每孔吸弃 90 μL 培养基。加入之前准备好的 Anti-PDL1 梯度稀释液，每孔 50 μL ，孵育 1 小时。

k) 1 h 后将步骤 j 细胞孔板取出，B2-B11 每孔加入步骤 b 调整浓度后的细胞，50 μL 。

l) 将混匀后的孔板盖板上盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中继续孵育 6 h。

m) 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。

Mouse_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	457.76 pg/mL
	21645	154601	23435

3) 验证结果

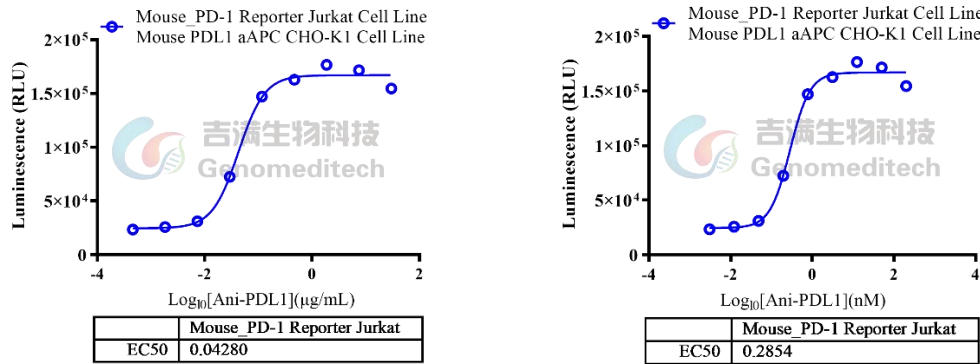


Fig 2. 验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

2. 功能验证实验-Anti-Mouse_PD1

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Anti-Mouse_PD1 mIgG1 Antibody (以下简称 Anti-Mouse_PD1;150 kDa) 作为阳性药物。Conc.01 终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，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	Anti-Mouse_PD1	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$	390.63 ng/mL	97.66 ng/mL	24.41 ng/mL	6.1 ng/mL	1.53 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

- a) 在实验前 16-24 h，将 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞从培养瓶中消化下来，以新鲜培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以新鲜培养基调整细胞浓度为 2×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖板上盖，于孵箱中孵育过夜。

- b) 在实验前 1-2 h, 将 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞从培养瓶中取出, 离心收集细胞沉淀, 使用 Assay Buffer 重悬, 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。盖上车盖, 于孵箱中备用。
- c) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- d) 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B10)。
- e) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-Mouse_PD1	5 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 B2 孔加入 70.4 μ L Assay Buffer, B3-B11 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 B2 中加入 2.95 μ L Anti-Mouse_PD1), 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	2.95 μ L Anti-Mouse_PD1 加入	70.4 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 B2 中吸取 18.3 μ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 充分混匀。
- i) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- j) 将步骤 b Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞孔板从培养箱取出, 加入步骤 i 准备好的 Anti-Mouse_PD1 梯度稀释液, 每孔 50 μ L, 孵育 1 小时。
- k) 1 h 后将步骤 a 孵育过夜的 Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 孔板取出, 每孔吸弃 90 μ L 培养基。加入步骤 j 的混合液, 每孔 100 μ L。
- l) 将混匀后的孔板盖上车盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中继续孵育 6 h。
- m) 使用 ONE-Glo™ 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。

Mouse_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.53 ng/mL
	11496	79968	11886

3) 验证结果

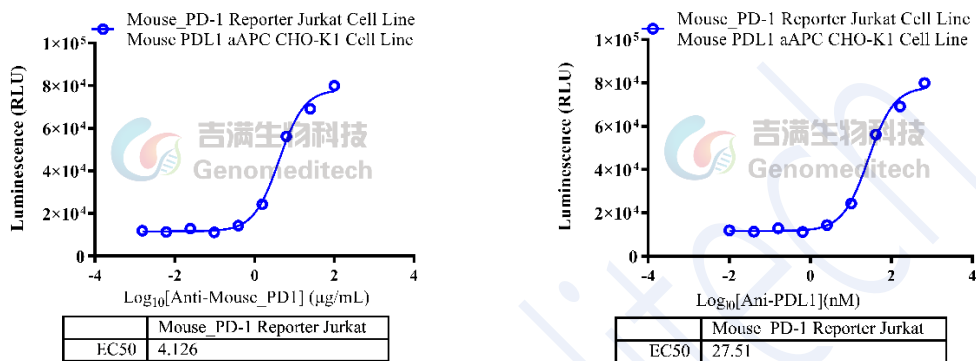


Fig 3. 验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制, ONE-Glo™ Luciferase Assay System /Promega/E6120)

附录一 Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 表达情况

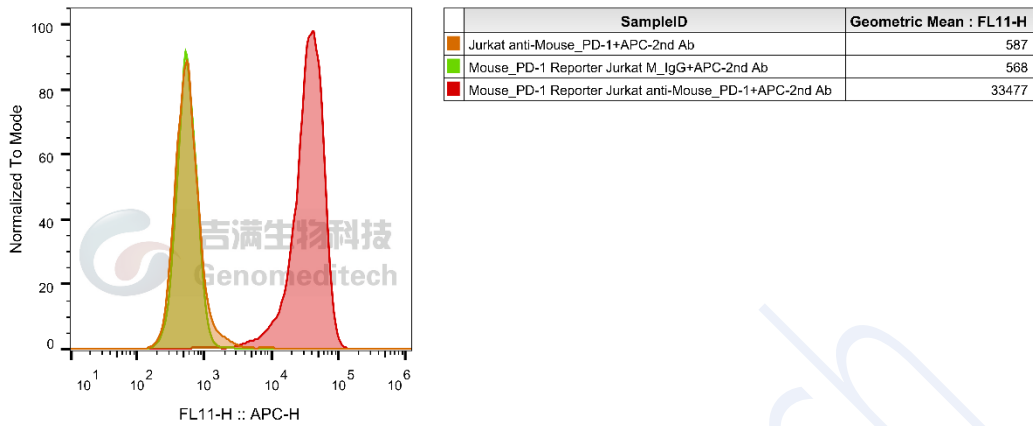


Fig 4. Mouse_PD-1 Reporter Jurkat 细胞使用 Anti-Mouse_PD1 mIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-28206AB) 验证结果

附录二 Anti-H_CD274(PDL1) cross Mouse_PDL1 验证结果

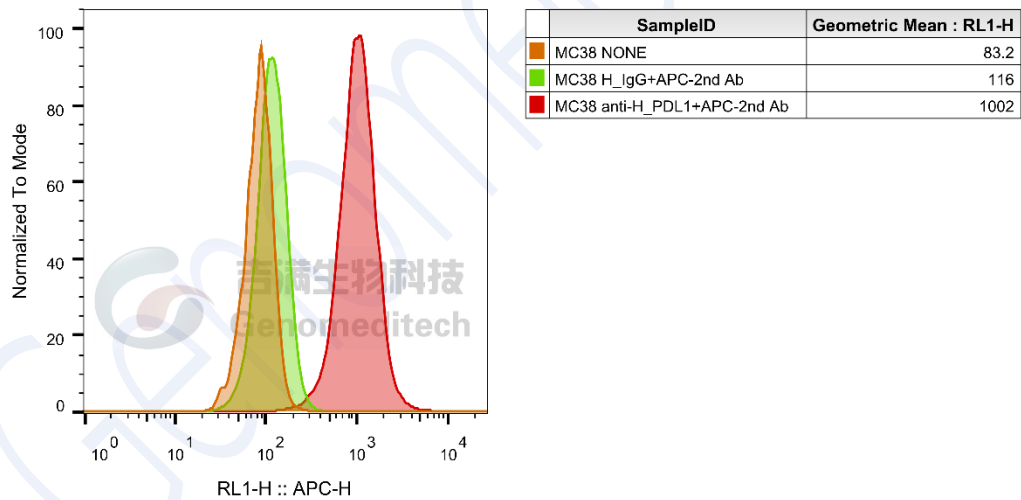


Fig 5.在 MC38 细胞中, 使用 Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-31740AB)验证 Mouse_PDL1 表达

相关产品

PD-1:PD-L1(B7-H1):PDL2	
Mouse_PDL1 KO MC38 Cell Line	aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line
H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line	H_PDCD1LG2(PDL2) aAPC CHO-K1 Cell Line
Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line	Canine_PD-1 HEK-293 Cell Line
Cynomolgus_PD1 CHO-K1 Cell Line	H_CD274(PD-L1) CHO-K1 Cell Line
H_CD274(PD-L1) MC38 Cell Line	H_PDCD1(PD-1) CHO-K1 Cell Line
H_PDCD1LG2(PDL2) CHO-K1 Cell Line	H_PD-L1 HEK-293 Cell Line
H_PDL1 LLC1(mouse_PDL1 KO) Cell Line	H_PDL1 MC38(mouse PDL1 KO) Cell Line
H_PD-L1 Raji Cell Line	M_PDCD1(PD-1) CHO-K1 Cell Line
Anti-Canine_PD1 mIgG2a Antibody(4F12-E6)	Anti-H_CD274(PDL1) Antibody(Atezolizumab) hIgG1
Anti-H_PDCD1(PD1) hIgG1 Antibody(Budigalimab)	Anti-H_PDCD1LG2 mIgG1 Antibody(3G2)
Anti-mouse PD1 RIgG2a Antibody(RMP1-14)	Anti-mouse PD-L1 mIgG1 Antibody(10F.9G2)
Anti-Mouse_PD1 mIgG1 Antibody(29F.1A12)	Anti-mouse_PD1 mIgG1 Antibody(RMP1-14)
Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab)	Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody (Nivbio)
Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody (Pembio)	Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody (Sintbio)
Anti-PD-1 hIgG4 Reference Antibody (Torbio)	Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody(Cambio)
Anti-PD-1 hIgG4 Reference Antibody(Tislbio)	Anti-PD-L1 hIgG1 Reference Antibody(Avebio)
Anti-PDL1 hIgG4 Reference Antibody(Adebio)	Anti-PD-L2 hIgG1 Antibody(Hz25G4-1.1)
Biotinylated Human PD1 Protein; His-Avi Tag	Biotinylated Human PDL1 Protein; His-Avi Tag
Canine PD1 Protein; hFc Tag	Cynomolgus PDL1 Protein; His Tag
Human PD1 Protein; His Tag	Human PDL1 Protein; His Tag

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