

## 产品手册

### H\_OX40 Reporter Cell Line

### H\_OX40 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：V2.11.1

## 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.	Human OX40L 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:	功能稳定性结果.....	9
附录 2:	流式稳定性结果.....	9
相关产品.....		10
使用许可协议: .....		10

## 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-C30855	H_OX40 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-C30855	H_OX40 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

OX40是一种细胞膜上的蛋白质，也被称为CD134。它是一种重要的共刺激分子，主要表达在活化的T细胞和NK细胞上。OX40的信号通路在调节免疫应答过程中起着重要作用。当OX40与其配体结合时，会激活多种信号通路，从而促进T细胞增殖、生存和功能。这种信号通路对于调节免疫细胞的活性和免疫应答的维持至关重要。OX40信号通路也被认为在免疫治疗和免疫调节中具有潜在的应用前景。

吉满生物H\_OX40 Reporter Cell Line报告基因细胞系，是一种Luciferase报告基因细胞系。当 OX40L 蛋白与受体结合后，激活下游信号通路，从而激活荧光素酶（Luciferase）的表达。因此可用于筛选靶向OX40L相关药物的体外效果评价。

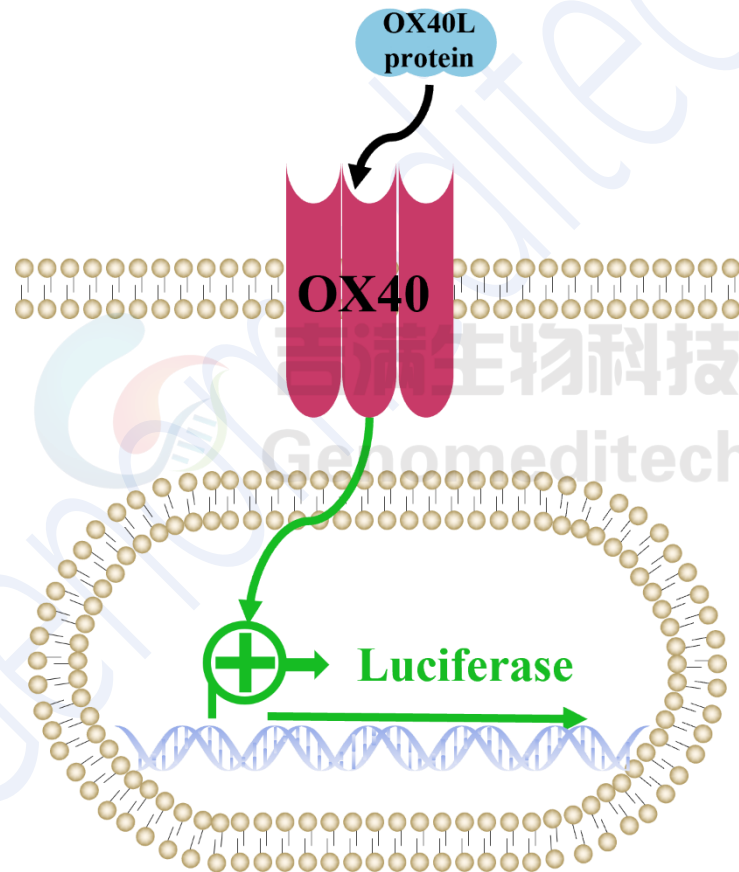


Fig 1.作用原理

## 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+10% 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
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell BIOSCIENCES/C3010-0500
96 Well round Well culture plate	96-Well	NEST/701001
96 孔 U 底细胞培养板	96-well	角端/1014010
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Human OX40L Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-83111RP
Anti-H_OX40 hIgG2 Antibody (Ivuxolimab)	/	Genomeditech/GM-23373AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	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  $5 \times 10^6$  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（避免离心）。
- 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。
- 注意传代过程中避免离心操作，吹打混匀后根据计数情况调整至合适体系培养。
- 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. Human OX40L 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_OX40 Reporter Cell Line 细胞量为  $5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 Human OX40L Protein; His Tag 作为阳性药物（分子量：16.9 KDa；以下简称：Human OX40L），Conc.01 终浓度为  $5 \mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围孔加入  $100 \mu\text{L}$  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	Human OX40L	5 $\mu\text{g/mL}$	1.25 $\mu\text{g/mL}$	312.5 $\text{ng/mL}$	78.13 $\text{ng/mL}$	19.53 $\text{ng/mL}$	4.88 $\text{ng/mL}$	1.22 $\text{ng/mL}$	305.18 $\text{pg/mL}$	76.29 $\text{pg/mL}$	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 1-2 h，将细胞从培养瓶中取出，轻柔吹打混匀后，直接吸取合适体积检测细胞活力并计数。使用 Assay Buffer 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  cells/mL（注意此过程不要离心处理，避免因离心造成细胞机械性损失而导致功能活性不稳定）。以排枪加  $50 \mu\text{L}$  细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加  $100 \mu\text{L}$  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
Human OX40L	1.6 mg/mL	0.16 mg/mL	取 $2 \mu\text{L}$ 储液+ $18 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入  $68.75 \mu\text{L}$  Assay Buffer，B3-B11 孔，加入  $55 \mu\text{L}$  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  $4.58 \mu\text{L}$  Human OX40L），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.33 $\mu\text{L}$ , 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	4.58 $\mu\text{L}$ Human OX40L 加入	68.75 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.33  $\mu\text{L}$ , 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) 将步骤 a 孵育的孔板取出, 加入之前准备好的梯度稀释液, 每孔 50  $\mu\text{L}$ 。
- j) 盖上班盖, 于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养 6 h。
- k) 使用试剂盒检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_OX40 Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	76.29 $\mu\text{g/mL}$
	3021	60526	3532

## 3) 验证结果

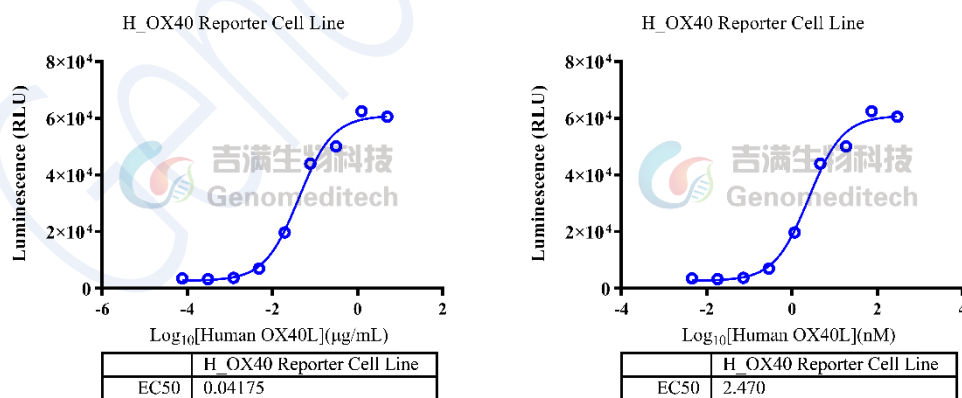


Fig 2. 功能验证结果



## 附录 1: 功能稳定性结果

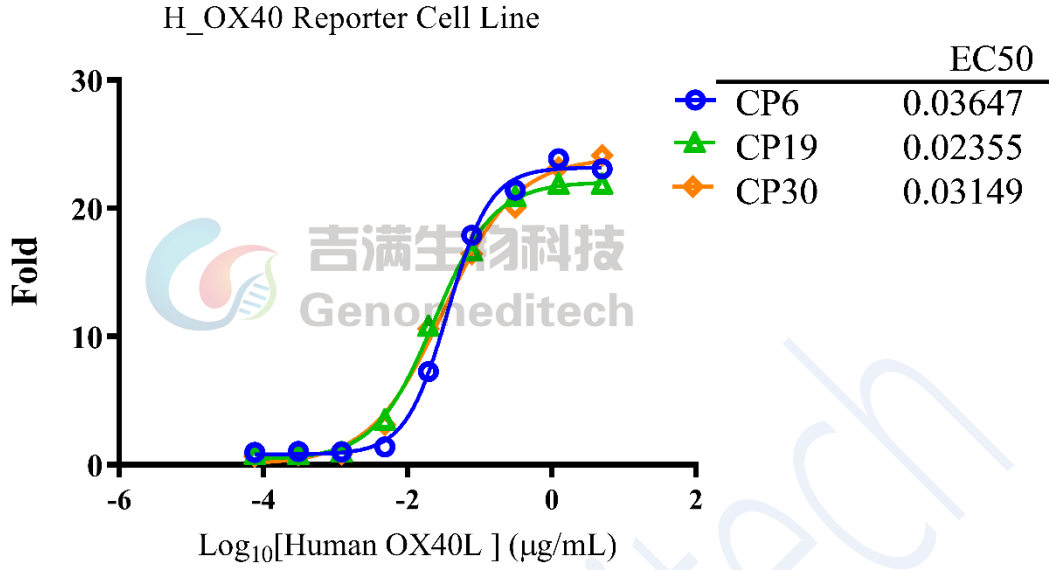


Fig 3. 使用 Human OX40L Protein; His Tag (Genomeditech/GM-83111RP) 功能稳定性验证

## 附录 2: 流式稳定性结果

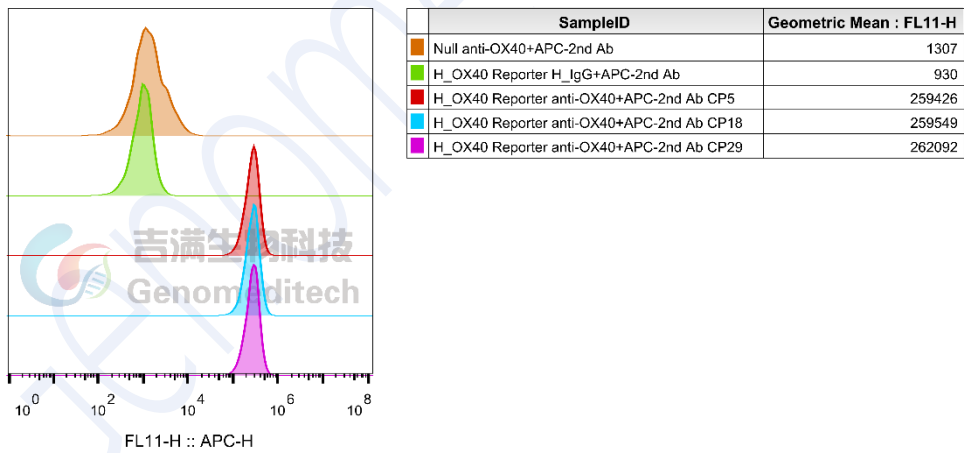


Fig 4. 使用 Anti-H\_OX40 hIgG2 Antibody(Ivuxolimab) (Genomeditech/GM-23373AB) 流式稳定性验证

## 相关产品

OX40	
Cynomolgus_OX40L CHO-K1 Cell Line	H_OX40 CHO-K1 Cell Line
H_OX40L CHO-K1 Cell Line	H_OX40L HEK-293 Cell Line
Anti-H_OX40 hIgG2 Antibody(Ivuxolimab)	Anti-OX40L hIgG1 Reference Antibody(Oxebio)
Anti-OX40L hIgG4 Antibody(Amlitelimab)	Anti-OX40L hIgG4 Reference Antibody(Amlbio)
Biotinylated Human OX40L Protein; His-Avi Tag	Cynomolgus OX40 Protein; His Tag
Cynomolgus OX40L Protein; His Tag	Cynomolgus OX40L Protein; mFc Tag
Human OX40 Protein; His Tag	Human OX40L Protein; His Tag
Human OX40L Protein; mFc Tag	
IL-4/IL-13	
IL-4 Reporter Cell Line	IL-4/IL-13 Reporter 293 Cell Line
IL-4/IL-13 Reporter 293 DDX35TM Cell Line	Cynomolgus_IL4R CHO-K1 Cell Line
H_IL4R CHO-K1 Cell Line	
Anti-IL-4R hIgG1 Antibody(12B5)	Anti-IL4R hIgG4 Antibody(Dupilumab)
Anti-IL4R hIgG4 Reference Antibody (Dupbio)	
Human IL-4R alpha Protein; mFc Tag	
IL-31	
Cynomolgus_IL-31RA OSMR Reporter Baf3 Cell Line	H_IL-31 Reporter Cell Line
Cynomolgus_IL31RA CHO-K1 Cell Line	H_IL31RA CHO-K1 Cell Line
H_IL31RA HEK-293 Cell Line	H_IL-31RA OSMR Baf3 Cell Line
Anti-IL31 hIgG1 Antibody(mAb33)	Anti-IL31RA hIgG1 Antibody(NA633)
Anti-IL31RA hIgG2 Antibody(Nemolizumab)	Anti-OSMR hIgG4 Antibody(Vixarelimab)

## 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。