

技术手册

H_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay

Genomeditech

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.8.3

Table of Contents

一、	产品描述.....	3
二、	产品基本信息及组分.....	4
三、	包装、运输及储存.....	4
四、	细胞信息.....	4
五、	实验仪器及试剂.....	5
1.	试剂和耗材.....	5
2.	重要仪器.....	5
3.	细胞复苏、传代、冻存.....	5
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.....	9
3)	验证结果.....	9
2.	功能验证实验——Anti-PD-1.....	10
1)	加样步骤.....	10
2)	报告基因检测.....	12
3)	验证结果.....	12
	使用许可协议:	13
	附录 PD-L1 Raji 细胞流式结果.....	14

一、 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。

H_PD-1/PDL1 Reporter Blockade Assay 是一种生物相关的、以 MOA (mechanism of action) 为基础的检测方法，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。该试验由两种基因工程细胞系：PD-1 效应细胞(PD-1 Effector Cells)，即稳定表达人 PD-1 受体和转录因子诱导的荧光素酶报告基因的 Jurkat T 细胞；Raji 细胞(H_PD-L1 Raji Cell Line)，是一种稳定表达人 PD-L1、CD80 的细胞。

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诱导的 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诱导的 luciferase 的表达。

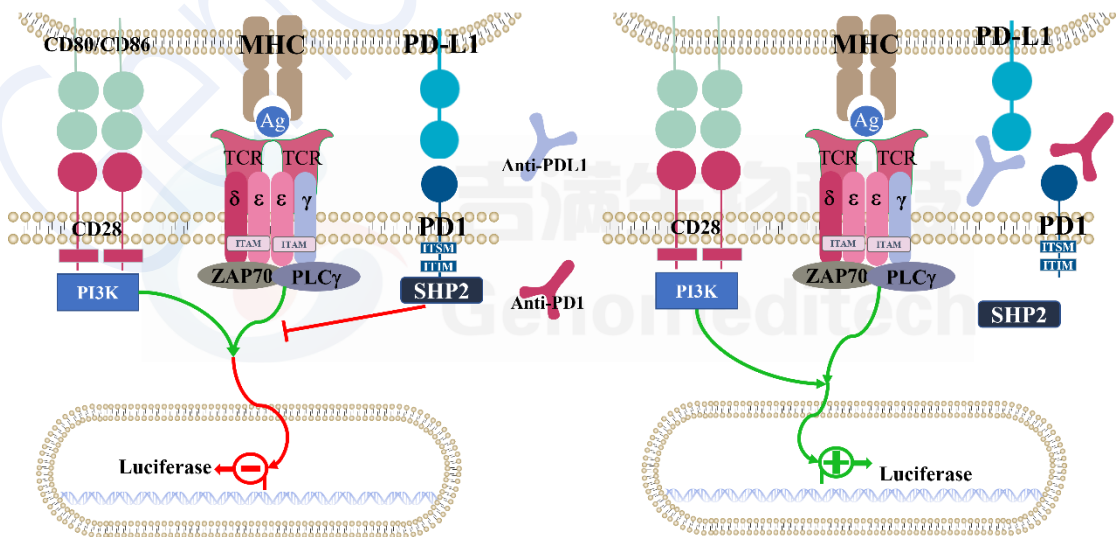


Fig 1. 原理示意图

二、产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-032AS004	H_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay	1 kit

组成成分

名称	Cat.	数量
H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line	GM-C07928	1 管 (5E6 Cell/mL)
H_PD-L1 Raji Cell Line	GM-C03541	1 管 (5E6 Cell/mL)

三、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. 接触产品请戴手套。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。

四、细胞信息

H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line

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

Jurkat 来自中国科学院细胞库，悬浮细胞

H_PD-L1 Raji Cell Line

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 µg/mL Blasticidin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

Raji 来自中国科学院细胞库，悬浮细胞

Assay Buffer

RPMI 1640+1% FBS+1% P.S

五、 实验仪器及试剂

1. 试剂和耗材

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech /GM-040404-1
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell/C3010-0500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
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
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503B
Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-31740AB
Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab)	/	Genomeditech/GM-52674AB
金黄色葡萄球菌肠毒素 (SEE 肠毒素)	1 µg	Genomeditech/GM-H23036

2. 重要仪器

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

3. 细胞复苏、传代、冻存

1) Raji 细胞和 Jurkat 细胞复苏

- a) 细胞冻存密度为 5×10^6 cells/mL, 冻存管分装 1 mL。
- b) 在 37°C 水浴锅预热培养基, 加入预热完全培养基 5 mL 到 15 mL 离心管。
- c) 从液氮中取出冻存的细胞并迅速放入 37°C 恒温水浴锅, 将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。
- d) 用 70% 乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。
- e) 在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到预先加有预热好的 15 mL 离心管中, 轻轻混匀, 1000 rpm, 离心 5 min 使细胞沉淀, 弃上清。
- f) 使用 1 mL 完全培养基重悬细胞沉淀, 可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞。

- g) 调整活细胞密度到 $4-6 \times 10^5$ cells/mL, 将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中 (3-5 mL, 培养面积 25 cm^2), 竖瓶培养。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完全培养基。若 48 h 未传代, 建议适当补加培养基, 瓶体改为横向放置。
- 2) Raji 细胞和 Jurkat 细胞传代
- a) 推荐细胞接种密度在 $2.5-4 \times 10^5$ cells/mL, 对于 Raji 细胞而言, 当细胞密度达到 $1-1.2 \times 10^6$ cells/mL、1 传 3-1 传 4, 2-3 天传代, 不要让其密度超 1.5×10^6 cells/mL。对于 Jurkat 细胞而言, 当细胞密度达到 $1.5-2 \times 10^6$ cells/mL 时进行传代, 1 传 3, 2-3 天传代, 不要让其密度超过 2×10^6 cells/mL。推荐使用 T25 瓶进行传代培养, 也可通过计数控制细胞传代密度。
- b) 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新鲜培养液, 然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。
- c) 细胞倍增率稳定后再用于检测或冻存, 一般在 7-10 天左右。常规的稳定倍增率是 24 ± 8 小时。细胞在 20 代之内能够保持其功能。增殖时一般细胞活力在 80%。
- 3) Raji 细胞和 Jurkat 细胞冻存
- a) 细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO。
- b) 使用 1000 rpm, 3 min 离心收集细胞。
- c) 使用预冷细胞冻存液重悬细胞, 细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL。
- d) 每管 1 mL 分装到细胞冻存管中, 冻存体积为 1 mL, 冻存密度为 5×10^6 cells/mL。拧紧盖子, 适当标记后, 将细胞冻存管置于梯度降温盒中, 在 -80°C 下保存至少 1 天, 尽快转移至液氮中。

六、 使用方法

1. 功能验证实验——Anti-PDL1

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 2×10^4 cells/Well 的 H_PD-L1 Raji Cell Line (接种密度)进行实验。

本实验使用 Anti-PDL1 (150 kDa) 作为阳性药物, 起始浓度(Conc.01)为 15 $\mu\text{g/mL}$, 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10。周围为 100 μL 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												
B	Anti-PDL1	15 $\mu\text{g/mL}$	3.75 $\mu\text{g/mL}$	937.5 ng/mL	234.38 ng/mL	58.59 ng/mL	14.65 ng/mL	3.66 ng/mL	915.53 pg/mL	228.88 pg/mL	0	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

针对不同抗体样品和细胞的话, 可调整优化操作步骤以获得更好的结果。如果是针对固定的抗体和细胞进行检测, 建议先优化两种细胞之间的比例。

1) 加样步骤

- 在实验前 1-2 h, 离心收集 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞, 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 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞浓度为 4×10^6 cells/mL, 调整 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞浓度为 8×10^5 cells/mL。准备两个 96 孔板, 两株细胞以排枪加 25 μL 细胞/孔至两个孔板的 10 个孔。周围的孔加 100 μL PBS。孵育箱中孵育待用。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品, 使用一行 (如 B 行, 单重复可以检测 6 个药物)。
- 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。以 Anti-PDL1 为例, 如 B2 孔中加入 35.9 μL 的 Assay buffer, B3-B11 加入 27.5 μL 的 Assay Buffer。

e) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-PDL1	2.8 mg/mL	/	直接使用储液
SEE	0.4 mg/mL	0.004 mg/mL	2 μ L 储液+198 μ 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）。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 9.2 μ L，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.8 μ L Anti-PDL1	加入	35.9 μ L	27.5 μ L	27.5 μ L	27.5 μ L	27.5 μ L	27.5 μ L	27.5 μ L	27.5 μ L	27.5 μ L	27.5 μ L	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

g) 在 B2 孔中加入 0.8 μ L 的 Anti-PDL1 抗体，混匀。对于不同浓度的抗体，首孔加入抗体量不同，首孔后的梯度稀释操作是相同的，可以使用排枪进行实验。

h) 以此类推，直至 B10 孔，B11 为不加抗体的对照。

i) 将步骤 a 准备好的 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞孔板取出，每孔加 25 μ L 梯度稀释的抗体，孵育 30 min。

j) 配置 5 ng/mL 的 SEE（4 \times 激活浓度）：取 2.75 μ L 的 0.004 mg/mL SEE，加入到 550 μ L Assay Buffer 中，混匀

k) 将步骤 a 准备好的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞孔板取出，每孔加 25 μ L 步骤 j 配置好的 SEE，孵育 30 min。

l) 30 min 后，使用排枪将孵育好的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line 混合孵育（50 μ L+50 μ L）。

m) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 16 h。

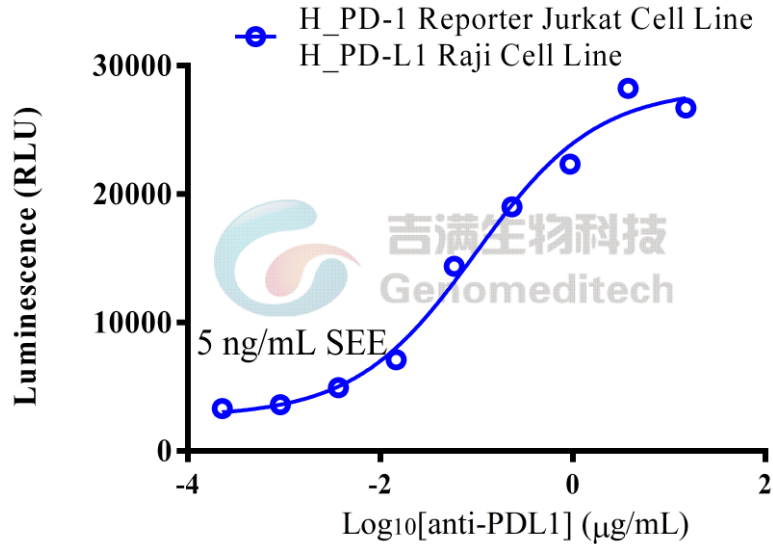
n) 使用报告基因试剂检测，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

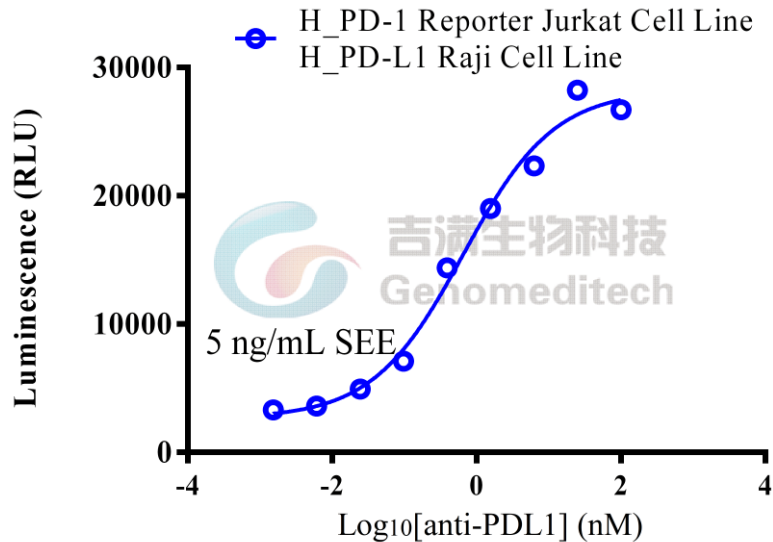
参考报告基因检测说明书。

H_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay	0 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$	228.88 pg/mL
	3234	26710	3318

3) 验证结果



	H_PD-1 PDL1 Assay
EC50	0.09857



	H_PD-1 PDL1 Assay
EC50	0.6571

Fig2. 使用 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line, 验证 Anti-PDL1 的结果示例
 (下图对药物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-PD-1

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 2×10^4 cells/Well 的 H_PD-L1 Raji Cell Line (接种密度)进行实验。

本实验使用 Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab) (150 kDa; 以下简称为 Pembrolizumab) 作为阳性药物, Human IgG Antibody (150 kDa; 以下简称为 IgG Antibody) 作为阴性对照, 以 Pembrolizumab 为例, 起始终浓度(Conc.01)为 50 $\mu\text{g/mL}$, 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10。周围为 100 μL 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												
B	Pembrolizumab	50 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	3.13 $\mu\text{g/mL}$	781.25 ng/mL	195.31 ng/mL	48.83 ng/mL	12.21 ng/mL	3.05 ng/mL	762.94 pg/mL	0	
C	IgG Antibody	30 $\mu\text{g/mL}$	7.5 $\mu\text{g/mL}$	1.88 $\mu\text{g/mL}$	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	
D												
E												
F												
G												
H												

针对不同抗体样品和细胞的话, 可调整优化操作步骤以获得更好的结果。如果是针对固定的抗体和细胞进行检测, 建议先优化两种细胞之间的比例。

1) 加样步骤

- 在实验前 1-2 h, 离心收集 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞, 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 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞浓度为 4×10^6 cells/mL, 调整 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞浓度为 8×10^5 cells/mL。准备两个 96 孔板, H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞以排枪加 25 μL 细胞/孔至中间 20 个孔, H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞以排枪加 25 μL 细胞/孔至另一个 96 孔板的中间 20 个孔。周围的孔加 100 μL PBS。孵育箱中孵育待用。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品, 使用一行 (如 B 行, 单重复可以检测 6 个药物)。
- 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。以 Pembrolizumab 为例, 如 B2 孔中加入

27.2 μL 的 Assay buffer, B3-B11 加入 27.5 μL 的 Assay Buffer。

e) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Pembrolizumab	0.77 mg/mL	/	直接使用储液
IgG Antibody	1 mg/mL	/	直接使用储液
SEE	0.4 mg/mL	0.004 mg/mL	2 μL 储液+198 μL 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）。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 9.2 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	9.5 μL Pembrolizumab 加入		27.2 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	
C	4.4 μL IgG Antibody 加入		32.3 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	
D													
E													
F													
G													
H													

g) 在 B2 孔中加入 9.5 μL 的 Pembrolizumab，混匀。对于不同浓度的抗体，首孔加入抗体量不同，首孔后的梯度稀释操作是相同的，可以使用排枪进行实验。

h) 以此类推，直至 B10 孔，B11 为不加抗体的对照。

i) 将步骤 a 准备好的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞孔板取出，每孔加 25 μL 梯度稀释的抗体，孵育 30 min。

j) 配置 SEE（4 \times 激活浓度）：取 2.75 μL 的 0.004 mg/mL SEE，加入到 550 μL Assay Buffer 中，混匀。

k) 将步骤 a 准备好的 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞孔板取出，每孔加 25 μL 步骤 j 配置好的 SEE，孵育 30 min。

l) 30 min 后，使用排枪将孵育好的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line 混合孵育（50 μL +50 μL ）。

m) 盖上检测板盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养 16 h。

n) 使用 GMSOne-step 报告基因试剂检测，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay+Pembrolizumab	0 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	762.94 pg/mL
	6131	40546	6249
H_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay-IgG Antibody	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	457.76 pg/mL
	6057	6891	6072

3) 验证结果

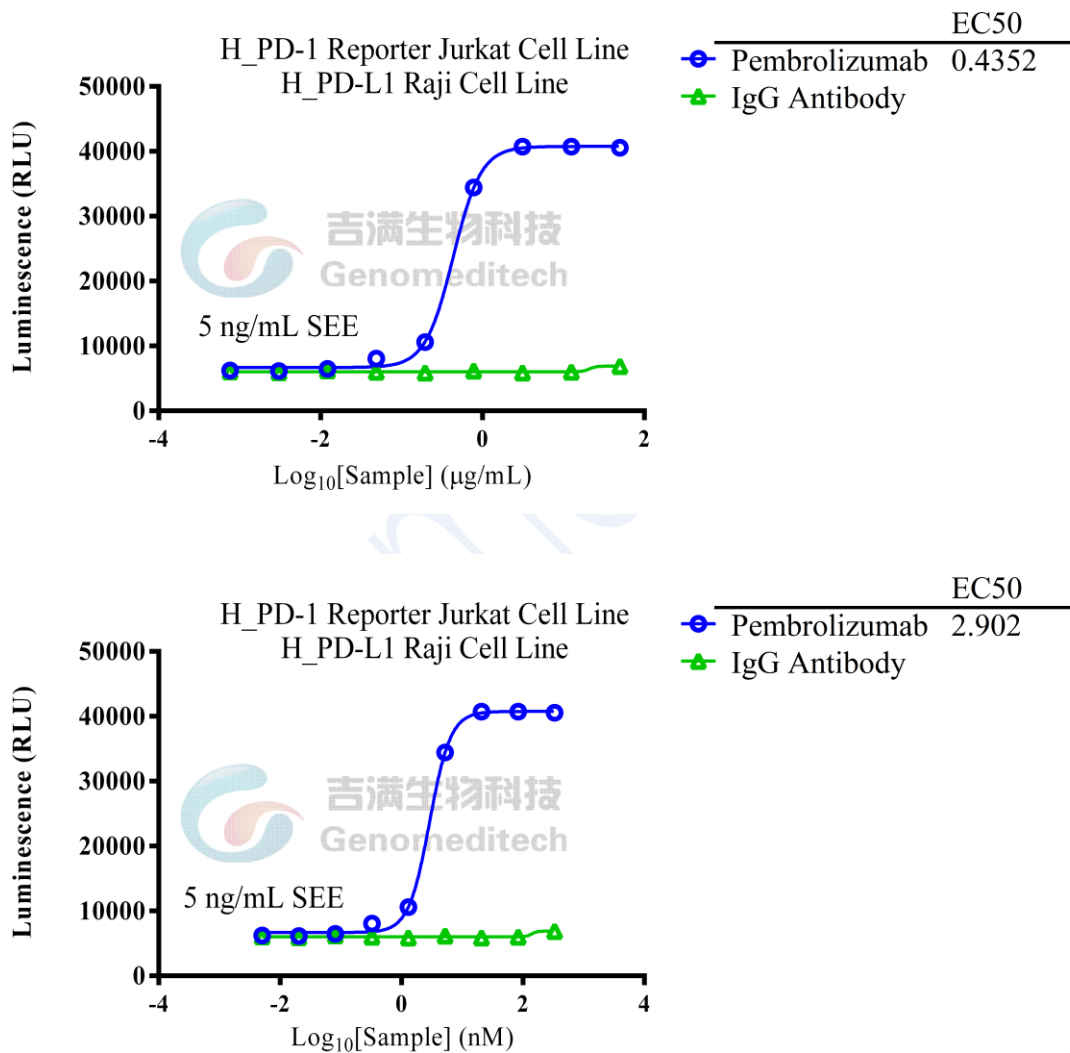


Fig 3. 使用 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line, 验证 Anti-PD-1 的结果示例
 (下图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

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

附录 PD-L1 Raji 细胞流式结果

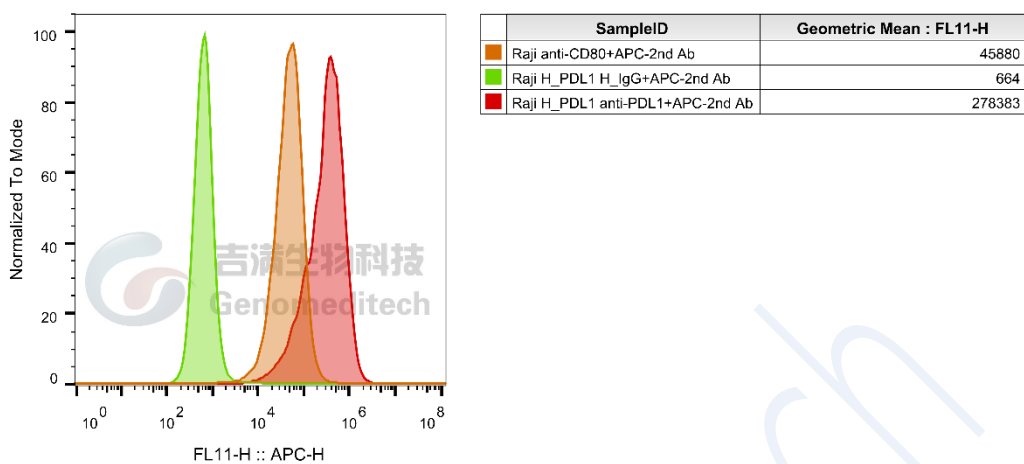


Fig 4. 使用 Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody(Atezolizumab)(Genomeditech/GM-31740AB)和 Anti-H_CD80 hIgG1 Antibody(Galiximab)(Genomeditech/GM-46075AB)验证 PD-L1 Raji 细胞稳定表达 PD-L1 和 CD80