

## 产品手册

### ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line

### ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat 效应细胞

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.3

## 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. Assay 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. 概要.....	7
	2. 以靶细胞为贴壁细胞举例说明.....	7
	1) 试剂准备.....	7
	2) 准备并接种靶细胞.....	7
	3) 抗体梯度稀释.....	8
	4) 准备 ADCC Bioassay 效应细胞.....	9
	5) 加入抗体和 ADCC Bioassay 效应细胞.....	9
	6) 报告基因检测.....	10
	7) 验证结果.....	10
	3. 以靶细胞悬浮细胞举例说明.....	11
	1) 试剂准备.....	11
	2) 准备并接种靶细胞.....	11
	3) 抗体梯度稀释.....	11
	4) 准备 ADCC Bioassay 效应细胞.....	12
	5) 加入抗体和 ADCC Bioassay 效应细胞.....	12
	6) 报告基因检测.....	12
	7) 验证结果.....	12
	附录一 传代稳定性.....	13
	附录二 实例.....	13
	附录三 Raji 本底验证.....	14
	附录四 CD16A 的表达.....	14
	使用许可协议: .....	15

## 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-C05619	ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line	5E6 Cells/mL

### 组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C05619	ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector 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

ADCC 即抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 是指表达 Fc 受体的免疫细胞通过识别抗体的 Fc 段直接杀伤与抗体特异性结合的靶细胞的作用。现如今, ADCC 作用机制被用来检测、评定抗体或靶细胞的功效。抗体与细胞表面上的目标抗原结合。如果抗体的 Fc 段同时结合到效应细胞 (主要为自然杀伤细胞, natural killer cells) 表面的  $Fc\gamma RIIIa$  受体上, 两种类型的细胞即发生多重交联, 导致 ADCC 作用机制通路的激活。靶细胞的杀伤是此活化途径的终点, 这一指标被用在经典的 ADCC 生物活性检测中, 这些经典的检测方法利用供者的外周血单核细胞 (PBMC) 或自然杀伤 (NK) 细胞亚群作为效应细胞。这些细胞的应答变异性很大, 难于制备, 并容易引起很高的背景读数。

ADCC Reporter 细胞系选择了 ADCC 作用机制通路激活过程中较早的事件作为检测的读出指标: 即效应细胞中由转录因子介导的基因转录的激活。此外, ADCC 报告基因检测试剂盒使用工程改造的 Jurkat 细胞作为效应细胞, 该细胞稳定表达了  $Fc\gamma RIIIa$  受体(高亲和 158V)和由转录因子驱动表达的萤火虫萤光素酶。抗体在 ADCC 作用机制中的生物活性通过转录因子活化产生的萤光素酶定量, 而效应细胞中的萤光素酶活性通过生物发光读数定量。检测的信号值高, 且背景很低。

吉满生物依靠多年研究经验, 利用巧妙的载体设计和第三代慢病毒报告基因系统, 推出 ADCC 相关细胞系和 ADCC 活性检测服务, 并可接受 ADCC 细胞系定制服务。

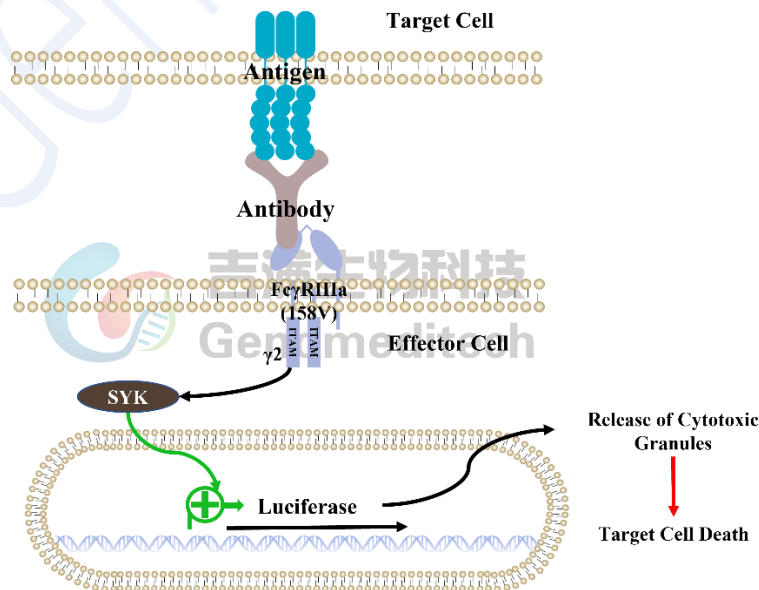


Fig 1. ADCC 原理示意图

## 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 Blastincidin
细胞冻存液:	FBS+10% DMSO
缓冲液:	RPMI 1640+1% FBS+1% P.S

### 2. Assay 试剂耗材准备

#### 试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10mg	Genomeditech/GM-040404-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI-1640	500 mL	Viva Cell/C3010-0500
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	96-well	Corning/3912
Not Treated Microplate		
Luciferase Assay Kit	100 tests	Genomeditech/GM-040501A
Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-34137AB
Rituximab	/	Expression
PE anti-human CD16 Antibody	25 tests	biolegend/302007

#### 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 × 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 × 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,待细胞状态稳定后开始细胞维持和繁殖,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。

## 六、 使用方法

### 1. 概要

- a) 针对不同抗体样品，操作步骤可调整优化。如果是针对固定的抗体和靶细胞进行检测，建议先优化 E:T (效应细胞:靶细胞)比例，固定 ADCC 效应细胞数目  $1.5 \times 10^5$ /Well(96 孔板)，调整靶细胞数。对于贴壁靶细胞推荐的 E:T ratios 为 10:1( $1.5 \times 10^5$  效应细胞 :  $1.5 \times 10^4$  靶细胞)。对于悬浮靶细胞推荐的 E:T ratios 为 6:1( $1.5 \times 10^5$  效应细胞 :  $2.5 \times 10^4$  靶细胞)。
- b) 针对不同抗体，诱导时间可在 6-24 h 调整获得最佳诱导时间。

### 2. 以靶细胞为贴壁细胞举例说明

#### 1) 试剂准备

- a) 缓冲液:

检测当天制备适量缓冲液，使用前预温至  $37^\circ\text{C}$ 。

注: 配方针对大部分靶细胞，推荐缓冲液。如果使用中发现细胞活力或检测问题，可在 0.5-10% 范围内优化血清浓度。

- b) 梯度稀释阳性抗体和待测抗体:

可以根据以前传统 ADCC 细胞毒性试验的测试结果，确定阳性抗体和两个待测抗体样品的起始浓度 ( $2\times$ )。如果测试抗体的工作浓度是未知的，用  $15 \mu\text{g/mL}$  的起始浓度，之后根据实验数据再调整。

#### 2) 准备并接种靶细胞

尝试在 2.5:1 到 25:1 的范围内优化 ADCC 效应细胞和靶细胞比例( E:T ratios)。保持 ADCC Bioassay 效应细胞密度不变，调整靶细胞浓度。作为参考，我们使用  $1.5 \times 10^5$  Cells/Well 的 ADCC Bioassay 效应细胞和  $1.5 \times 10^4$  Cells/Well 的靶细胞(接种密度)。最终孔板排布见下图。



	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-CLDN18.2 hIgG1 Antibody	15 µg/mL	3.75 µg/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	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D												
E												
F												
G												
H												

若检测抗体数量较多，可参考以下孔板排布：

	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	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
C	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
D	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
E	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
F	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
G	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

在实验前 20-24 h, 将靶细胞 H\_CLDN18.2 CHO-K1 cell line (Genomeditech/ GM-C05273) 从培养瓶中消化下来, 以完全培养基重悬细胞, 检测细胞活力并计数。离心 130–200 ×g (根据不同细胞可调整转速) 收集细胞, 再以新鲜培养基调整细胞浓度为  $1.5 \times 10^5$  Cells/mL。以排枪加 100 µL 细胞/孔至中间 60 个孔。周围的孔加 100 µL PBS。盖上市板盖, 于孵箱中孵育过夜。

### 3) 抗体梯度稀释

为了得到 ADCC 检测完整的量效范围, 建议可根据之前实验方法, 如 ADCC 毒性检测, 得到的结果确定起始浓度和梯度稀释的优化方案。下面对于阳性抗体和待测抗体以 4 倍梯度稀释举例操作。稀释比例可优化调整。以 Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody (0.35 mg/mL; 150 kDa), 起始浓度为 15 µg/mL, 单复孔为例。



- a) 如下表, 使用无菌低吸附 96 孔 V 底板准备实验。每个待测样品, 使用一行 (如 B2-B10 行, 单重复可以检测 6 个抗体)。如在 B2 孔中加入 67  $\mu\text{L}$  的缓冲液, B3-B11 加入 55  $\mu\text{L}$  的缓冲液。

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	6.29 $\mu\text{L}$ Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody	加入	67 $\mu\text{L}$	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												

- b) 在 B2 孔中加入 6.29  $\mu\text{L}$  的 Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody 抗体, 混匀。此时 B2 孔的抗体浓度为 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $2\times$ 浓度)。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。
- c) 从 B2 孔吸取 18.33  $\mu\text{L}$  液体, 加入到 B3, 充分混匀。
- d) 从 B3 孔吸取 18.33  $\mu\text{L}$  液体, 加入到 B4, 充分混匀。
- e) 以此类推, 直至 B10 孔, B11 为不加抗体的对照。
- f) 将装有稀释好的抗体的多孔板盖上盖, 之后准备效应细胞。

#### 4) 准备 ADCC Bioassay 效应细胞

- a) 以缓冲液重悬细胞, 计数后调整至  $3 \times 10^6$  cells/mL。

#### 5) 加入抗体和 ADCC Bioassay 效应细胞

- a) 步骤 2 接种过夜的靶细胞, 每孔吸弃 100  $\mu\text{L}$  培养基。
- b) 以排枪加入准备好的 ADCC Fc $\gamma$ RIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line 细胞 50  $\mu\text{L}$ , 150,000 细胞/孔( $1.5 \times 10^5$  Cells/Well)。
- c) 将之前准备好的抗体梯度稀释液以排枪每孔加入 50  $\mu\text{L}$ 。
- d) 盖上检测板盖, 于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h。

## 6) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line+Anti-CLDN18.2	0 μg/mL	15 μg/mL	228.88 pg/mL
	11008	547705	16519

## 7) 验证结果

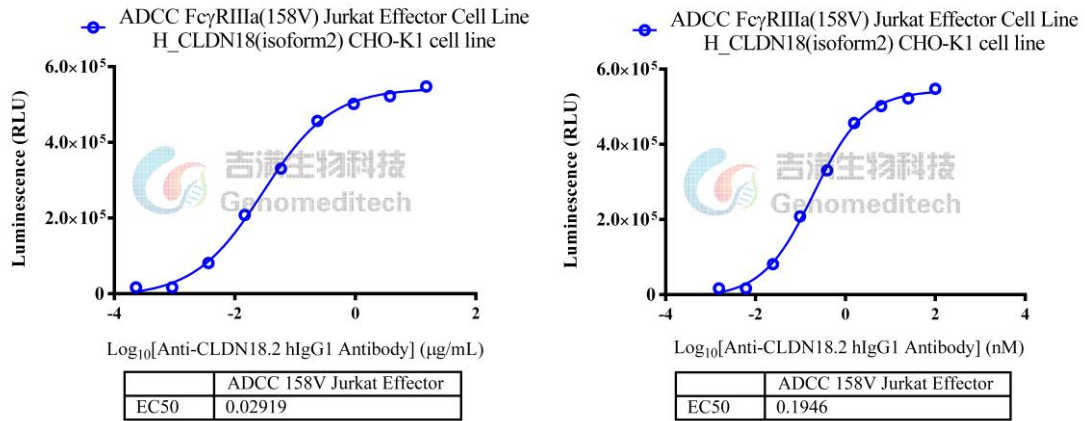


Fig 2. 使用 ADCC 效应细胞，验证抗体的结果示例  
(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

### 3. 以靶细胞悬浮细胞举例说明

#### 1) 试剂准备

同贴壁细胞。

#### 2) 准备并接种靶细胞

尝试在 2.5:1 到 25:1 的范围内优化 ADCC 效应细胞和靶细胞比例( E:T ratios)。保持 ADCC Bioassay 效应细胞密度不变,调整靶细胞浓度。作为参考,我们使用  $1.5 \times 10^5$  Cells/Well 的 ADCC Bioassay 效应细胞和  $2.5 \times 10^4$  Cells/Well 的靶细胞。最终孔板同贴壁细胞。

在实验前 2-4 h,以新鲜培养基重悬 Raji 靶细胞,检测靶细胞活力并计数。离心 130–200 ×g (根据不同细胞可调整转速)收集细胞,再以缓冲液调整靶细胞浓度为  $7.6 \times 10^5$  Cells/mL。以排枪加 33 μL 细胞/孔至中间 60 个孔 ( $2.5 \times 10^4$  Cells/well)。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖,于孵箱中孵育,准备进行抗体稀释。

#### 3) 抗体梯度稀释

稀释比例可优化调整。以 Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody (3.5 μg/mL; 150 kDa), 起始浓度为 56.45 ng/mL, 单重复为例。

- a) 如下表,使用无菌低吸附 96 孔 V 底板准备实验。每个待测样品,使用一行(如 B2-B10 行,单重复可以检测 6 个抗体)。如在 B2 孔中加入 53.3 μL 的 Assay buffer, B3-B11 加入 36.3 μL 的 Assay buffer。

母液吸取		梯度稀释孔,依次从前孔吸取 18.2 μL,加入次孔										对照孔
1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.7 μL											
B	Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody	加入	53.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- b) 在 B2 孔中加入 2.7  $\mu\text{L}$  的 Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody 抗体，混匀。此时 B2 孔的抗体浓度为 169 ng/mL (3 $\times$ 浓度)。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。
- c) 从 B2 孔吸取 18.2  $\mu\text{L}$  液体，加入到 B3，充分混匀。以此类推，直至 B10 孔，B11 为不加抗体的对照。
- d) 将装有稀释好的抗体的多孔板盖上盖，之后准备效应细胞。

#### 4) 准备 ADCC Bioassay 效应细胞

同贴壁细胞

#### 5) 加入抗体和 ADCC Bioassay 效应细胞

- a) 以排枪加入准备好的 ADCC Bioassay 效应细胞 33  $\mu\text{L}$ ，150,000 细胞/孔( $4.6 \times 10^6$  Cells/mL)。
- b) 将之前准备好的抗体梯度稀释液以排枪每孔加入 33  $\mu\text{L}$ 。
- c) 盖上检测板盖，于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h。

#### 6) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

ADCC Fc $\gamma$ RIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line+Rituximab	0 $\mu\text{g/mL}$	56.45 ng/mL	861.37 fg/mL
	273	12552	298

#### 7) 验证结果

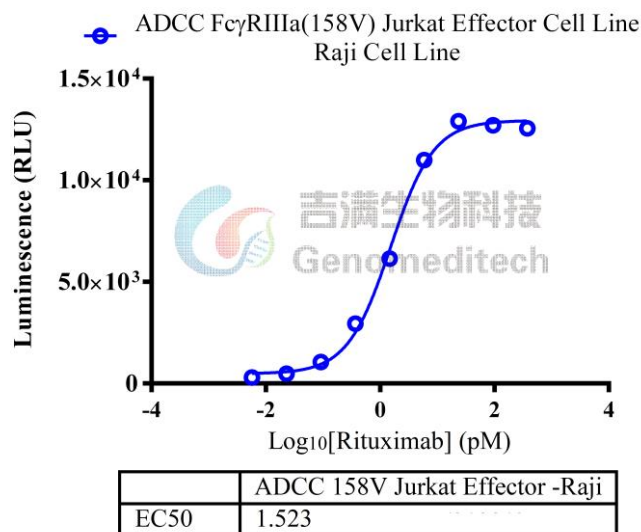


Fig 3. 使用 ADCC 效应细胞，验证抗体的结果示例

## 附录一 传代稳定性

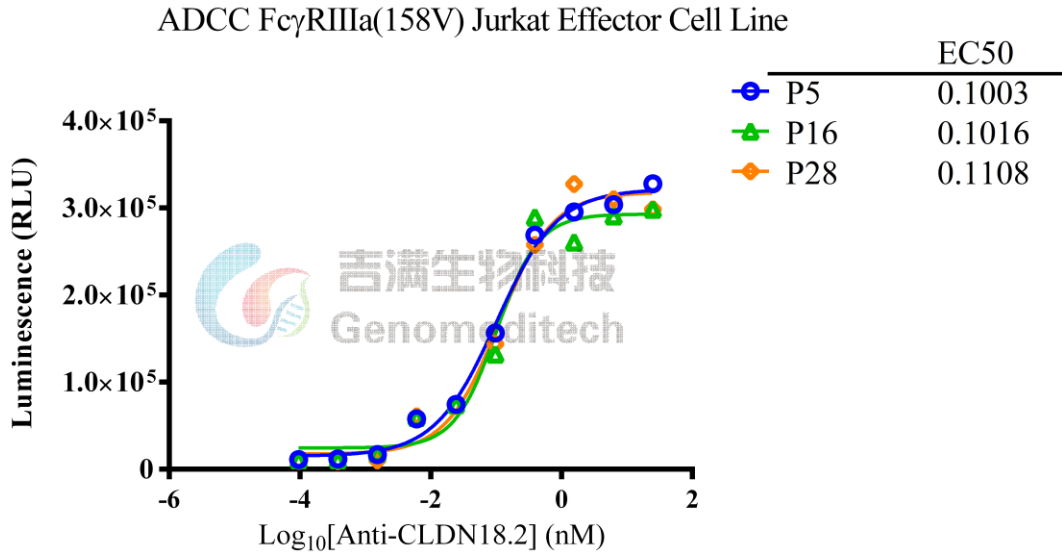


Fig 4. 使用 Anti-CLDN18.2 抗体验证 ADCC 效应细胞传代稳定性的结果  
(对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 附录二 实例

ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line+175D10	0 μg/mL	10 μg/mL	2.38 pg/mL
	288	8716	361
ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line+Enhanced 175D10	0 μg/mL	10 μg/mL	2.38 pg/mL
	285	10095	289
ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line+Antibody-1	0 μg/mL	10 μg/mL	2.38 pg/mL
	310	7018	205
ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line+Antibody-2	0 μg/mL	10 μg/mL	2.38 pg/mL
	299	7531	296
ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line+Igg	0 μg/mL	10 μg/mL	2.38 pg/mL
	265	533	375

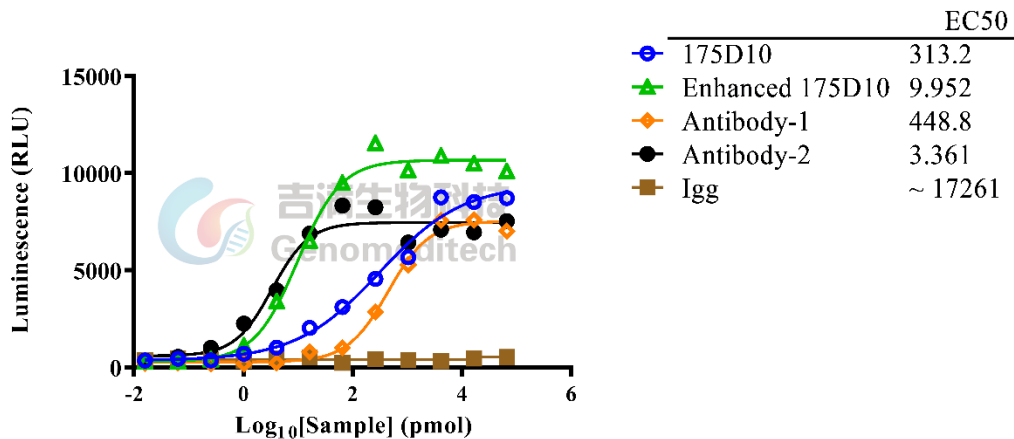


Fig 5. 使用 ADCC 效应细胞，检测不同抗体的结果示例

### 附录三 Raji 本底验证

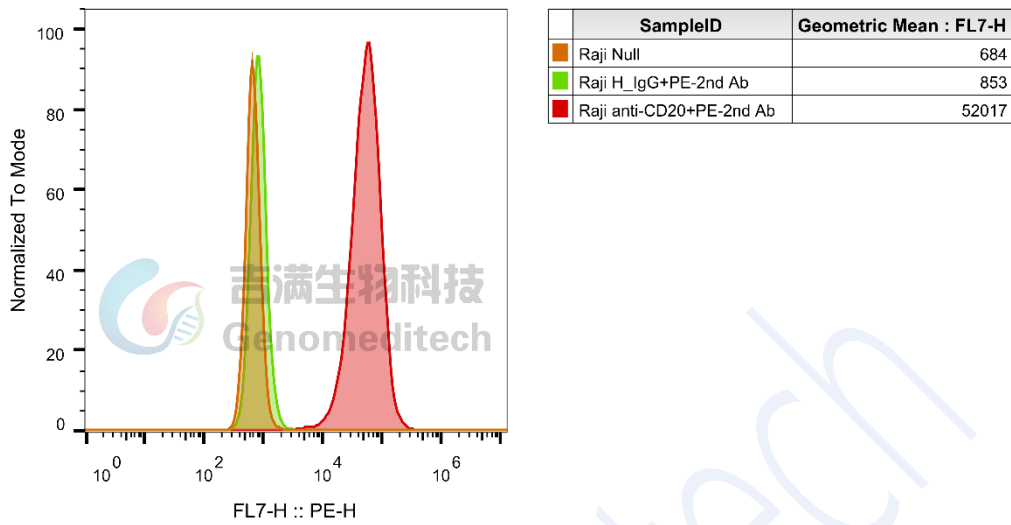


Fig 6. 使用 Anti-H\_MS4A1(CD20) hIgG1 Antibody(Ocrelizumab)(Genomeditech/GM-27200AB)抗体验证 Raji 细胞本底表达 CD20

### 附录四 CD16A 的表达

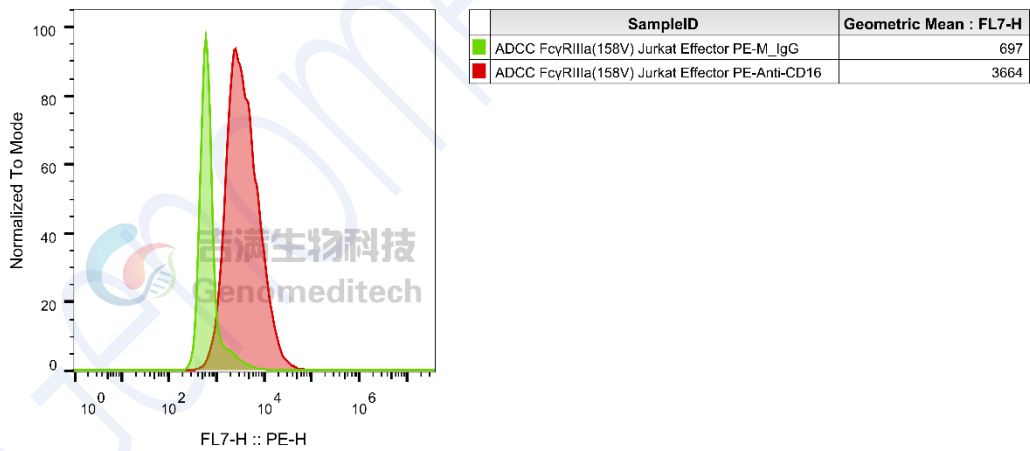


Fig 7. 使用 PE anti-human CD16 Antibody (biolegend/302007)抗体验证 CD16A 的表达

## 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