

## 产品手册

### H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line

### H\_CD40(TNFRSF5) 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：V2.9.1

## 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 CD40L 蛋白激活实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	Human CD40L 蛋白激活; dapirolizumab 抑制实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	11
3.	共培养激活; dapirolizumab 抑制实验.....	11
1)	加样步骤.....	11
2)	报告基因检测.....	13
3)	验证结果.....	13
4.	Human CD40L 蛋白激活; ravagalimab 抑制实验.....	14
1)	加样步骤.....	14
2)	报告基因检测.....	15
3)	验证结果.....	16
5.	共培养激活; ravagalimab 抑制实验.....	16
1)	加样步骤.....	16
2)	报告基因检测.....	18
3)	验证结果.....	18
6.	APX005M 抗体激动剂 Crosslink 验证实验.....	19
1)	加样步骤.....	19
2)	报告基因检测.....	21
3)	验证结果.....	21
	附录 1: 流式验证结果.....	22
	使用许可协议: .....	23

## 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-C09520	H_CD40(TNFRSF5) 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-C09520	H_CD40(TNFRSF5) 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

CD40，也称为 TNFRSF5，是肿瘤坏死因子受体家族中的一个重要成员。它在免疫系统中的抗原递呈细胞（如 B 细胞、树突状细胞和单核细胞）以及多种非免疫细胞和各种类型的癌细胞中均有表达。CD40 的天然配体为 CD40L（CD154），这是一个三聚体，广泛表达于多种细胞类型上。CD40 与 CD40L 结合形成重要的共刺激信号，通过激活 CD40 内胞域来招募 TNFR 相关因子（TRAF），从而启动细胞内信号传导途径，这些途径参与调控机体的免疫反应。

吉满生物的 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line 是一种报告基因细胞系，广泛应用于研究 CD40 受体的活性。当 CD40 激活剂与 CD40 受体结合时，激活下游报告基因，促进荧光素酶（Luciferase）的表达。通过测量 Luciferase 活性，可客观评估信号通路的激活效果，为 CD40 靶向药物的筛选和验证提供重要参考。此外，加入 CD40/CD40L 拮抗型抗体可阻断 CD40L 激活的 CD40 下游信号。通过监测荧光信号，可定量评估荧光素酶的表达水平，有助于筛选和验证针对 CD40 或 CD40L 的拮抗型药物。该细胞系为研究 CD40 相关药物提供了有力的实验工具，促进相关药物的开发和研究。

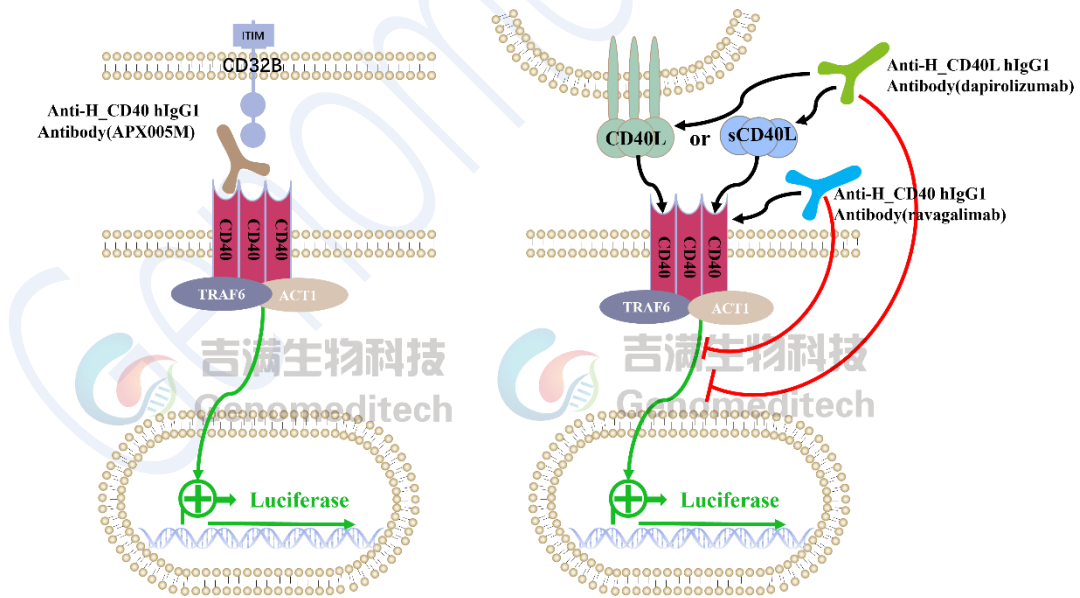


Fig 1.原理示意图

## 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 Blastincidin
细胞冻存液:	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.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	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 BIOSCIENCES/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 Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
H_CD40L CHO-K1 Cell Line	1 管 (5E6 Cell/mL)	Genomeditech/GM-C35532
H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line	1 管 (5E6 Cell/mL)	Genomeditech/GM-C16925
Human CD40L Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-84919RP
Anti-H_CD40L Antibody(dapirolizum)	hIgG1 /	Genomeditech/GM-83977AB
Anti-H_CD40 Antibody(ravagalimab)	hIgG1 /	Genomeditech/GM-86199AB
Anti-H_CD40 Antibody(APX005M)	hIgG1 /	Genomeditech/GM-24025AB
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 × 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，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. Human CD40L 蛋白激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  cells/孔。本次实验使用 Human CD40L Protein; His Tag（以下简称 Human CD40L; 16.8 KDa）作为阳性药物，Conc.01 浓度终为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，3 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11，B12 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 CD40L 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	16.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$	617.28 ng/mL	205.76 ng/mL	68.59 ng/mL	22.86 ng/mL	7.62 ng/mL	2.54 ng/mL	846.75 pg/mL	0
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，离心收集细胞沉淀，使用适量 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$  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。盖上板盖，于孵箱中孵育。
- 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）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human CD40L	1 mg/mL	/	直接使用储液

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B1 孔中加入 80.19  $\mu\text{L}$  的 Assay buffer，B2-B12 加入 55  $\mu\text{L}$  的 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 B1 中加入 8.91  $\mu\text{L}$  Human CD40L）。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 29.7 $\mu\text{L}$ 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	8.91 $\mu\text{L}$ Human CD40L	80.19 $\mu\text{L}$	59.4 $\mu\text{L}$	59.4 $\mu\text{L}$	59.4 $\mu\text{L}$	59.4 $\mu\text{L}$	59.4 $\mu\text{L}$	59.4 $\mu\text{L}$	59.4 $\mu\text{L}$	59.4 $\mu\text{L}$	59.4 $\mu\text{L}$	59.4 $\mu\text{L}$	59.4 $\mu\text{L}$
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔（如 B1）中吸取 29.7  $\mu\text{L}$  液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 B2），充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11）。
- i) 将步骤 a 孵育的孔板取出。
- j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 50  $\mu\text{L}$ 。
- k) 盖上检测板盖，于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	846.75 $\mu\text{g/mL}$
	232883	15531367	216594

## 3) 验证结果

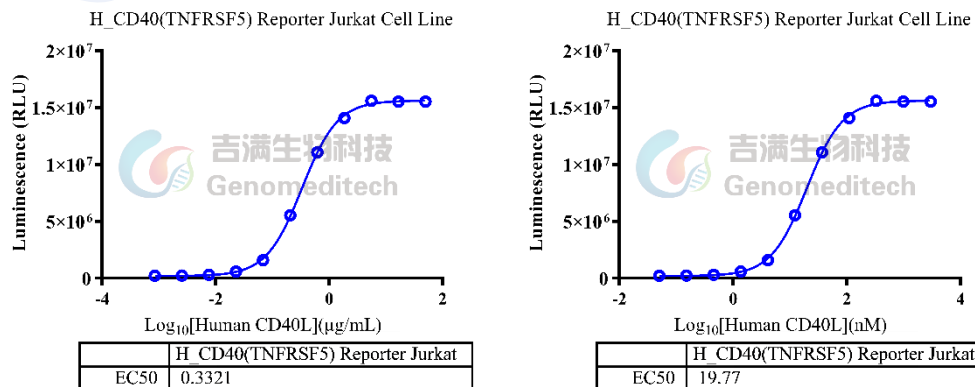


Fig.2 功能验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）



## 2. Human CD40L 蛋白激活； dapirolizumab 抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  Cells/孔。使用 Anti-H\_CD40L hIgG1 Antibody(dapirolizumab) (以下简称为 dapirolizumab;150 kDa)作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 30  $\mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.011 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围为 100  $\mu\text{L}$  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	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	dapirolizumab $30 \mu\text{g/mL}$	$10 \mu\text{g/mL}$	$3.33 \mu\text{g/mL}$	$1.11 \mu\text{g/mL}$	$370.37 \text{ ng/mL}$	$123.46 \text{ ng/mL}$	$41.15 \text{ ng/mL}$	$13.72 \text{ ng/mL}$	$4.57 \text{ ng/mL}$	$1.52 \text{ ng/mL}$	$508.05 \text{ pg/mL}$	0
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 1-2 h，离心收集 H\_CD40(TNFRSF5) 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，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度到  $3.04 \times 10^6$  cells/mL。以排枪加 33  $\mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu\text{L}$  PBS。盖上市盖，于孵箱中孵育待用。
- 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）。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
dapirolizumab	2.755 mg/mL	/	直接使用储液
Human CD40L	1 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1 孔加入 68.45  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 47.19  $\mu\text{L}$  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 B1 中加入 2.34  $\mu\text{L}$  dapirolizumab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 23.6 $\mu\text{L}$ , 加入次孔											对照孔
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	2.34 $\mu\text{L}$ dapirolizumab	68.45 $\mu\text{L}$	47.19 $\mu\text{L}$	47.19 $\mu\text{L}$	47.19 $\mu\text{L}$	47.19 $\mu\text{L}$	47.19 $\mu\text{L}$	47.19 $\mu\text{L}$	47.19 $\mu\text{L}$	47.19 $\mu\text{L}$	47.19 $\mu\text{L}$	47.19 $\mu\text{L}$	47.19 $\mu\text{L}$
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 23.6  $\mu\text{L}$ , 加入到第二个梯度稀释孔 B2, 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (B11)。
- i) 配置 3 $\times$  激活剂, 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Human CD40L (2.13  $\mu\text{L}$  1 mg/mL Human CD40L 母液加入到 705.7  $\mu\text{L}$  Assay Buffer 中, 混匀后使用)。
- j) 将配置好的激活剂加入梯度稀释的抗体中, 每孔加入 47.19  $\mu\text{L}$  混匀, 盖上盖板放入培养箱孵育 1 h。
- k) 1 h 后取出步骤 j 孵育好的混合溶液, 每孔取 66  $\mu\text{L}$  分别加入到步骤 a 的细胞孔板中, 盖上盖板, 继续孵育 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Human CD40L	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Human CD40L	508.05 $\text{pg}/\text{mL}$ + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Human CD40L
	15375168	225725	13810618

### 3) 验证结果

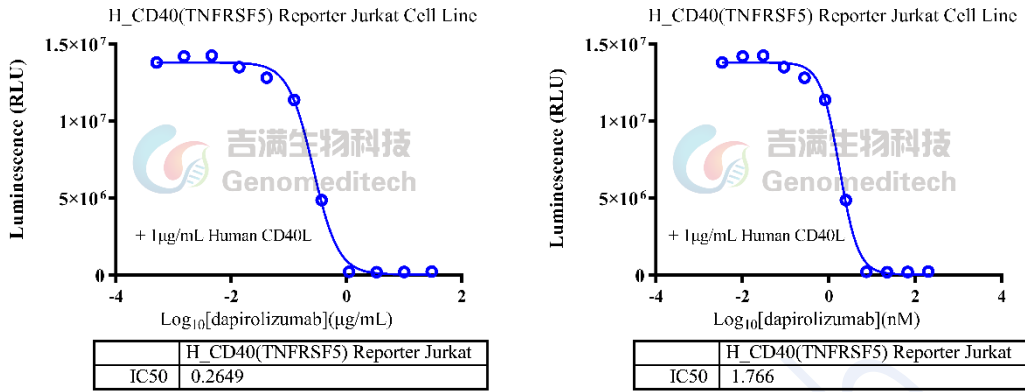


Fig 3. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

### 3. 共培养激活; dapirolizumab 抑制实验

本实验使用  $1 \times 10^5$  cells/孔的 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line 和  $1 \times 10^4$  cells/Well 的 H\_CD40L CHO-K1 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-H\_CD40L hIgG1 Antibody(dapirolizumab) (以下简称为 dapirolizumab;150 kDa), 起始终浓度(Conc.01)为 30 µg/mL, 3 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11, B12 为 0 浓度对照。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	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	dapirolizumab 30 µg/mL	dapirolizumab 10 µg/mL	dapirolizumab 3.33 µg/mL	dapirolizumab 1.11 µg/mL	dapirolizumab 370.37 ng/mL	dapirolizumab 123.46 ng/mL	dapirolizumab 41.15 ng/mL	dapirolizumab 13.72 ng/mL	dapirolizumab 4.57 ng/mL	dapirolizumab 1.52 ng/mL	dapirolizumab 508.05 pg/mL	dapirolizumab 0
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, 消化离心收集 H\_CD40L CHO-K1 Cell Line 细胞, 以完全培养基重悬细胞, 计算细胞密度及活力, 通过补加完全培养基的方式, 调整细胞密度到 1

× 10<sup>5</sup> cells/mL, 以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔, 周围的孔加 100 μL PBS, 盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜。

- b) 实验前 1-2 h, 离心收集 H\_CD40(TNFRSF5) 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 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line 到 2 × 10<sup>6</sup> cells/mL, 待用。
- 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 B1-B11)。
- e) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
dapirolizumab	2.755 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 B1 孔加入 80.7 μL Assay Buffer, B2-B12 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 B1 中加入 1.8 μL dapirolizumab), 混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 27.5 μL, 加入次孔										对照孔	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B	1.8 μL dapirolizumab	80.7 μL	55 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 B1 中吸取 27.5 μL, 加入到第二个稀释孔 B2, 充分混匀。
- i) 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (B11)。
- j) 取出步骤 a 准备好的 H\_CD40L CHO-K1 Cell Line 细胞孔板, 吸弃上清 100 μL; 然后将步骤 i 准备好的药物取出 50 μL, 分别加入到步骤 a 的 H\_CD40L CHO-K1 Cell Line 细胞孔板中, 孵育 1 h。

- k) 1 h 后将步骤 b 准备好的 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line 取出，加入到步骤 j 孵育好的混合液中，每孔 50  $\mu$ L，盖上盖板，继续孵育 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat	0 $\mu$ g/mL	30 $\mu$ g/mL	508.05 pg/mL
Cell Line + H_CD40L CHO-K1	41604094	872186	39391121

## 3) 验证结果

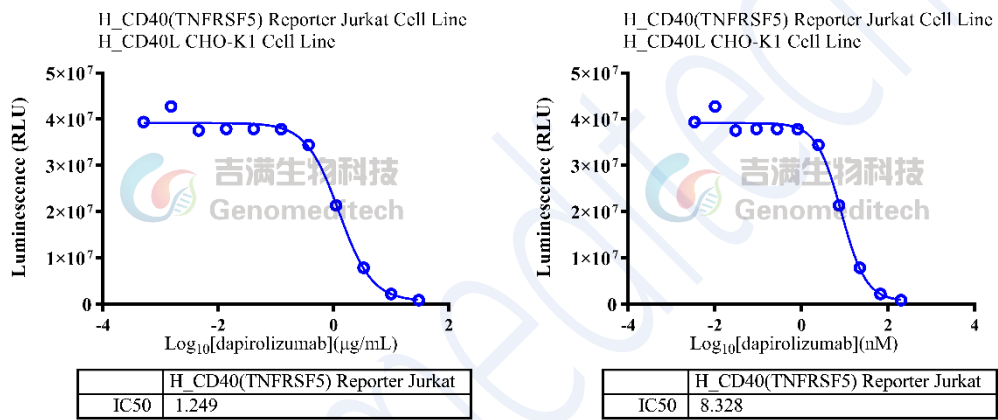


Fig 4. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

#### 4. Human CD40L 蛋白激活； ravagalimab 抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  Cells/孔。使用 Anti-H\_CD40 hIgG1 Antibody(ravagalimab) (以下简称为 ravagalimab;150 kDa)作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 30  $\mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.011 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围为 100  $\mu\text{L}$  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	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
B	ravagalimab $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	3.33 $\mu\text{g/mL}$	1.11 $\mu\text{g/mL}$	370.37 $\text{ng/mL}$	123.46 $\text{ng/mL}$	41.15 $\text{ng/mL}$	13.72 $\text{ng/mL}$	4.57 $\text{ng/mL}$	1.52 $\text{ng/mL}$	508.05 $\text{pg/mL}$	0
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 1-2 h，离心收集 H\_CD40(TNFRSF5) 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，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度到  $3.04 \times 10^6$  cells/mL。以排枪加 33  $\mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu\text{L}$  PBS。盖上市盖，于孵箱中孵育待用。
- 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 B1-B11）。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
ravagalimab	2.482 mg/mL	/	直接使用储液
Human CD40L	1 mg/mL	0.1 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 B1 孔加入 52.46  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 36.3  $\mu\text{L}$  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 B1 中加入 1.99  $\mu\text{L}$  ravagalimab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.15 $\mu\text{L}$ , 加入次孔											对照孔
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.99 $\mu\text{L}$ ravagalimab	52.46 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 18.15  $\mu\text{L}$ , 加入到第二个梯度稀释孔 B2, 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (B11)。
- i) 配置 3  $\times$  激活剂, 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Human CD40L (8.2  $\mu\text{L}$  0.1  $\text{mg}/\text{mL}$  Human CD40L 母液加入到 536.3  $\mu\text{L}$  Assay Buffer 中, 混匀后使用)。
- j) 取出步骤 a 的细胞孔板, 加入步骤 h 准备好的梯度稀释抗体, 每孔加入 33  $\mu\text{L}$ , 混匀。盖上盖板, 放入培养箱孵育 1 h。
- k) 1 h 后取出步骤 j 混合溶液孔板, 再加入步骤 i 准备好的溶液, 每孔 33  $\mu\text{L}$ 。盖上盖板, 继续孵育 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 500 $\text{ng}/\text{mL}$ Human CD40L	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 500 $\text{ng}/\text{mL}$ Human CD40L	508.05 $\text{pg}/\text{mL}$ + 500 $\text{ng}/\text{mL}$ Human CD40L
	7724517	459003	6563226

### 3) 验证结果

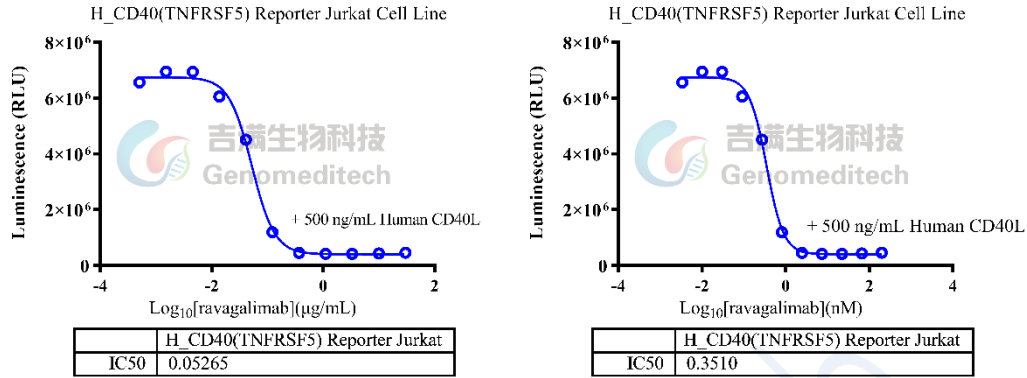


Fig 5. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 5. 共培养激活; ravagalimab 抑制实验

本实验使用  $1 \times 10^5$  cells/孔的 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line 和  $1 \times 10^4$  cells/Well 的 H\_CD40L CHO-K1 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-H\_CD40 hIgG1 Antibody(ravagalimab) (以下简称为 ravagalimab;150 kDa), 起始浓度(Conc.01)为  $30 \mu\text{g/mL}$ , 3 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11, B12 为 0 浓度对照。周围为  $100 \mu\text{L}$  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	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	ravagalimab $30 \mu\text{g/mL}$	$10 \mu\text{g/mL}$	$3.33 \mu\text{g/mL}$	$1.11 \mu\text{g/mL}$	$370.37 \text{ ng/mL}$	$123.46 \text{ ng/mL}$	$41.15 \text{ ng/mL}$	$13.72 \text{ ng/mL}$	$4.57 \text{ ng/mL}$	$1.52 \text{ ng/mL}$	$508.05 \text{ pg/mL}$	0
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, 消化离心收集 H\_CD40L CHO-K1 Cell Line 细胞, 以完全培养基重悬细胞, 计算细胞密度及活力, 通过补加完全培养基的方式, 调整细胞密度到 1



$\times 10^5$  cells/mL, 以排枪加 100  $\mu$ L 细胞/孔至中间孔, 周围的孔加 100  $\mu$ L PBS, 盖板上板盖, 于孵箱中孵育过夜。

- b) 实验前 1-2 h, 离心收集 H\_CD40(TNFRSF5) 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 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line 到  $2 \times 10^6$  cells/mL, 以排枪加 50  $\mu$ L 细胞/孔至中间孔, 周围的孔加 100  $\mu$ L PBS, 盖板上板盖, 于孵箱中待用。
- 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 B1-B11)。
- e) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
ravagalimab	2.482 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 B1 孔加入 80.51  $\mu$ L Assay Buffer, B2-B12 孔, 加入 55  $\mu$ 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  $\mu$ L ravagalimab), 混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 27.5 $\mu$ L, 加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	2 $\mu$ L ravagalimab	80.51 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- h) 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 27.5  $\mu$ L, 加入到第二个稀释孔 B2, 充分混匀。
- i) 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (B11)。
- j) 取出步骤 b 的 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line 细胞孔板, 加入步骤 i 准备好的溶液, 每孔 50  $\mu$ L, 孵育 1 h。

- k) 1 h 后取出步骤 a 准备好的 H\_CD40L CHO-K1 Cell Line 细胞孔板，吸弃上清 100  $\mu\text{L}$ ；然后加入步骤 j 孵育好的混合溶液，每孔加 100  $\mu\text{L}$ 。盖上盖板，继续孵育 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell Line + H_CD40L CHO-K1	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	508.05 $\text{pg/mL}$
	49942225	1156412	47722313

## 3) 验证结果

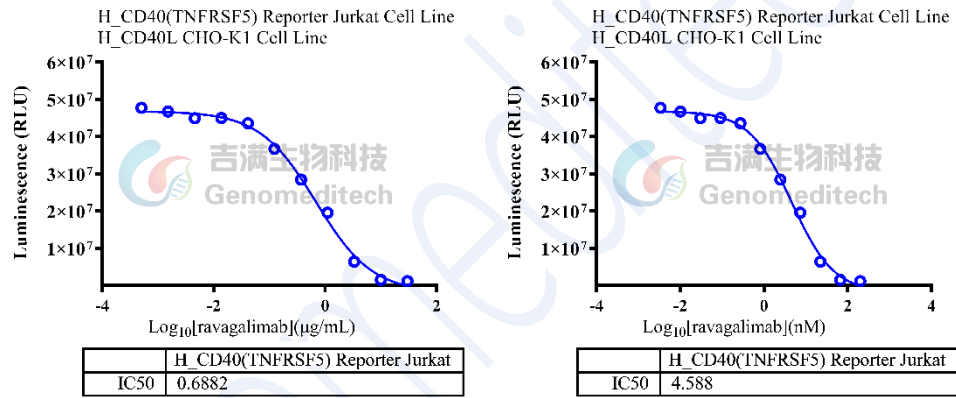


Fig 6. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 6. APX005M 抗体激动剂 Crosslink 验证实验

对于本实验,推荐 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell line 细胞量为  $1 \times 10^5$  cells/孔, H\_FCGR2B CHO-K1 Cell Line 和 CHO-K1 Cell Line 细胞量各为  $1 \times 10^4$  cells/孔。Anti-H\_CD40 hIgG1 Antibody(APX005M)(以下简称为 APX005M; 150 kDa)作为本次实验的抗体, Conc.01 终浓度为  $10 \mu\text{g/mL}$ , 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11, B12 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	H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line+APX005M	10 $\mu\text{g/mL}$	2.5 $\mu\text{g/mL}$	625 ng/mL	156.25 ng/mL	39.06 ng/mL	9.77 ng/mL	2.44 ng/mL	610.35 pg/mL	152.59 pg/mL	38.15 pg/mL	9.54 pg/mL	0
C	CHO-K1 Cell Line+APX005M	10 $\mu\text{g/mL}$	2.5 $\mu\text{g/mL}$	625 ng/mL	156.25 ng/mL	39.06 ng/mL	9.77 ng/mL	2.44 ng/mL	610.35 pg/mL	152.59 pg/mL	38.15 pg/mL	9.54 pg/mL	0
D	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
E													
F													
G													
H													

### 1) 加样步骤

- 在实验前 16-24 h, 将靶细胞 H\_FCGR2B CHO-K1 Cell Line 和 CHO-K1 从培养瓶中分别消化下来, 以完全培养基重悬细胞, 检测细胞活力并计数。离心收集细胞, 再以新鲜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 (FCGR2B CHO: B1-B12; CHO: C1-C12)。周围的孔加  $100 \mu\text{L}$  PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h, 从细胞培养瓶中转移 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell line 细胞至  $50 \text{ mL}$  离心管中, 计算细胞密度及活力。以 Assay Buffer 重悬细胞, 调整至  $2 \times 10^6$  cells/mL, 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、C 行)。

## e) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
APX005M	4.53 mg/mL	0.453 mg/mL	取 2 $\mu$ L 储液+18 $\mu$ L Assay Buffer

f) 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。如 B1、C1 孔中加入 70.1  $\mu$ L 的 Assay buffer, B2-B12、C2-C12 分别加入 55  $\mu$ L 的 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 B1、C2)。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.33 $\mu$ L, 加入次孔											对照孔			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12		
A																
B	3.24 $\mu$ L APX005M	70.1 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L
C	3.24 $\mu$ L APX005M	70.1 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L
D																
E																
F																
G																
H																

h) 从第一个梯度稀释孔 (如 B1、C1) 中吸取 18.33  $\mu$ L 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 B2、C2), 充分混匀。

i) 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (如 B11、C11)。

j) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出, 每孔吸弃 100  $\mu$ L 上清, 加入步骤 b 准备好的 H\_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat 细胞, 每孔 50  $\mu$ L。

k) 然后再加入步骤 i 准备好的抗体梯度稀释液, 每孔加入 50  $\mu$ L。

l) 盖上检测板盖, 于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h。

m) 使用报告基因检测试剂盒收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell line + APX005M+ H_FCGR2B CHO-K1	0 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	9.54 $\text{pg/mL}$
	531788	26718874	529181
H_CD40(TNFRSF5) Reporter Jurkat Cell line + APX005M + CHO-K1	0 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	9.54 $\text{pg/mL}$
	593712	4075792	586945

## 3) 验证结果

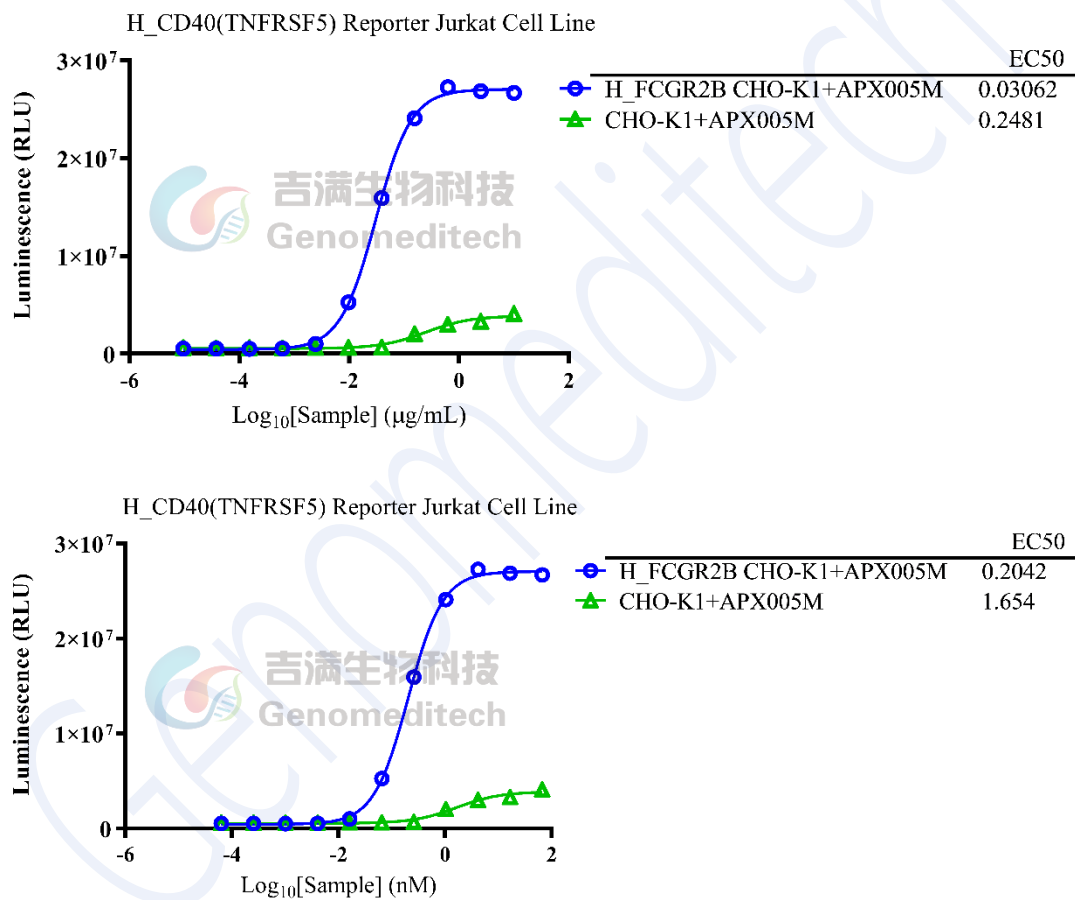


Fig 7.功能验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1: 流式验证结果

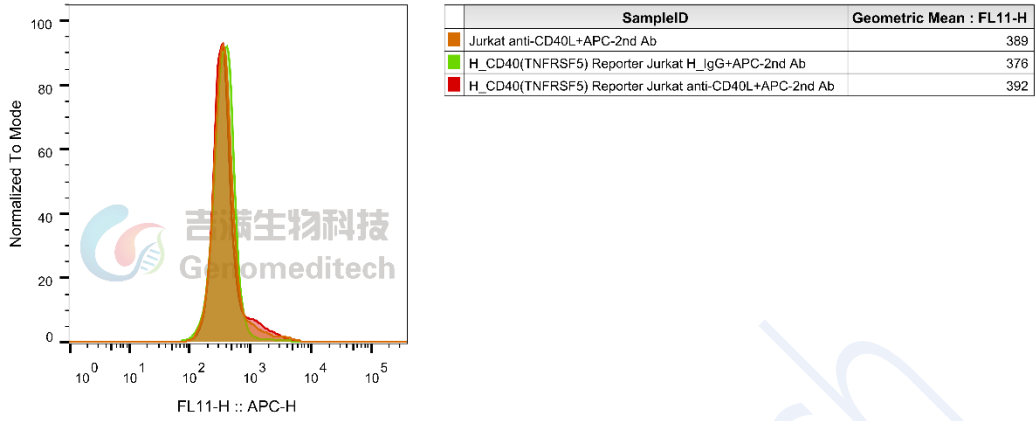


Fig 8. 流式验证结果 (Anti-H\_CD40L hIgG1 Antibody(dapirolizumab) (Genomeditech/GM-83977AB) 抗体流式验证不表达)

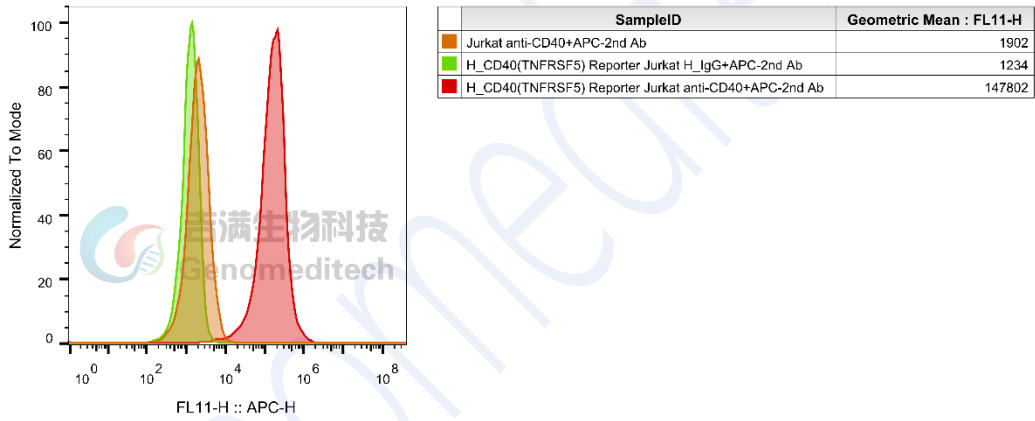


Fig 9. 流式验证结果 (Anti-H\_CD40 hIgG1 Antibody(APX005M) (Genomeditech/GM-24025AB) 抗体流式验证表达)

## 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