

## 产品手册

### H\_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line

### H\_CTLA4 PD-1 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：V2.8.240524

## 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.	H_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line 细胞复苏.....	6
2.	H_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line 细胞传代.....	6
3.	H_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line 细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	7
1.	Assay 验证.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	9
	使用许可协议: .....	10
	附录 1 H_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line 传代稳定性.....	11
	附录 2 H_CTLA4 PD-1 流式结果.....	12

## 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-C26486	H_CTLA4 PD-1 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-C26486	H_CTLA4 PD-1 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. 本产品相关实验，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。

CTLA-4，也被称为CD152，是一种在调节性T细胞(treg)上组成型表达的免疫抑制受体。在免疫反应的调节中起关键作用。当CTLA4在T细胞表面表达上调，T细胞以更高的亲和力与CD80(B7-1)或CD86(B7-2)结合，胜过CD28的阳性共刺激信号，因此诱导T细胞无反应性。研究发现，用于阻断CTLA4/CD80和CD86相互作用的抗体和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。

目前已有临床数据表明，CTLA-4和PD-1的抗体联合使用或使用CTLA-4/PD-1的双特异性抗体，治疗效果由于使用单一的CTLA-4或PD-1抗体。

吉满生物H\_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line报告基因细胞系，是一种稳定表达CTLA-4和PD-1的Luciferase报告基因细胞系。通过与H\_CD80 PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line (Genomeditech/GM-C30574) 共培养，在CTLA-4阻断CD28与CD80结合，PD-1/PD-L1结合下，抑制TCR下游信号。在加入CTLA-4、PD-1或CTLA-4/PD-1双特异性抗体后，阻断CTLA-4/PD-1，恢复TCR信号，Luciferase读值即代表信号通路的激活效果。可用于CTLA-4/PD-1相关药物的体外效果评价。

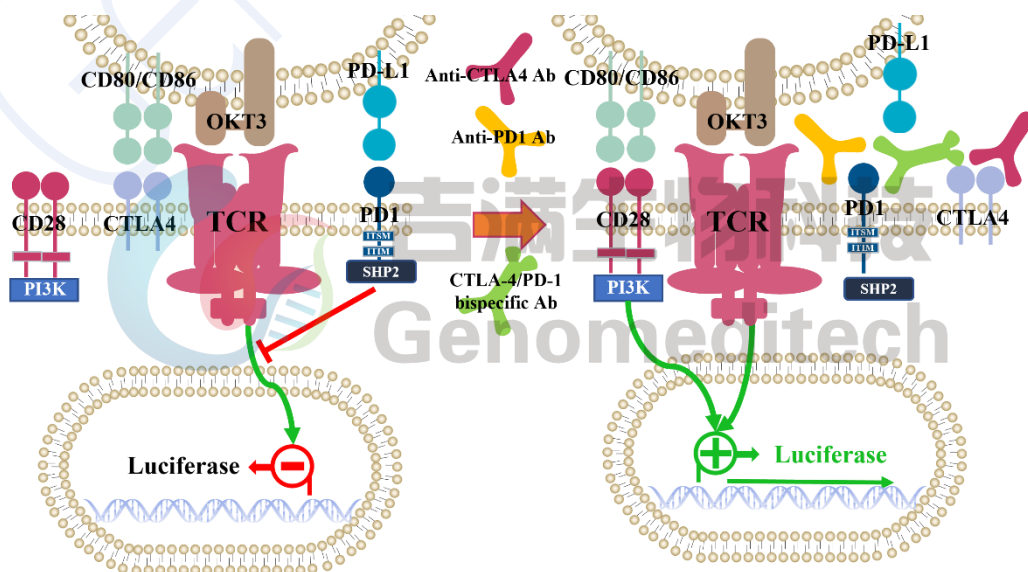


Fig 1. 原理图

## 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+3.5 µg/mL Blasticidin+200 µg/mL Hygromycin+0.75 µg/mL Puromycin
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.
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	gibco/C11875500BT
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well White Flat Bottom Polystyrene	96-well	Corning/3912
Not Treated Microplate		
H_CD80 PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL	Genomeditech/GM-C30574
Anti-H_CTLA-4 Antibody(Ipilimumab)	hIgG1 /	Genomeditech/GM-27203AB
Anti-PD1 Antibody(Pembrolizumab)	hIgG4 /	Genomeditech/GM-52674AB
Anti-CTLA-4/PD-1 Antibody(Cadonilimab)	hIgG1 /	Genomeditech/GM-60293AB
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. H\_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line 细胞复苏

- a) 37°C水浴锅预热培养基，加入预热后的完全培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- b) 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不断摇动至融化。
- c) 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，1000 rpm，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- d) 使用 1 mL 完全培养基重悬。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。
- e) 通过补加培养基的形式调整活细胞密度为  $4-6 \times 10^5$  cells/mL，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL 悬液），竖瓶培养。

### 2. H\_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line 细胞传代

- a) 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，不要让其密度超过  $2 \times 10^6$  cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养。
- 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) 注意营养，不处理时务必隔天适当补加培养基。

### 3. H\_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line 细胞冻存

- a) 使用 1000 rpm，3 min 离心收集细胞。
- b) 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。
- c) 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。

## 六、使用方法

### 1. Assay 验证

本实验使用  $1 \times 10^5$  cells/Well 的 H\_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line 和  $1.5 \times 10^4$  cells/Well 的 H\_CD80 PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line (接种密度)进行实验。

使用 Anti-H\_CTLA-4 hIgG1 Antibody(Ipilimumab)(以下简称为 Anti-CTLA-4 Ab;150 kDa), Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab)(以下简称为 Anti-PD-1 Ab;150 kDa), Anti-CTLA-4/PD-1 hIgG1 Antibody(Cadonilimab)(以下简称为 CTLA-4/PD-1 Bispecific Ab;200 kDa)。具体孔板布局如下:

	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-CTLA-4 Ab 100 μg/mL	16.67 μg/mL	2.78 μg/mL	462.96 ng/mL	77.16 ng/mL	12.86 ng/mL	2.14 ng/mL	357.22 pg/mL	59.54 pg/mL	9.92 pg/mL	1.65 pg/mL	0
C	Anti-PD-1 Ab 100 μg/mL	16.67 μg/mL	2.78 μg/mL	462.96 ng/mL	77.16 ng/mL	12.86 ng/mL	2.14 ng/mL	357.22 pg/mL	59.54 pg/mL	9.92 pg/mL	1.65 pg/mL	0
D	Anti-CTLA-4 + Anti-PD-1 Abs 100 μg/mL	16.67 μg/mL	2.78 μg/mL	462.96 ng/mL	77.16 ng/mL	12.86 ng/mL	2.14 ng/mL	357.22 pg/mL	59.54 pg/mL	9.92 pg/mL	1.65 pg/mL	0
E	CTLA-4/PD-1 Bispecific Ab 100 μg/mL	25 μg/mL	6.25 μg/mL	1.56 μg/mL	390.63 ng/mL	97.66 ng/mL	24.41 ng/mL	6.1 ng/mL	1.53 ng/mL	381.47 pg/mL	95.37 pg/mL	0
F	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
G												
H												

#### 1) 加样步骤

- 实验前 16 – 24 h, 消化离心收集 H\_CD80 PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞, 用适量完全培养基重悬细胞, 检测细胞活力并计数, 再以完全培养基调整细胞密度到  $1.5 \times 10^5$  cells/mL, 以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔, 周围的孔加 100 μL PBS, 盖上车盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h, 离心收集 H\_CTLA4 PD-1 Reporter 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\_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line 到  $4 \times 10^6$  cells/mL。
- 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
Anti-CTLA-4 Ab	1 mg/mL	/	直接使用储液
Anti-PD-1 Ab	0.77 mg/mL	/	直接使用储液
CTLA-4/PD-1 Bispecific Ab	4.809 mg/mL	/	直接使用储液

f) 抗体准备

- i. Anti-CTLA-4 Ab: B1 孔中加入 19.8  $\mu$ L Assay Buffer, 加入 13.2  $\mu$ L 抗体
- ii. Anti-PD-1 Ab: C1 孔中加入 15.8  $\mu$ L Assay Buffer, 加入 17.2  $\mu$ L 抗体
- iii. Anti-CTLA-4 + Anti-PD-1 Abs: D1 孔中加入 35.6 Assay Buffer, 依次加入 13.2  $\mu$ L Anti-CTLA-4 Ab, 17.2  $\mu$ L Anti-PD-1 Ab
- iv. CTLA-4/PD-1 Bispecific Ab: E1 孔中加入 33.6  $\mu$ L Assay Buffer, 加入 3.1  $\mu$ L 抗体

g) 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	13.2 $\mu$ L Anti-CTLA-4 Ab	19.8 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L
C	17.2 $\mu$ L Anti-PD-1 Ab	15.8 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L
D	13.2 $\mu$ L Anti-CTLA-4 Ab + 17.2 $\mu$ L Anti-PD-1 Ab	35.6 $\mu$ 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
E	3.1 $\mu$ L CTLA-4/PD-1 Bispecific Ab	33.6 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L
F													
G													
H													

- h) B 行与 C 行, 从第一个梯度稀释孔 B1 (C1) 中吸取 5.5  $\mu$ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B2 (C2), 充分混匀, 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (B11/C11)。
- i) D 行, 从第一个梯度稀释孔 D1 中吸取 11  $\mu$ L, 加入到第二个梯度稀释孔 D2, 充分混匀, 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (D11)。
  - j) E 行, 从第一个梯度稀释孔 E1 中吸取 9.2  $\mu$ L, 加入到第二个梯度稀释孔 E2, 充分混匀, 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (E11)。



- k) 将步骤 a 准备好的 H\_CD80 PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞孔板取出，每孔吸弃 90-95  $\mu\text{L}$  细胞，将梯度稀释的抗体，B 行、C 行、E 行每孔吸取 25  $\mu\text{L}$  依次加入到细胞孔板中，D 行每孔吸取 50  $\mu\text{L}$  依次加入到细胞孔板中，然后每孔 25  $\mu\text{L}$  加入步骤 b 准备好的 H\_CTLA4 PD-1 Reporter 细胞，最后向每孔中加入 Assay Buffer，体积定容到 100  $\mu\text{L}$ /孔，混匀，盖上盖板，放入培养箱中，孵育 7 h。
- l) 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。

Anti-CTLA-4 Ab	0 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	1.65 $\text{pg/mL}$
	38048	566465	39831
Anti-PD-1 Ab	0 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	1.65 $\text{pg/mL}$
	45638	159901	48237
Anti-CTLA-4 + Anti-PD-1 Abs	0 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	1.65 $\text{pg/mL}$
	36536	846281	38896
CTLA-4/PD-1 Bispecific Ab	0 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	95.37 $\text{pg/mL}$
	37345	962100	47585

## 3) 验证结果

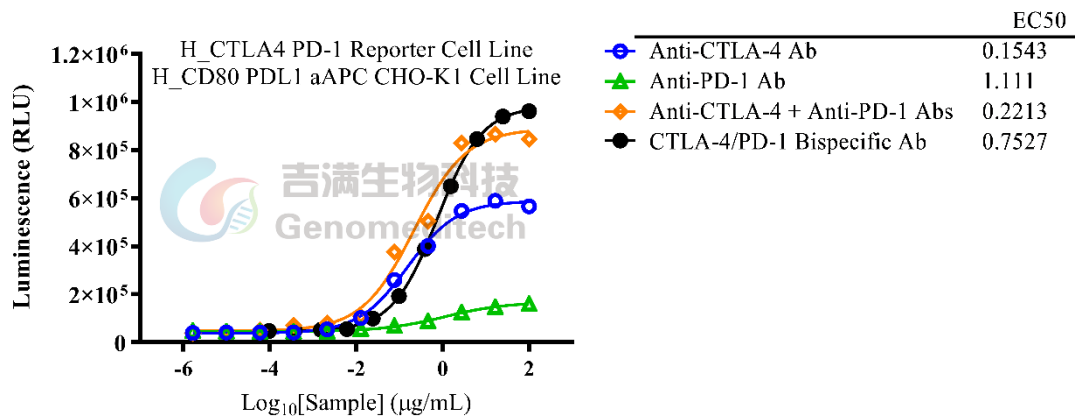


Fig 2. 功能验证结果

## 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 1 H\_CTLA4 PD-1 Reporter Cell Line 传代稳定性

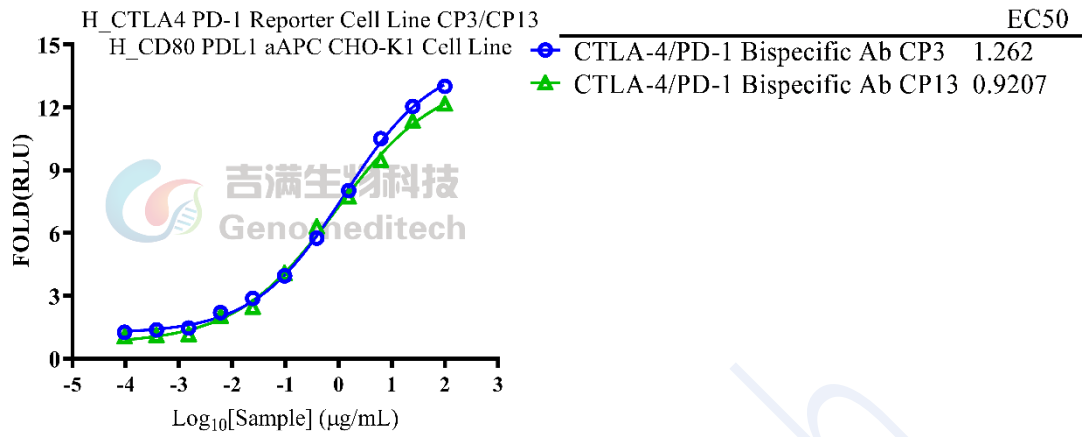


Fig 4. 使用 Anti-CTLA-4/PD-1 hIgG1 Bispecific Antibody(Cadonilimab) (Genomeditech/GM-60293AB) 抗体检测传代稳定实验数据 (纵坐标 Luminescence 值换算成倍率)

## 附录 2 H\_CTLA4 PD-1 流式结果

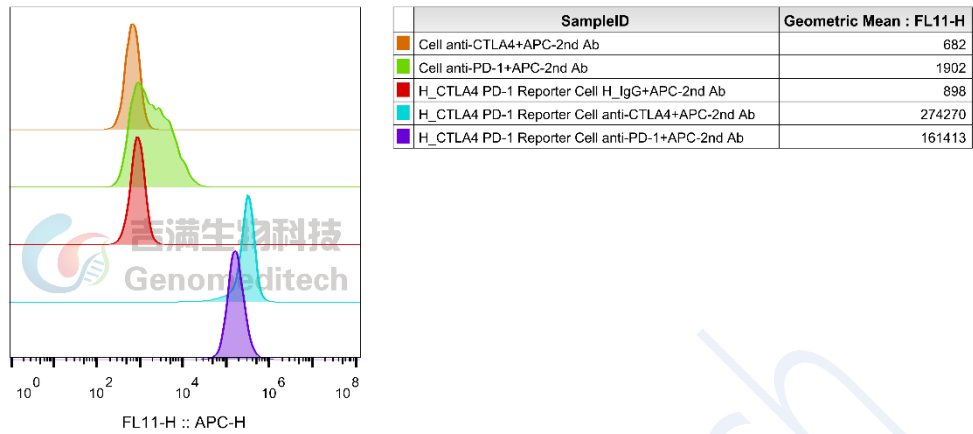


Fig 4. 使用 Anti-H\_CTLA-4 hIgG1 Antibody(Ipilimumab) (Genomeditech/GM-27203AB)和 Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab) (Genomeditech/GM-52674AB)流式验证结果