

产品手册

H_BTLA PD-1 Reporter Cell Line

H_BTLA 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：V2.9.1

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
六、	使用方法.....	7
	加样步骤.....	7
	报告基因检测.....	9
	验证结果.....	9
附录 1:	流式验证结果.....	10
使用许可协议:	11

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-C31560	H_BTLA 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-C31560	H_BTLA 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 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

BTLA (B and T lymphocyte attenuator) 和 HVEM (herpesvirus entry mediator) 是两种重要的免疫调节蛋白，它们之间存在相互作用，被认为是一种重要的免疫调节通路。BTLA 是一种抑制性共刺激受体，其与 HVEM 的结合可以抑制 T 细胞活化和免疫反应。通过 BTLA-HVEM 通路的调节，可以调节免疫细胞的活化和功能，从而影响免疫应答的程度和性质。

PD-1 (programmed cell death protein 1) 是一种细胞表面受体，主要表达在活化的 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞上，可以通过结合其配体 PD-L1 和 PD-L2 来抑制 T 细胞活化和免疫反应。PD-L1 (programmed cell death ligand 1) 是 PD-1 的配体，主要表达在肿瘤细胞、免疫细胞和组织细胞上，通过与 PD-1 结合来抑制 T 细胞活化和促进免疫逃逸。PD-1/PD-L1 信号通路在调节免疫耐受和抑制自身免疫应答中起着重要作用，通过抑制 T 细胞活化和促进 T 细胞耗竭来维持免疫平衡。

吉满生物 H_BTLA PD-1 Reporter Cell Line 报告基因细胞系，稳定表达 BTLA、PD-1 基因。该细胞通过与 H_HVEM PD-L1 aAPC CHO-K1 Cell line (Genomeditech/GM-C31561) 共培养，BTLA 与 HVEM 结合、PD-1 与 PD-L1 结合都会抑制 T 细胞信号；通过加入 Anti-BTLA 和 Anti-PD1 抗体，分别阻断 BTLA-HVEM、PD-1-PD-L1 相互作用，从而恢复 T 细胞信号。该细胞系可用于 BTLA、PD-1 相关药物的研究。

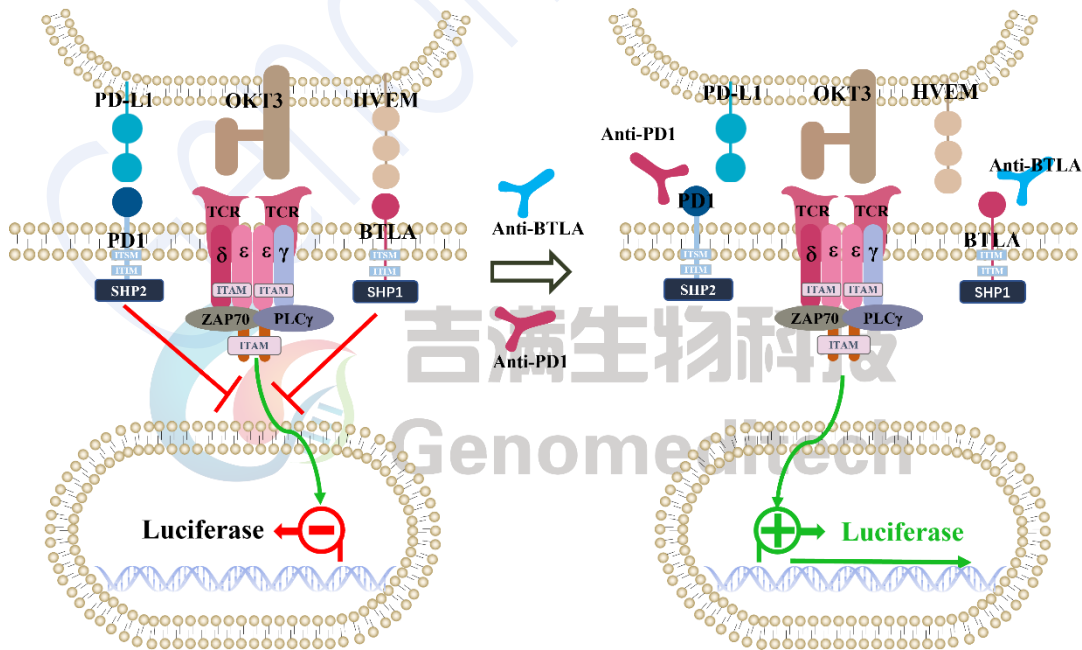


Fig 1. 信号通路图

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+0.75 µg/mL Puromycin+400 µg/mL Zeocin
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
Zeocin	100 mg	Genomeditech/GM-040407-100MG
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Vivacell/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	96-well	Corning/3912
Microplate		
H_HVEM aAPC CHO-K1 Cell Line	1 管 (5E6Cell/mL)	Genomeditech/GM-C25499
H_HVEM PD-L1 aAPC CHO-K1 Cell line	1 管 (5E6Cell/mL)	Genomeditech/GM-C31561
aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line	1 管 (5E6Cell/mL)	Genomeditech/GM-C05269
Anti-BTLA hIgG4 Antibody(22B3)	/	Genomeditech/GM-50103AB
Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab)	/	Genomeditech/GM-52674AB
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。
- 此细胞在 HVEM、LIGHT 敲除母细胞的基础上进行构建，敲除母细胞含有 Hygromycin、G418 抗性基因。

六、使用方法

(以 H_HVEM PD-L1 aAPC CHO-K1 Cell Line + Anti-BTLA + Anti-PD1 为例)

本实验使用 1×10^5 cells/孔的 H_BTLA PD-1 Reporter Cell Line 和 1×10^4 cells/孔的 H_HVEM PD-L1 aAPC CHO-K1 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-BTLA hIgG4 Antibody(22B3) (以下简称为 Anti-BTLA), Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab) (以下简称为 Anti-PD1), 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, B11 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	Anti-BTLA + Anti-PD1	PBS	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	PBS
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D													
E													
F													
G													
H													

加样步骤

- 实验前 16–24 h, 将 H_HVEM PD-L1 aAPC CHO-K1 Cell Line 从培养瓶中取出, 消化离心收集细胞沉淀, 使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浓度为 1×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h, 离心收集 H_BTLA 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_BTLA PD-1 Reporter Cell Line 到 2×10^6 cells/mL; 以排枪加 50 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS, 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
Anti-BTLA	2.82 mg/mL	/	直接使用储液
Anti-PD1	0.77 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 B2 孔加入 61.23 μL 、 Assay Buffer，B3-B10 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 B2 中分别加入 2.6 μL Anti-BTLA 和 9.5 μL Anti-PD1），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.33 μL ，加入次孔									对照孔	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	2.6 μL Anti-BTLA+9.5 μL Anti-PD1	加入	61.23 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 B2 中吸取 18.33 μL ，加入到第二个稀释孔 B3，充分混匀。
- i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- j) 将步骤 b 准备好的 H_BTLA PD-1 Reporter Cell Line 细胞孔板取出，加入步骤 i 准备好的混合液，每孔 50 μL ，盖上盖板，孵育 1 h。
- k) 取出步骤 a 准备好的 H_HVEM PD-L1 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞孔板，吸弃上清 100 μL ；然后加入步骤 j 孵育好的混合液，每孔 100 μL 。
- l) 盖上盖板，孵育 6 h。
- m) 收样检测 Luciferase。

报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

	0 $\mu\text{g/mL}$ (Anti-BTLA+ Anti-PD1)	50 $\mu\text{g/mL}$ (Anti-BTLA+ Anti-PD1)	762.94 $\mu\text{g/mL}$ (Anti-BTLA+ Anti-PD1)
H_BTLA PD-1 Reporter Cell Line + H_HVEM PD-L1 aAPC CHO-K1 Cell Line	9352	37070	8621
	0 $\mu\text{g/mL}$ Anti-BTLA	50 $\mu\text{g/mL}$ Anti-BTLA	762.94 $\mu\text{g/mL}$ Anti-BTLA
H_BTLA PD-1 Reporter Cell Line + H_HVEM aAPC CHO-K1 Cell Line	18689	59370	16037
H_BTLA PD-1 Reporter Cell Line + H_HVEM PD-L1 aAPC CHO-K1 Cell Line	11846	14730	9212
	0 $\mu\text{g/mL}$ Anti-PD1	50 $\mu\text{g/mL}$ Anti-PD1	762.94 $\mu\text{g/mL}$ Anti-PD1
H_BTLA PD-1 Reporter Cell Line + aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1	7156	21721	7078
H_BTLA PD-1 Reporter Cell Line + H_HVEM PD-L1 aAPC CHO-K1 Cell Line	11132	17603	11253

验证结果

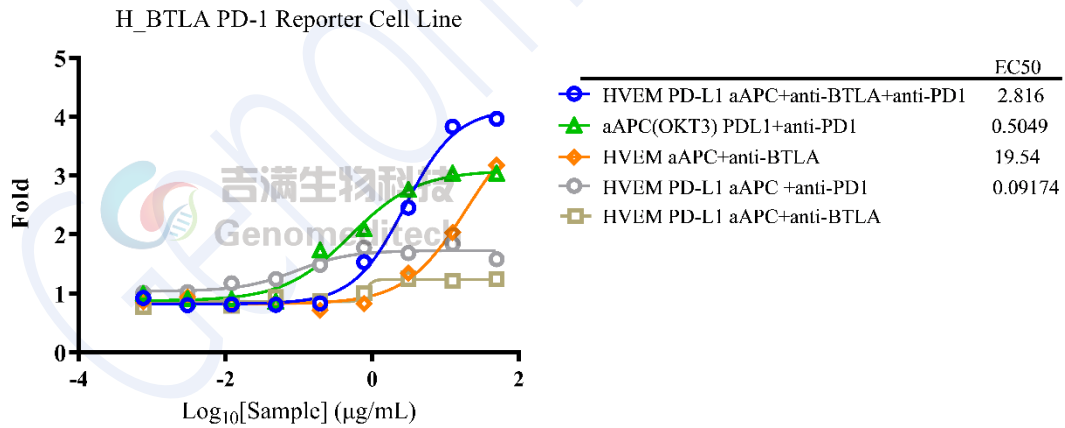


Fig 2. 功能验证结果

附录 1：流式验证结果

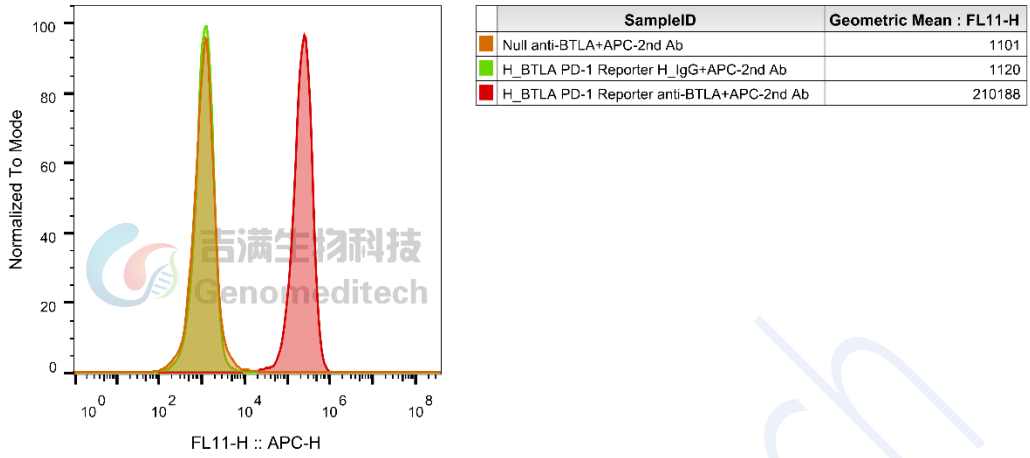


Fig 3. H_BTLA PD-1 Reporter Cell Line 使用 Anti-BTLA hIgG4 Antibody(22B3) (Genomeditech/GM-50103AB) 抗体流式验证结果

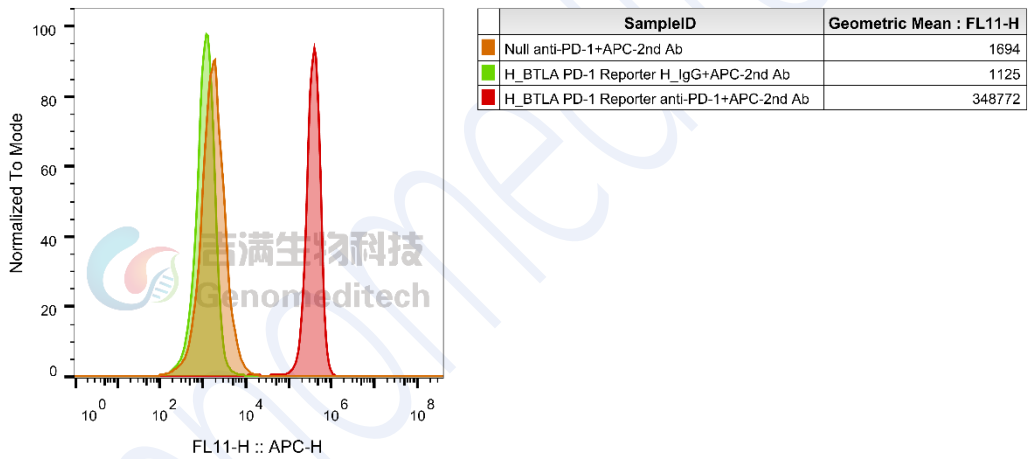


Fig 4. H_BTLA PD-1 Reporter Cell Line 使用 Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab) (Genomeditech/GM-52674AB) 抗体流式验证结果

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