

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
1)	aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line 细胞复苏.....	5
2)	aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line 细胞传代.....	5
3)	aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line 细胞冻存.....	6
4)	H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞复苏.....	6
5)	H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞传代.....	6
6)	H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞冻存.....	7
六、	使用方法.....	8
1.	功能验证实验——Anti-PDL1.....	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	9
2.	功能验证实验——Anti-PD1.....	10
1)	加样步骤.....	10
2)	报告基因检测.....	11
3)	验证结果.....	12
	使用许可协议:.....	13

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；PD-L1 aAPC/CHO-K1 细胞 (aAPC PDL1 CHO Cell Line)，是一种稳定表达人 PD-L1 和一种以抗原非依赖方式激活同源 TCR 的细胞表面蛋白的 CHO-K1 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 信号通路的传导及转录因子介导的 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介导的 luciferase 的表达。

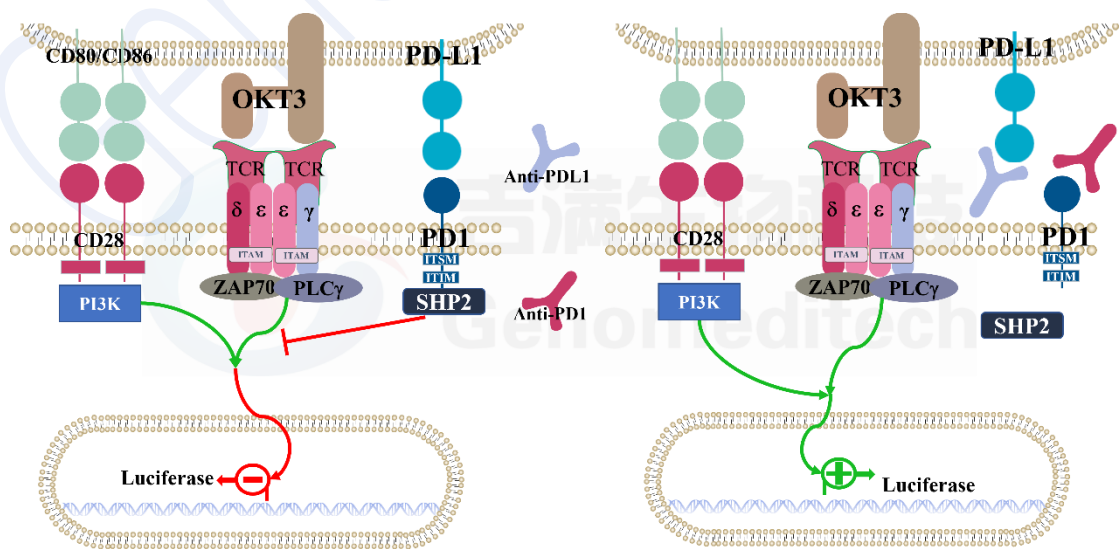


Fig 1. 原理示意图

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-032AS005	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)
aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line	GM-C05269	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。

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

aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line

细胞复苏培养基： F12K+10% FBS+1% P.S

细胞生长培养基： F12K+10% FBS+1% P.S +4 µg/mL Blasticidin+4 µg/mL Puromycin

细胞冻存液： 90% FBS+10% DMSO

CHO-K1 来自中国科学院细胞库，贴壁细胞

Assay Buffer

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

五、实验仪器及试剂

1. 试剂和耗材

名称	规格	制造商/货号
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech /GM-040404-1
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell/C3010-0500
F12K	500 mL	Boster/PYG0036
Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-31740AB
Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab)	/	Genomeditech/GM-52674AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503B

2. 重要仪器

名称	制造商/货号
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) aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line 细胞复苏

- 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。
- 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。
- 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。
- 使用 1 mL 完全培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，活细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补加完全培养基的形式，调整活细胞密度到 $2-3 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中。

2) aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line 细胞传代

- 当细胞密度大于 60%时，即可进行传代。推荐细胞传代比例为 1:4-1:5，2-3 天传代传代。
- 将皿或培养瓶中的培养基弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。

- c) 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液润洗一遍，吸弃，再次吸取 1 mL 消化液，37°C 消化 2-3 min，显微镜下观察。
- d) 待细胞变圆，细胞间隙明显，部分细胞刚开始脱离瓶壁时，加 2 mL 左右完全培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，1000 rpm 室温离心 3 min。
- e) 弃上清，细胞沉淀用完全培养基重悬，根据传代前细胞密度分盘（根据培养皿面积和细胞密度计算，传代后细胞密度为 20-30%）。

3) aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 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 5×10^6 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。

4) H_PD-1 Reporter Jurkat 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。

5) H_PD-1 Reporter Jurkat 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 2×10^6 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。

6) H_PD-1 Reporter Jurkat 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 5×10^6 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。

Genomeditech

六、使用方法

1. 功能验证实验——Anti-PDL1

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。使用 Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody (150 kDa; 以下简称为 Anti-PDL1) 作为阳性抗体。起始终浓度(Conc.01)为 15 $\mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排在 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	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	PBS
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，将 aAPC(OKT3) PDL1 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 2.5×10^5 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，于孵箱中孵育过夜使用。实验前 1-2 h，离心收集 H_PD-1 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，调整细胞浓度到 2×10^6 cells/mL，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
Anti-PDL1	2.8 mg/mL	0.28 mg/mL	使用 2 μL 储液 + 18 μL Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 65.5 μL Assay Buffer，B2-B11 孔，加入 55 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 中加入 7.86 μL Anti-PDL1），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.3 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	7.86 μL Anti-PDL1	加入	65.5 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													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.3 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- i) 将步骤 a 准备好的 aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line 细胞孔板取出，吸弃 95 μL 上清，每孔加入 50 μL 步骤 a 准备好的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞，再每孔加 50 μL 梯度稀释的抗体，混匀后孵育 16 h。
- j) 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 Reporter Jurkat Cell	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	228.88 pg/mL
Line+Anti-PDL1	624	3166	685

3) 验证结果

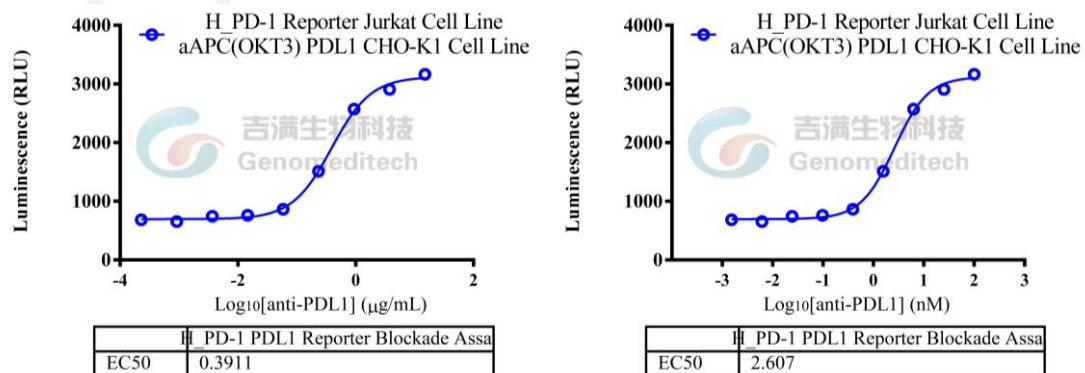


Fig 2. 验证结果

（右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. 功能验证实验——Anti-PD1

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。使用 Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab) (150 kDa; 以下简称为 Pembrolizumab) 作为阳性抗体，Human IgG4 Isotype Antibody (150 kDa; 以下简称为 IgG Antibody) 作为阴性对照抗体。以 Pembrolizumab 为例，起始终浓度(Conc.01)为 30 $\mu\text{g/mL}$ ，3 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	Pembrolizumab	PBS	30 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	3.33 $\mu\text{g/mL}$	1.11 $\mu\text{g/mL}$	370.37 ng/mL	123.46 ng/mL	41.15 ng/mL	13.72 ng/mL	4.57 ng/mL	0	PBS
C	IgG Antibody	PBS	15 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	1.67 $\mu\text{g/mL}$	555.56 ng/mL	185.19 ng/mL	61.73 ng/mL	20.58 ng/mL	6.86 ng/mL	2.29 ng/mL	0	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 16-24 h，将 aAPC(OKT3) PDL1 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 1.5×10^5 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，于孵箱中孵育过夜使用。实验前 1-2 h，离心收集 H_PD-1 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，调整细胞浓度到 2×10^6 cells/mL，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
Pembrolizumab	0.77 mg/mL	/	直接使用储液
IgG Antibody	1 mg/mL	/	直接使用储液

- e) 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 76 μL Assay Buffer, B2-B11 孔, 加入 55 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 中加入 6.5 μL Pembrolizumab), 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	6.5 μL Pembrolizumab	加入	76 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	
C	2.5 μL IgG Antibody	加入	80 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	
D														
E														
F														
G														
H														

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5 μL , 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 充分混匀
- h) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- i) 将步骤 a 准备好的 aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line 细胞孔板取出, 吸弃 90 μL 上清, 每孔加入 50 μL 步骤 a 准备好的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞, 再每孔加 50 μL 梯度稀释的抗体, 混匀后孵育 7 h。
- j) 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 Reporter Jurkat Cell Line+Pembrolizumab	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	4.57 ng/mL
	3535	25935	3966
H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line+IgG Antibody	0 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$	2.29 ng/mL
	3125	3540	3719

3) 验证结果

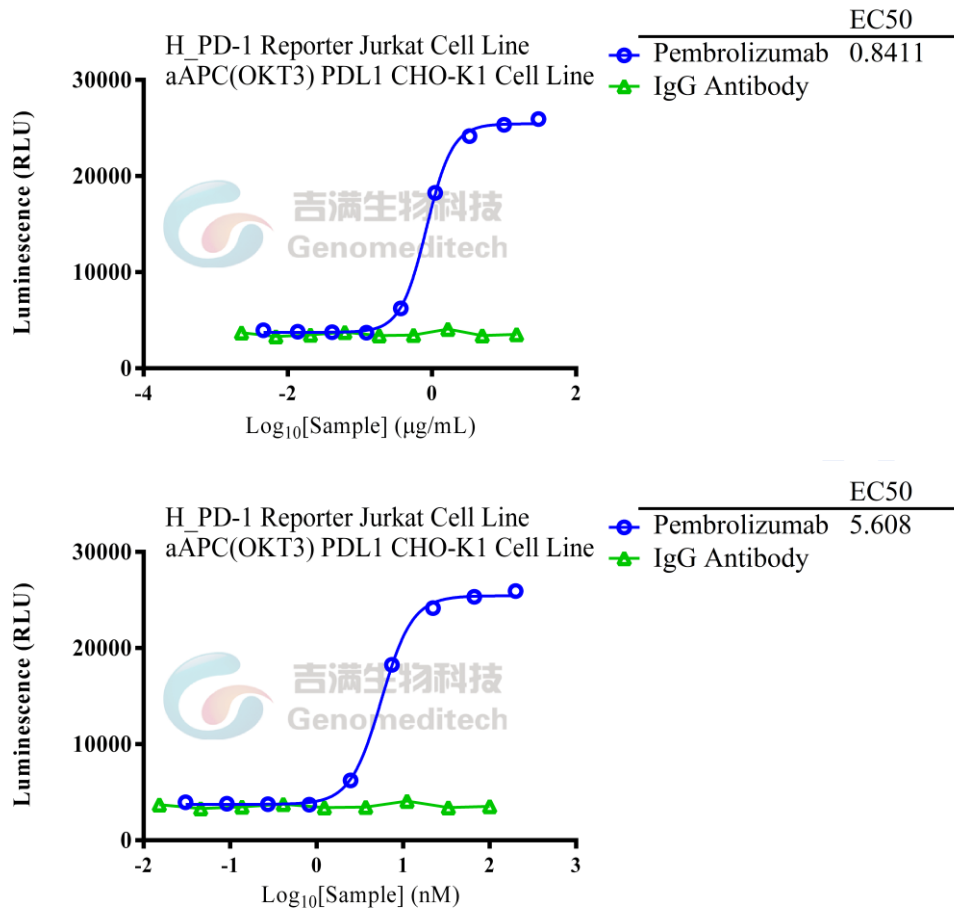


Fig 3. 验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

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