

产品手册

H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line

H_PD-1 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：V2.11.1

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	6
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备	6
2.	试剂耗材准备	6
五、	细胞复苏、传代、冻存	7
1.	细胞复苏	7
2.	细胞传代	7
3.	细胞冻存	7
六、	使用方法（与 aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 细胞）	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	10
2.	功能验证实验——Anti-PD1	11
1)	加样步骤	11
2)	报告基因检测	12
3)	验证结果	13
七、	使用方法（与 H_PD-L1 Raji 细胞）	14
1.	功能验证实验——Anti-PDL1	14
1)	加样步骤	14
2)	报告基因检测	15
3)	验证结果	16
2.	功能验证实验——Anti-PD-1	17
1)	加样步骤	17
2)	报告基因检测	19
3)	验证结果	19
八、	使用方法（PD-1 激动剂）	20
1.	功能验证实验	20
1)	加样步骤	20
2)	报告基因检测	22
3)	验证结果	22
附录 1	流式验证结果	23
附录 2	稳定性验证	23
相关产品		24
使用许可协议：		24

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-C07928	H_PD-1 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-C07928	H_PD-1 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

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。

吉满生物 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 报告基因细胞系，该细胞稳定表达 H_PD-1 基因及 Luciferase 报告基因。其有三套配套的细胞，其一为 aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line (Genomeditech/GM-C05269)，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。其二为 H_PD-L1 Raji Cell Line (Genomeditech/GM-C03541)，是一种稳定表达人 PD-L1 和内源性表达 CD80/CD86 的 Raji 细胞。其三为 H_CD32B aAPC CHO-K1 Cell Line (Genomeditech/GM-C25754)，是一种稳定表达人 CD32B 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 H_PD-1 报告基因细胞与其 PDL1 配套细胞共培养时，PD-1/PD-L1 之间的相互作用会抑制 TCR 信号通路的转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，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。当 H_PD-1 报告基因细胞与 H_CD32B aAPC CHO-K1 Cell Line 共培养，加入 PD-1 激动剂抗体，抗体与 Fc γ RIIb 受体交联，激活 PD-1 下游 SHP2 介导的抑制信号，进而抑制 TCR 下游的激活信号。

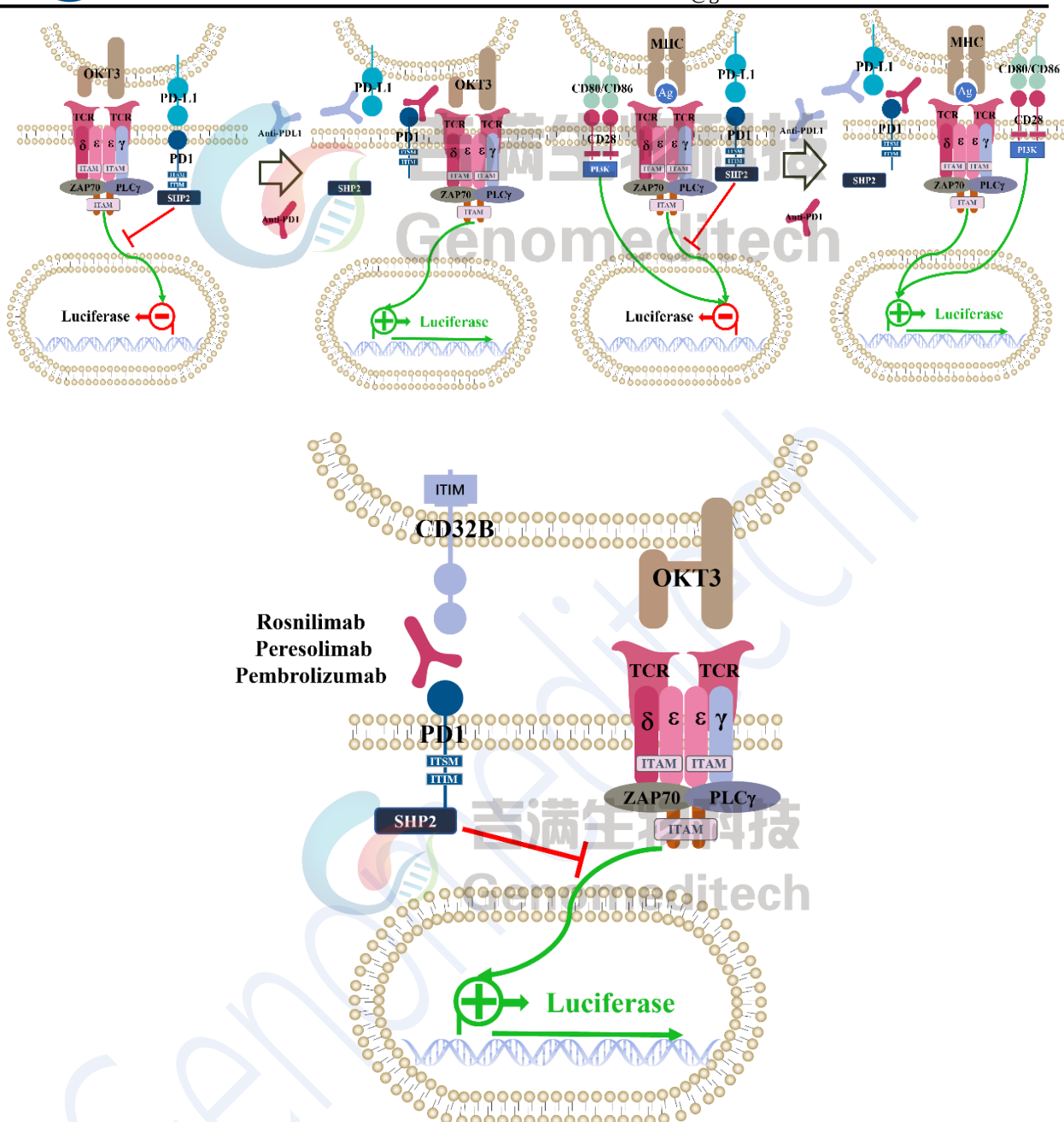


Fig 1. H-PD-1 信号通路图

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
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.
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/C3010-0500
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 Well White Polystyrene Microplate	96-well	Corning/3903
Cell Culture Dish	10 cm	NEST/704001
aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line	5E6 cells/mL	Genomeditech/GM-C05269
H_PD-L1 Raji Cell Line	5E6 cells/mL	Genomeditech/GM-C03541
H_CD32B aAPC CHO-K1 Cell Line	5E6 cells/mL	Genomeditech/GM-C25754
金黄色葡萄球菌肠毒素 (SEE 肠毒素)	1 µg	Genomeditech/GM-H23036
Anti-H_CD274(PDL1) Antibody(Atezolizumab)	hIgG1 /	Genomeditech/GM-31740AB
Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab)	/	Genomeditech/GM-52674AB
Anti-PD1 hIgG1 Antibody(Rosnilimab)	/	Genomeditech/GM-87952AB
Anti-PD1 hIgG1 Antibody(Peresolimab)	/	Genomeditech/GM-87951AB
Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody (Pembio)	/	Genomeditech/GM-87802MAB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503B

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， $176 \times g$ ，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 $176 \times g$ ，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 5×10^6 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 2×10^6 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。
- FBS 血清需 56°C 加热 30 分钟，可灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

六、 使用方法（与 aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 细胞）

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(Atezolizumab)（150 kDa；以下简称 Anti-PDL1）作为阳性抗体。起始浓度(Conc.01)为 15 $\mu\text{g/mL}$ ，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	PBS	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	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 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

- f) 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。
- 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 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													

- h) 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
- i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- j) 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 b 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。
- k) 使用 GMPOne-Step 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+Anti-PDL1	0 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$	228.88 $\mu\text{g/mL}$
	624	3166	685

3) 验证结果

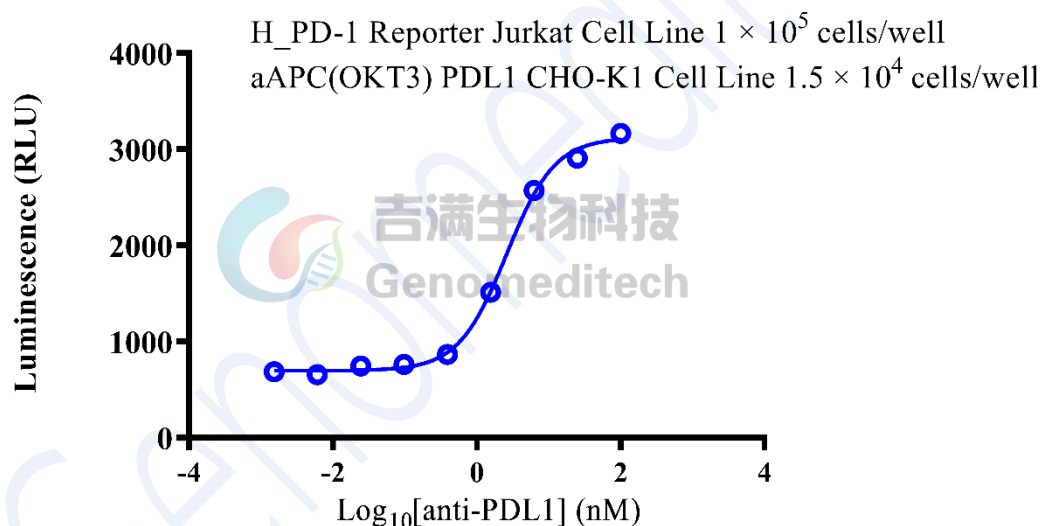
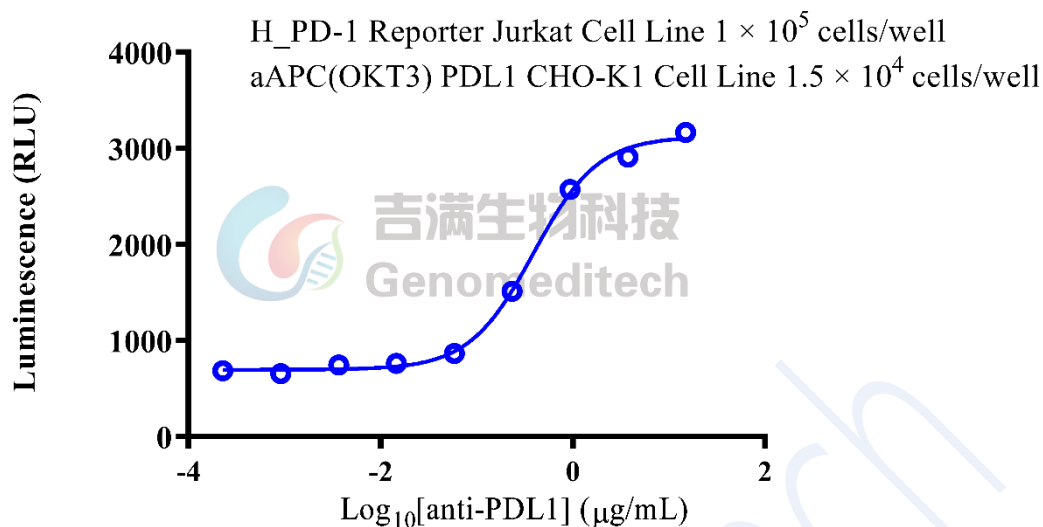


Fig 2. 验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

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 1×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上班盖，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

- f) 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。
- 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 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	
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	
D													
E													
F													
G													
H													

- h) 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
- i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- j) 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 b 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。
- k) 使用 GOne-Step 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

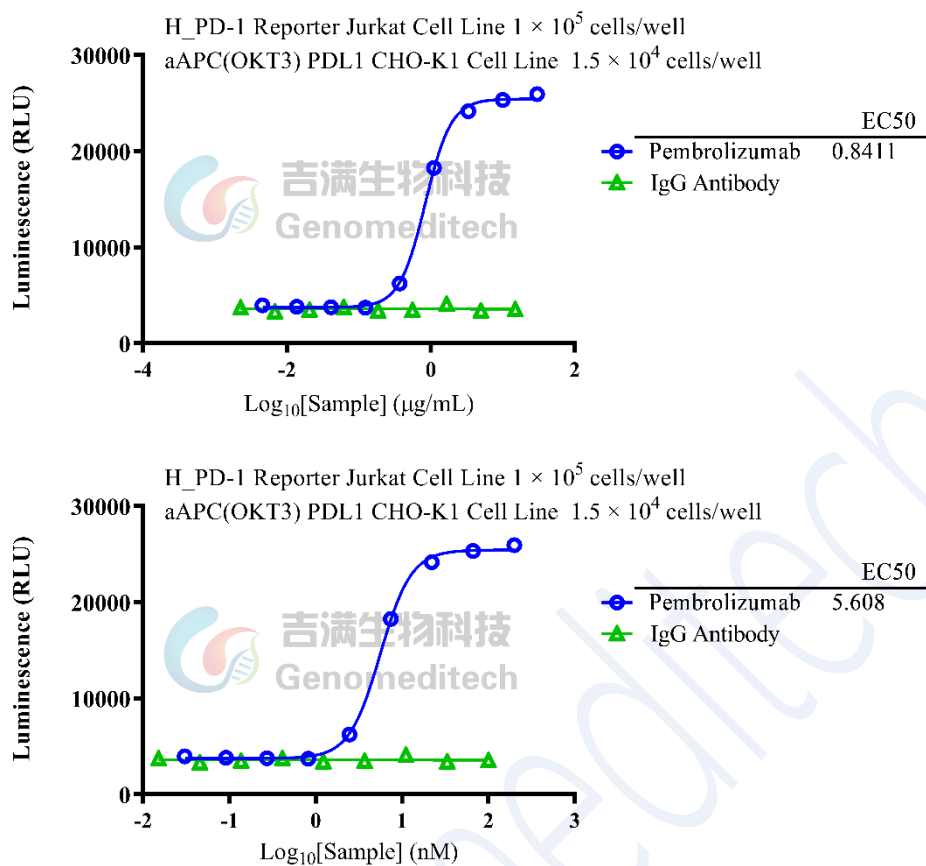


Fig 3. 验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

七、 使用方法（与 H_PD-L1 Raji 细胞）

1. 功能验证实验——Anti-PDL1

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 2×10^4 cells/Well 的 H_PD-L1 Raji Cell Line (接种密度)进行实验。

本实验使用 Anti-PDL1（150 kDa）作为阳性药物，起始终浓度(Conc.01)为 15 $\mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10。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													
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	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

针对不同抗体样品和细胞的话，可调整优化操作步骤以获得更好的结果。如果是针对固定的抗体和细胞进行检测，建议先优化两种细胞之间的比例。

1) 加样步骤

- 在实验前 1-2 h，离心收集 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞，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_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞浓度为 4×10^6 cells/mL，调整 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞浓度为 8×10^5 cells/mL。准备两个 96 孔板，两株细胞以排枪加 25 μL 细胞/孔至两个孔板的 10 个孔。周围的孔加 100 μL PBS。孵育箱中孵育待用。
- 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 行，单重复可以检测 6 个药物）。
- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。以 Anti-PDL1 为例，如 B2 孔中加入 35.9 μL 的 Assay buffer，B3-B11 加入 27.5 μL 的 Assay Buffer。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-PDL1	2.8 mg/mL	/	直接使用储液
SEE	0.4 mg/mL	0.004 mg/mL	2 μ L 储液+198 μ L 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）。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 9.2 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.8 μL Anti-PDL1	加入	35.9 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

g) 在 B2 孔中加入 0.8 μ L 的 Anti-PDL1 抗体，混匀。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。

h) 以此类推，直至 B10 孔，B11 为不加抗体的对照。

i) 将步骤 a 准备好的 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞孔板取出，每孔加 25 μ L 梯度稀释的抗体，孵育 30 min。

j) 配置 5 ng/mL 的 SEE（4 $\times$ 激活浓度）：取 2.75 μ L 的 0.004 mg/mL SEE，加入到 550 μ L Assay Buffer 中，混匀。

k) 将步骤 a 准备好的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞孔板取出，每孔加 25 μ L 步骤 j 配置好的 SEE，孵育 30 min。

l) 30 min 后，使用排枪将孵育好的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line 混合孵育（50 μ L+50 μ L）。

m) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 16 h。

n) 使用 GMPOne-Step 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 PDL1 Reporter Blockade Assay	0 μ g/mL	15 μ g/mL	228.88 pg/mL
	3234	26710	3318

3) 验证结果

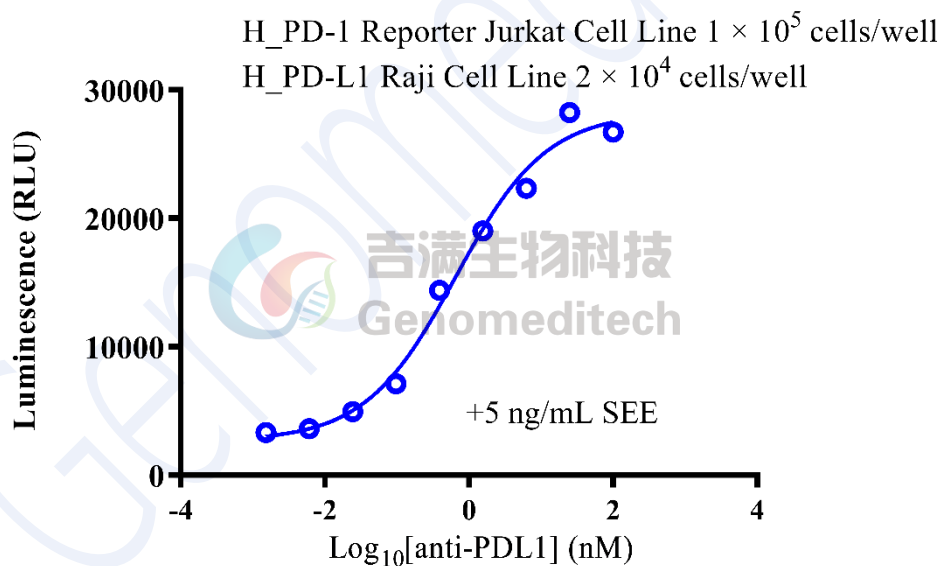
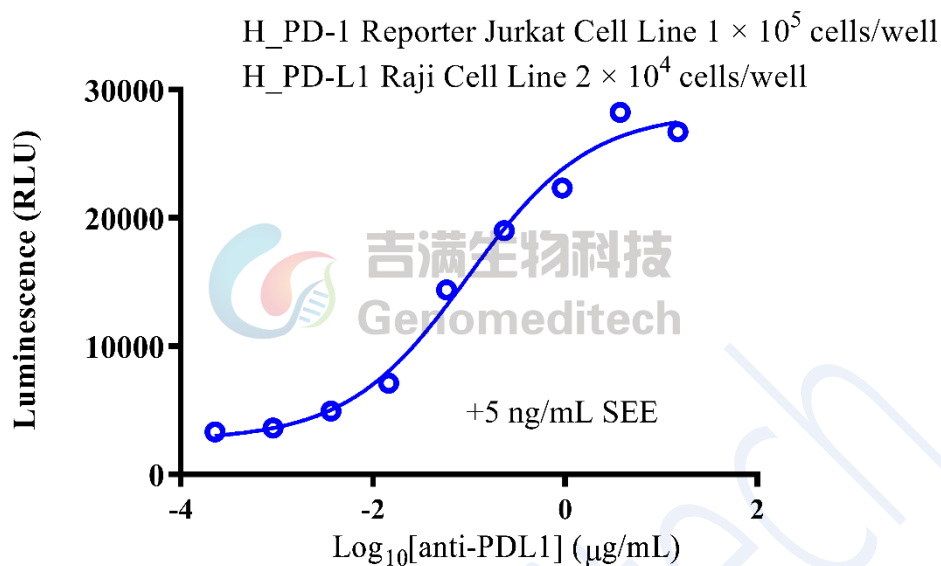


Fig 4. 使用 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line, 验证 Anti-PDL1 的结果示例
(下图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

2. 功能验证实验——Anti-PD-1

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 2×10^4 cells/Well 的 H_PD-L1 Raji Cell Line (接种密度)进行实验。

本实验使用 Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab) (150 kDa; 以下简称为 Pembrolizumab) 作为阳性药物, Human IgG Antibody (150 kDa; 以下简称为 IgG Antibody) 作为阴性对照, 以 Pembrolizumab 为例, 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。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													
B	Pembrolizumab		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	
C	IgG Antibody		30 $\mu\text{g/mL}$	7.5 $\mu\text{g/mL}$	1.88 $\mu\text{g/mL}$	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.3 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 pg/mL	0	
D													
E													
F													
G													
H													

针对不同抗体样品和细胞的话, 可调整优化操作步骤以获得更好的结果。如果是针对固定的抗体和细胞进行检测, 建议先优化两种细胞之间的比例。

1) 加样步骤

- 在实验前 1-2 h, 离心收集 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞, 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_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞浓度为 4×10^6 cells/mL, 调整 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞浓度为 8×10^5 cells/mL。准备两个 96 孔板, H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞以排枪加 25 μL 细胞/孔至中间 20 个孔, H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞以排枪加 25 μL 细胞/孔至另一个 96 孔板的中间 20 个孔。周围的孔加 100 μL PBS。孵育箱中孵育待用。
- 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 行, 单重复可以检测 6 个药物)。
- 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。以 Pembrolizumab 为例, 如 B2 孔中加入 27.2 μL 的 Assay buffer, B3-B11 加入 27.5 μL 的 Assay Buffer。

e) 母液配置

药物名称	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
SEE	0.4 mg/mL	0.004 mg/mL	2 μ L 储液+198 μ L 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）。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 9.2 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	9.5 μL Pembrolizumab 加入		27.2 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	
C	4.4 μL IgG Antibody 加入		32.3 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	
D													
E													
F													
G													
H													

g) 在 B2 孔中加入 9.5 μ L 的 Pembrolizumab，混匀。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。

h) 以此类推，直至 B10 孔，B11 为不加抗体的对照。

i) 将步骤 a 准备好的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞孔板取出，每孔加 25 μ L 梯度稀释的抗体，孵育 30 min。

j) 配置 SEE（4 $\times$ 激活浓度）：取 2.75 μ L 的 0.004 mg/mL SEE，加入到 550 μ L Assay Buffer 中，混匀。

k) 将步骤 a 准备好的 H_PD-L1 Raji Cell Line 细胞孔板取出，每孔加 25 μ L 步骤 j 配置好的 SEE，孵育 30 min。

l) 30 min 后，使用排枪将孵育好的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line 混合孵育（50 μ L+50 μ L）。

m) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 16 h。

n) 使用 GMPOne-step 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 PDL1 Reporter Blockade Assay+Pembrolizumab	0 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	762.94 pg/mL
	6131	40546	6249
H_PD-1 PDL1 Reporter Blockade Assay+IgG Antibody	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	457.76 pg/mL
	6057	6891	6072

3) 验证结果

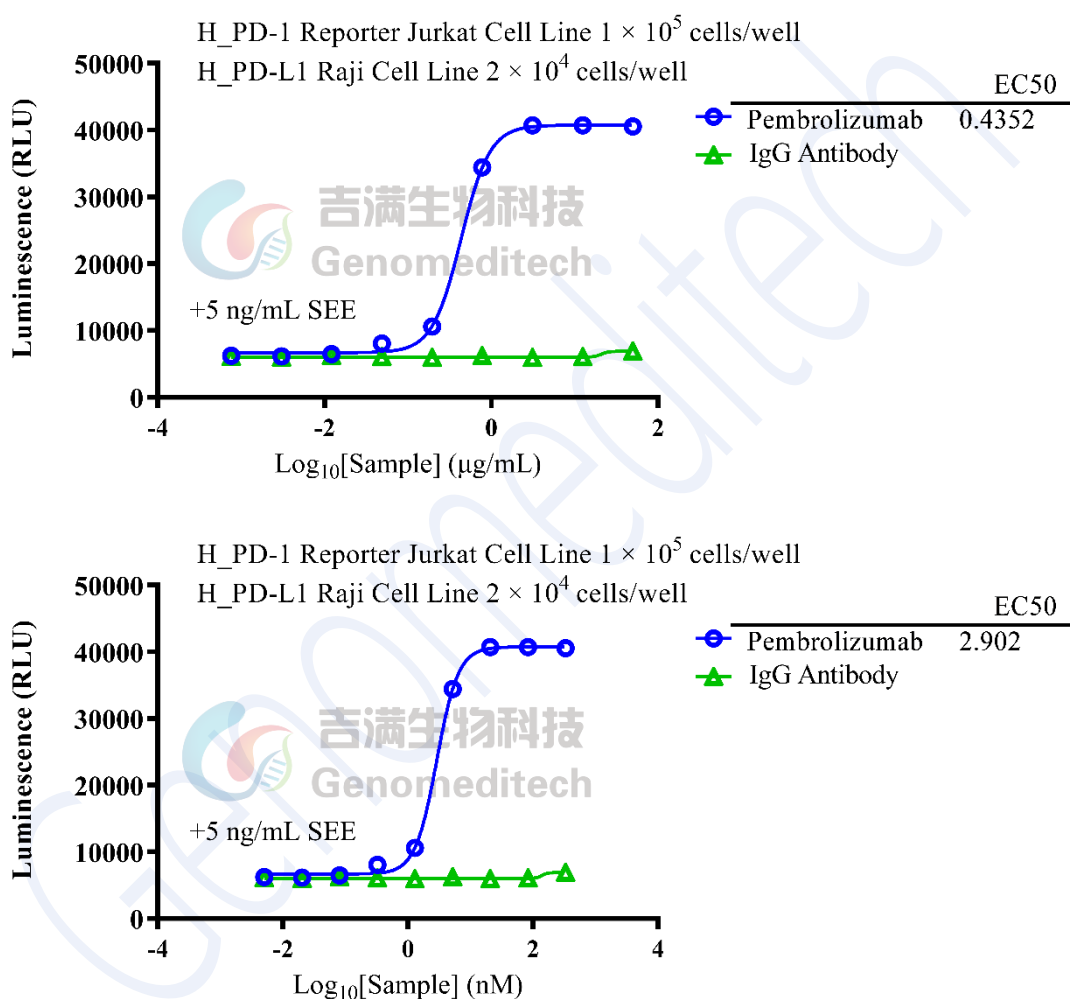


Fig 5. 使用 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PD-L1 Raji Cell Line，验证 Anti-PD-1 的结果示例
(下图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

八、 使用方法（PD-1 激动剂）

1. 功能验证实验

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 和 1×10^4 cells/Well 的 H_CD32B aAPC CHO-K1 Cell Line 进行实验。

本实验使用 Anti-PD1 hlgG1 Antibody(Rosnilimab) (约 150 kDa; 简称 Rosnilimab)、Anti-PD1 hlgG1 Antibody(peresolimab) (约 150 kDa; 简称 Peresolimab)、Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody (Pembio) (约 150 kDa; 简称 Pembrolizumab) 作为阳性药物, Human IgG Antibody (150 kDa; 简称 IgG Antibody) 作为阴性对照, 药物起始终浓度(Conc.01)为 30 μ g/mL, 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10、C2-C10、D2-D10、E2-E10, B11、C11、D11、E11。周围为 100 μ 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	
B	Rosnilimab	PBS	30.00 μ g/mL	7.50 μ g/mL	1.88 μ g/mL	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.30 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 pg/mL	0	PBS
C	Peresolimab	PBS	30.00 μ g/mL	7.50 μ g/mL	1.88 μ g/mL	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.30 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 pg/mL	0	PBS
D	Pembrolizumab	PBS	30.00 μ g/mL	7.50 μ g/mL	1.88 μ g/mL	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.30 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 pg/mL	0	PBS
E	IgG Antibody	PBS	30.00 μ g/mL	7.50 μ g/mL	1.88 μ g/mL	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.30 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 pg/mL	0	PBS
F			PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 16-24 h, 将 H_CD32B 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 μ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖上班盖, 于孵箱中孵育过夜使用。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测样品使用一行 (如 B2-B10、C2-C10、D2-D10、E2-E10 行)。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Rosnilimab	6.04 mg/mL	/	直接使用储液
Peresolimab	5.87 mg/mL	/	直接使用储液
Pembrolizumab	17 mg/mL	/	直接使用储液
IgG Antibody	2 mg/mL	/	直接使用储液

- e) 96 孔 V 孔板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。B2、C2、D2、E2 孔中分别加入 80 μ L 的 Assay buffer，B3-B11、C3-C11、D3-D11、E3-E11 孔分别加入 60 μ 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 B2、C2、D2、E2 中分别加入 0.8 μ L Rosnilimab、0.83 μ L Peresolimab、0.28 μ L Pembrolizumab、2.47 μ L IgG Antibody）。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 20 μ L，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.8 μ L Rosnilimab	加入	80 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	
C	0.83 μ L Peresolimab	加入	80 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	
D	0.28 μ L Pembrolizumab	加入	80 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	
E	2.47 μ L IgG Antibody	加入	80 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2、C2、D2、E2 中分别吸取 20 μ L，加入到第二个梯度稀释孔 B3、C3、D3、E3 中，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10、C10、D10、E10）。
- i) 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。
- j) 将步骤 a 准备好的 H_CD32B aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞孔板取出，吸弃上清 100 μ L；加入步骤 h 准备好的梯度稀释液，每孔 50 μ L，孵育 1h。

- k) 1h 后取出孔板，然后加入步骤 i 准备好的 H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞，每孔 50 μL 。
- l) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- m) 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。

	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	457.76 $\mu\text{g/mL}$
H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line + H_CD32B aAPC CHO-K1 Cell Line + Rosnilimab	14504	1468	13793
H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line + H_CD32B aAPC CHO-K1 Cell Line + Peresolimab	14430	1713	11765
H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line + H_CD32B aAPC CHO-K1 Cell Line + Pembrolizumab	13603	6597	11033
H_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line + H_CD32B aAPC CHO-K1 Cell Line + IgG Antibody	14662	15450	11240

3) 验证结果

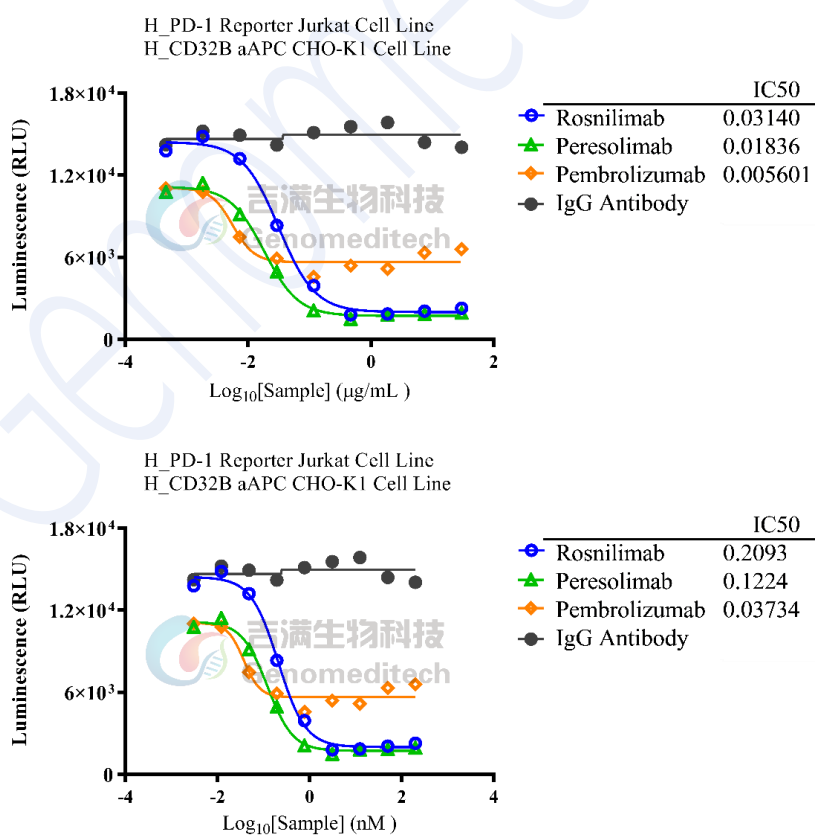


Fig 6. 验证结果

(下图对药物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

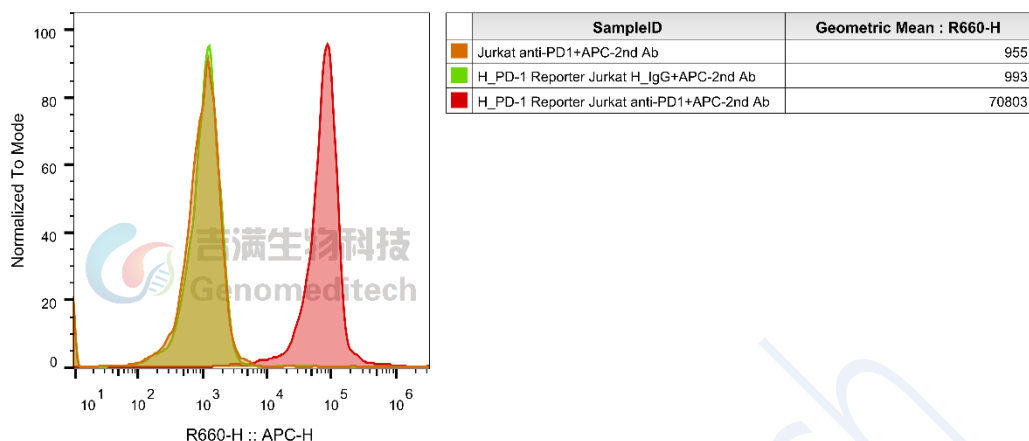


Fig 7. 流式验证结果

附录 2 稳定性验证

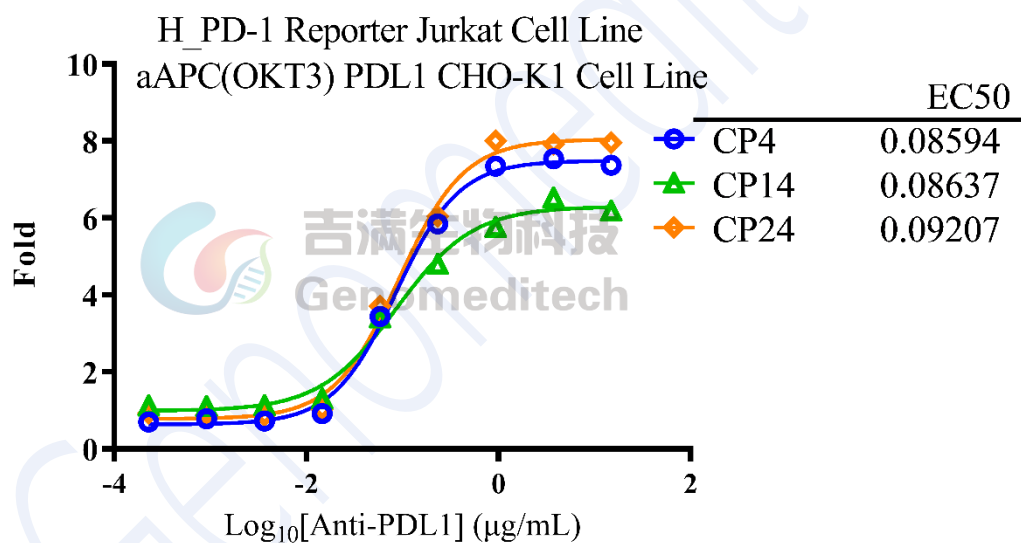


Fig 8. 稳定性验证结果(使用 GM-31740AB: Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody(Atezolizumab)验证)

相关产品

PD-1:PD-L1(B7-H1):PDL2	
Mouse_PDL1 KO MC38 Cell Line	aAPC(OKT3) PDL1 CHO-K1 Cell Line
H_PDCD1LG2(PDL2) aAPC CHO-K1 Cell Line	Mouse PDL1 aAPC CHO-K1 Cell Line
Mouse_PD-1 Reporter Jurkat Cell Line	Canine_PD-1 HEK-293 Cell Line
Cynomolgus_PD1 CHO-K1 Cell Line	H_CD274(PD-L1) CHO-K1 Cell Line
H_CD274(PD-L1) MC38 Cell Line	H_PDCD1(PD-1) CHO-K1 Cell Line
H_PDCD1LG2(PDL2) CHO-K1 Cell Line	H_PD-L1 HEK-293 Cell Line
H_PDL1 LLC1(mouse_PDL1 KO) Cell Line	H_PDL1 LLC1(mouse_PDL1 KO) Cell Line
H_PDL1 MC38(mouse_PDL1 KO) Cell Line	H_PD-L1 Raji Cell Line
M_PDCD1(PD-1) CHO-K1 Cell Line	
Anti-Canine_PD1 mIgG2a Antibody(4F12-E6)	Anti-H_CD274(PDL1) Antibody(Atezolizumab) hIgG1
Anti-H_PDCD1(PD1) hIgG1 Antibody(Budigalimab)	Anti-H_PDCD1LG2 mIgG1 Antibody(3G2)
Anti-mouse PD1 RIgG2a Antibody(RMP1-14)	Anti-mouse PD-L1 mIgG1 Antibody(10F.9G2)
Anti-Mouse_PD1 mIgG1 Antibody(29F.1A12)	Anti-mouse_PD1 mIgG1 Antibody(RMP1-14)
Anti-PD1 hIgG4 Antibody(Pembrolizumab)	Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody (Nivbio)
Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody (Pembio)	Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody (Sintbio)
Anti-PD-1 hIgG4 Reference Antibody (Torbio)	Anti-PD1 hIgG4 Reference Antibody(Cambio)
Anti-PD-1 hIgG4 Reference Antibody(Tislbio)	Anti-PD-L1 hIgG1 Reference Antibody(Avebio)
Anti-PDL1 hIgG4 Reference Antibody(Adebio)	Anti-PD-L2 hIgG1 Antibody(Hz25G4-1.1)
Biotinylated Human PD1 Protein; His-Avi Tag	Biotinylated Human PDL1 Protein; His-Avi Tag
Canine PD1 Protein; hFc Tag	Cynomolgus PDL1 Protein; His Tag
Human PD1 Protein; His Tag	Human PDL1 Protein; His Tag
Mouse PDL1 Protein; His Tag	

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。