

## 产品手册

### H\_CD28 Reporter Jurkat Cell Line

### H\_CD28 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：V2.9.3

## 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.	激活验证实验——包被激活.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
2.	共培养激活，阻断剂抑制实验.....	10
1)	加样步骤.....	10
2)	报告基因检测.....	11
3)	验证结果.....	12
附录一	细胞流式结果.....	13
附录二	稳定性结果.....	13
使用许可协议:	.....	14

## 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-C25147	H_CD28 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-C25147	H_CD28 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

CD28 是 Ig 超家族的同源二聚体刺激细胞表面受体，几乎在啮齿动物的所有 T 细胞上表达，并且在绝大多数 CD4 上表达，是提供 T 细胞活化和存活所需的共刺激信号。CD28 在 T 细胞中诱导共刺激信号，通过其 T 细胞受体 (TCR) 识别同源抗原/主要组织相容性复合物。CD28 进行共刺激是激活幼稚和效应 T 细胞所需的不可或缺的信号。阻断 CD28 依赖性 T 细胞活化已被用于调节移植排斥反应和自身免疫实验模型中的有害免疫反应。

研究发现，用于阻断 CD28/CD80 和 CD86 相互作用的抗体在治疗各种癌症的临床试验中已表达出很好的应用前景。

目前用于测量靶向 CD28 的潜在生物药物活性的方法依赖于原始人类 T 细胞和功能终产物的测量，如细胞增殖，细胞表面标记物表达和干扰素  $\gamma$ (IFN $\gamma$ )和白细胞介素-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\_CD28 Reporter Jurkat Cell Line报告基因细胞系，是基于PKC $\theta$ 信号通路构建的一种Luciferase报告基因细胞系。初始 T 细胞的最佳激活是通过 T 细胞抗原受体 (TCR)/CD3 复合物和共刺激受体 CD28 的结合来启动的。通过CD28激活共同刺激T细胞开始信号传导，CD28细胞内酪氨酸残基被磷酸化，激活PI3K，招募PLC和ZAP70。通过PKC $\theta$ 信号通路，激活下游报告基因，从而激活荧光素酶 (Luciferase) 的表达。加入阻断CD28的抗体后，会阻断共刺激信号，导致TCR信号被抑制，从而不会激活Luciferase蛋白的表达。

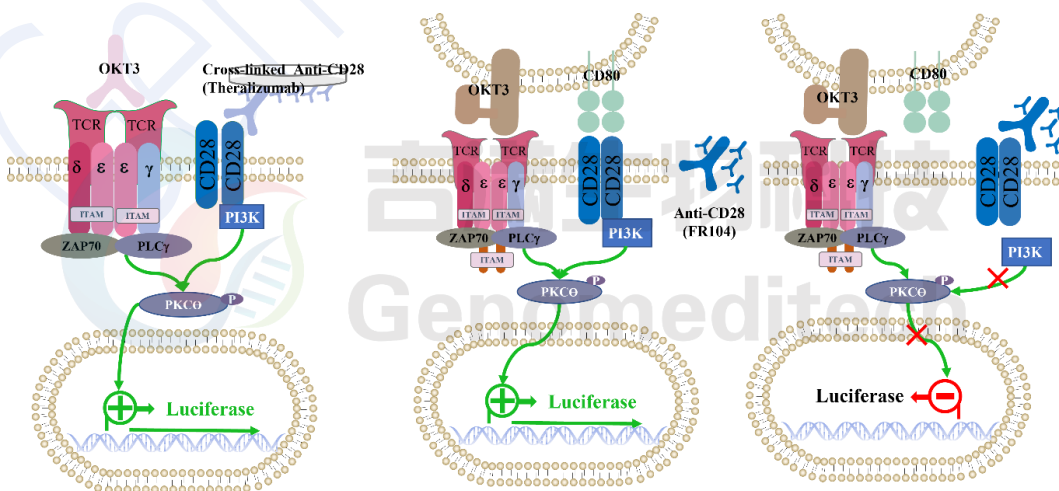


Fig 1.CD28 原理图

## 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
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
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Vivacell/C3010-0500
Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates	96-well	Thermo/442404
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 Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
H_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL	Genomeditech/GM-C24688
Anti-H_CD28 Antibody(Theralizumab)	hIgG4 /	Genomeditech/GM-27197AB
IgG Antibody	/	Expression
Anti-CD28 hIgG4 Antibody(FR104)	/	Genomeditech/GM-52277AB
Anti-CD3 epsilon Antibody [OKT-3 (muromonab)]	/	Genomeditech/GM-51478AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	/	Genomeditech/GM-040503

#### 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. 激活验证实验——包被激活

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_CD28 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  cells/孔。本次实验使用 Anti-H\_CD28 hIgG4 Antibody(Theralizumab) (150 kDa; 以下简称 Theralizumab) 作为阳性药物，IgG Antibody 作为阴性对照。以 Theralizumab 为例，Conc.01 浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ ，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	Theralizumab	PBS	100 $\mu\text{g/mL}$	33.33 $\mu\text{g/mL}$	11.11 $\mu\text{g/mL}$	3.7 $\mu\text{g/mL}$	1.23 $\mu\text{g/mL}$	411.52 $\text{ng/mL}$	137.17 $\text{ng/mL}$	45.72 $\text{ng/mL}$	15.24 $\text{ng/mL}$	0	PBS
C	IgG Antibody	PBS	15 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	1.67 $\mu\text{g/mL}$	555.56 $\text{ng/mL}$	185.19 $\text{ng/mL}$	61.73 $\text{ng/mL}$	20.58 $\text{ng/mL}$	6.86 $\text{ng/mL}$	2.29 $\text{ng/mL}$	0	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E													
F													
G													
H													

#### 1) 加样步骤

- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Theralizumab	3.45 mg/mL	/	直接使用储液
IgG Antibody	1 mg/mL	/	直接使用储液
Anti-CD3 epsilon Antibody [OKT-3 (muromonab)] (以下简称为 OKT3)	3.66 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中，加入包被液（15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ，35 mM  $\text{NaHCO}_3$ ，pH 9.6），各孔体积见下表，如 B2 孔加入 160.2  $\mu\text{L}$  包被液，B3-B11 孔，加入 110  $\mu\text{L}$  包被液。
- 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 4.8  $\mu\text{L}$ ）

Theralizumab)，混匀。

- f) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 55  $\mu\text{L}$ ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- g) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 55 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照孔		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12
A														
B	4.8 $\mu\text{L}$ Theralizumab	加入	160.2 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	
C	2.5 $\mu\text{L}$ IgG Antipdu	加入	162.5 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	
D														
E														
F														
G														
H														

- h) 准备一个 96 孔高结合板，紫外灭菌 15 min。将梯度稀释液加入到高结合板中，100  $\mu\text{L}$  每孔，于 4°C 过夜后使用。
- i) 在实验前 1 h，将细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用 Assay Buffer 重悬，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。
- j) 配置 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  OKT3: 1100  $\mu\text{L}$  1% FBS 培养基+1.8  $\mu\text{L}$  药物。
- k) 将步骤 h 包被过夜的孔板取出，Assay Buffer 润洗 2 遍后，加入步骤 i 准备好的细胞悬液，每孔 50  $\mu\text{L}$ ，再加入步骤 j 配置好的 OKT3 药物，每孔 50  $\mu\text{L}$ 。
- l) 盖上市板盖，于 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 7 h。
- m) 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。

H_CD28 Reporter Jurkat Cell Line+Theralizumab	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15.24 ng/mL
	1756	20037	1905
H_CD28 Reporter Jurkat Cell Line+IgG Antibody	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2.29 ng/mL
	2139	2554	2091



### 3) 验证结果

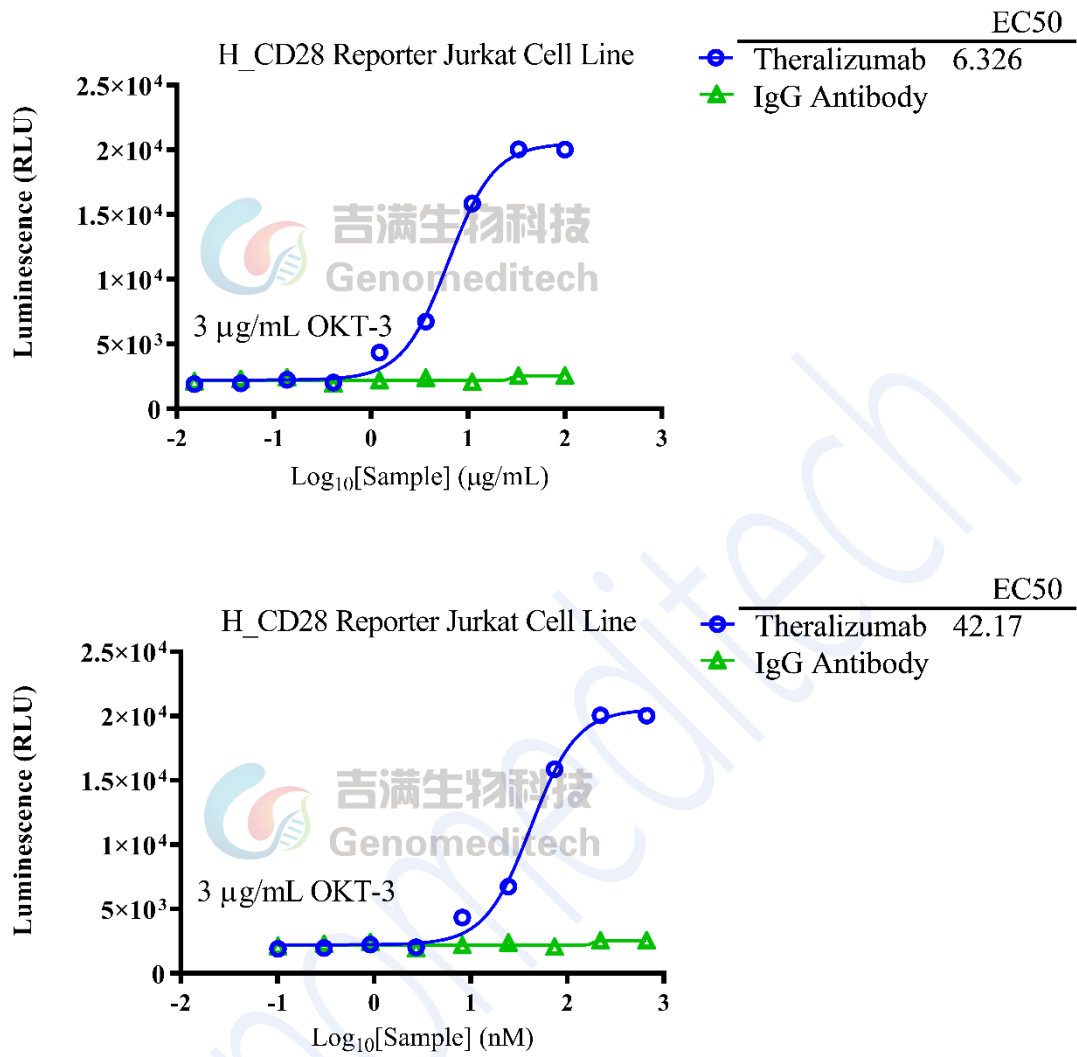


Fig 2.功能验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 2. 共培养激活，阻断剂抑制实验

本实验使用  $1 \times 10^5$  cells/Well 的 H\_CD28 Reporter Jurkat Cell Line 和  $2 \times 10^4$  cells/Well 的 H\_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line (接种密度)进行实验。

使用 Anti-CD28 hIgG4 Antibody(FR104) (以下简称为 FR104;150 kDa)，起始终浓度 (Conc.01)为 10  $\mu\text{g/mL}$ ，10 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  $\mu\text{L}$  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	FR104	10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	100 $\text{ng/mL}$	10 $\text{ng/mL}$	1 $\text{ng/mL}$	100 $\text{pg/mL}$	10 $\text{pg/mL}$	1 $\text{pg/mL}$	100 $\text{fg/mL}$	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，消化离心收集 H\_CD80 aAPC CHO-K1 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，调整细胞密度到  $2 \times 10^5$  cells/mL，以排枪加 100  $\mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔，周围的孔加 100  $\mu\text{L}$  PBS，盖上市盖，于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h，离心收集 H\_CD28 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\_CD28 Reporter Jurkat Cell Line 到  $2 \times 10^6$  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 B2-B10）。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
FR104	3.04 $\text{mg/mL}$	0.304 $\text{mg/mL}$	18 $\mu\text{L}$ Assay Buffer + 2 $\mu\text{L}$ 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 57.0  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55  $\mu\text{L}$  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 4.1  $\mu\text{L}$  FR104），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 6.1 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	4.1 $\mu\text{L}$ FR104	加入	57.0 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 6.1  $\mu\text{L}$ ，加入到第二个梯度稀释孔 B2，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\_CD28 Reporter Jurkat Cell Line 细胞取出，向步骤 i 的梯度稀释的抗体孔板中，依次加入 55  $\mu\text{L}$  细胞（B2-B10），孵育 1 h。
- k) 1 h 后将步骤 a 准备好的 H\_CD80 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞孔板取出，每孔吸弃 100  $\mu\text{L}$  细胞，然后将步骤 j 孵育好的混合液，吸取 100  $\mu\text{L}$ /孔加入到步骤 a 的细胞孔板中，盖上盖板，继续孵育 6 h。
- l) 使用 One-Step 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。

H_CD28 Reporter Jurkat Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 fg/mL
	4640475	361269	4646868

### 3) 验证结果

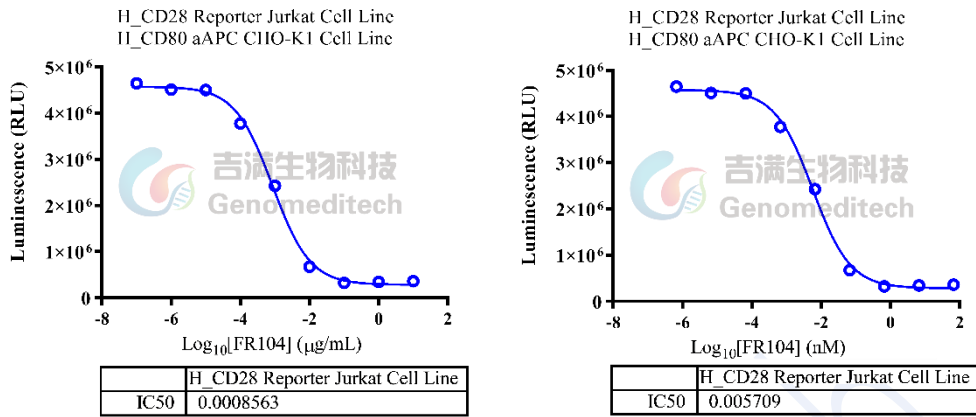


Fig 3. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 附录一 细胞流式结果

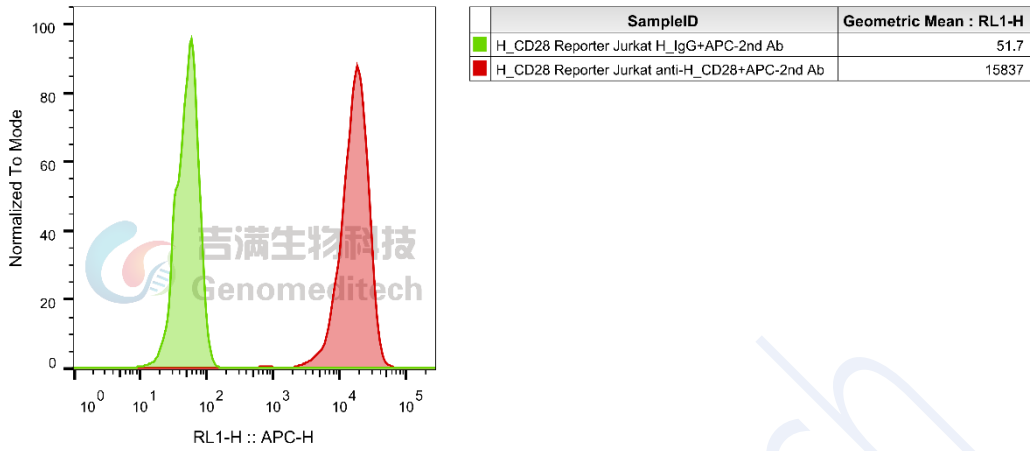


Fig 4. 使用 Theralizumab hIgG4 Antibody (Genomeditech/GM-27197AB) 抗体流式验证 CD28 表达结果

## 附录二 稳定性结果

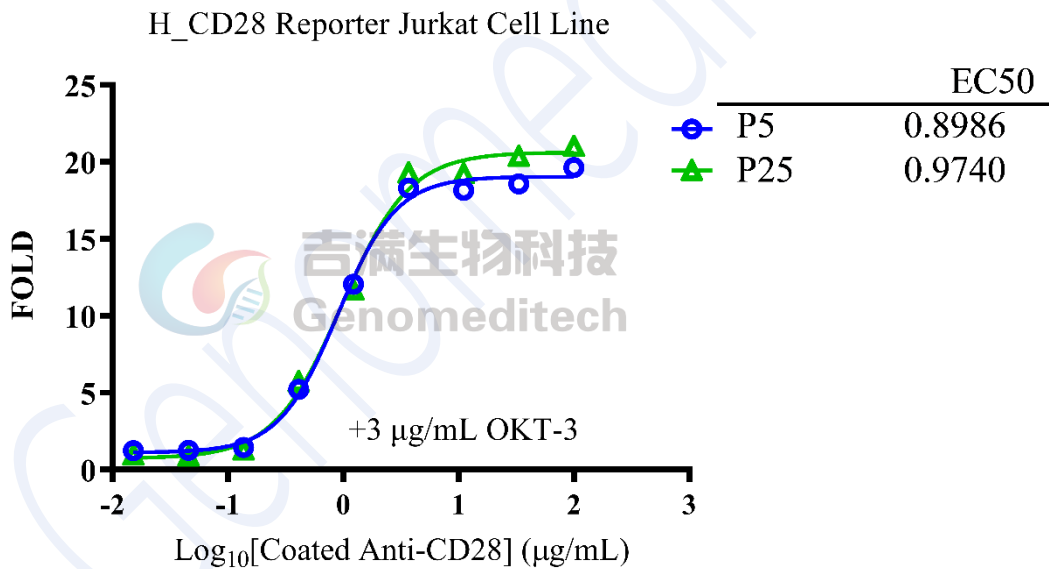


Fig 5. 稳定性验证结果

## 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