

产品手册

Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line

Jurkat CD3-BsAb 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：V2.9.3

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
六、	使用方法（以 Raji 为例）.....	7
加样步骤.....	7	
报告基因检测.....	8	
验证结果.....	9	
七、	使用方法（以 CHO-K1 为例）.....	9
加样步骤.....	10	
报告基因检测.....	11	
验证结果.....	12	
附录 1:	Raji Cell Line 流式验证结果.....	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-C17940	Jurkat CD3-BsAb 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-C17940	Jurkat CD3-BsAb 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

双特异性抗体（BsAb）是一种新兴的肿瘤治疗方法。传统单抗是通过两个 Fab 臂识别相同的抗原，与之不同，双抗则可以在两个抗原结合臂上分别识别不同的抗原。在众多双抗中，CD3-BsAb（CD3 重导向双抗）尤为特别，因为它可以使 T 细胞有效地识别并杀伤肿瘤细胞。

用 CD3-BsAb 对肿瘤进行免疫治疗是某些血液系统恶性肿瘤的一种已被批准的治疗方法，目前正在对实体癌进行临床研究。然而，实体瘤的治疗面临着更为明显的障碍，如靶向非肿瘤毒性增加、T 细胞浸润稀疏以及由于免疫抑制肿瘤微环境的存在而导致 T 细胞质量受损，这些都影响 CD3-BsAb 治疗的安全性和有效性。

吉满生物 Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line 细胞系是以 Jurkat 为工具细胞构建的报告基因细胞系。CD3-BsAb 的生物活性可以通过 BsAb 桥接 Antigen 激活 TCR，信号通路传递信号到细胞核内而产生的荧光素酶来定量。该细胞系可用于 CD3-BsAb 抗肿瘤药物的研究。

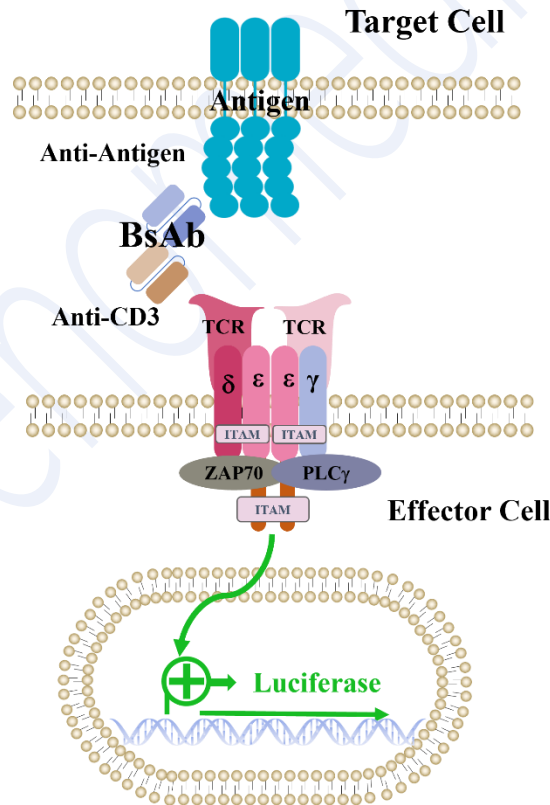


Fig 1. 信号通路图

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
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
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		
Raji Cell Line	1 管 (5E6Cell/mL)	Genomeditech/GM-C19100
H_CD19 CHO-K1 Cell line	1 管 (5E6Cell/mL)	Genomeditech/GM-C19025
Anti-CD3-CD19 Antibody(Blinatumomab)	Bispecific /	Genomeditech/GM-79712AB
Anti-CD3 epsilon hIgG1 Antibody [OKT-3 (muromonab)]	/	Genomeditech/GM-51478AB
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。

六、使用方法（以 Raji 为例）

本实验使用 1×10^5 cells/孔的 Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line 和 1×10^5 cells/孔的 Raji Cell Line 进行实验（对照组为不加 Raji Cell Line，只有 Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line 和抗体）。

以实验组（Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line + Raji Cell Line + 抗体）为例：Anti-CD3-CD19 Bispecific Antibody(Blinatumomab) (以下简称为 Blinatumomab;57.4 kDa)，Anti-CD3 epsilon hIgG1 Antibody [OKT-3 (muromonab)] (以下简称为 OKT-3;150 kDa)，起始终浓度 (Conc.01)为 $1 \mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11、C1-C11，B12、C12 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	Blinatumomab $1 \mu\text{g/mL}$	250 ng/mL	62.5 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 pg/mL	15.26 pg/mL	3.81 pg/mL	953.67 fg/mL	0
C	OKT-3 $1 \mu\text{g/mL}$	250 ng/mL	62.5 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 pg/mL	15.26 pg/mL	3.81 pg/mL	953.67 fg/mL	0
D	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E												
F												
G												
H												

加样步骤

- 实验前 1–2 h，离心收集 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，调整细胞密度到 3.03×10^6 cells/mL，以排枪加 $33 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔，周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS，盖板上盖，于孵箱中待用。
- 实验前 1-2 h，离心收集 Jurkat CD3-BsAb 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 Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line 到 3.03×10^6 cells/mL 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 B1-B11、C1-C11）。

e) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Blinatumomab	0.331 mg/mL	/	直接使用储液
OKT-3	2.595 mg/mL	0.2595 mg/mL	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer

f) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1、C1 孔分别加入 47.96 μ L、47.83 μ L Assay Buffer，B2-B12、C2-C12 孔，加入 36.3 μ 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 B1 中加入 0.44 μ L Blinatumomab、C1 中加入 0.57 μ L OKT-3），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 12.1 μ L，加入次孔											对照孔
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.44 μ L Blinatumomab	47.96 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L
C	0.57 μ L OKT-3	47.83 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L
D													
E													
F													
G													
H													

h) 从第一个梯度稀释孔 B1、C1 中吸取 12.1 μ L，加入到第二个稀释孔 B2、C2，充分混匀。

i) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11、C11）。

j) 取出步骤 a 准备好的 Raji Cell Line 细胞孔板；先将步骤 i 准备好的梯度药物各取出 33 μ L，加入到步骤 a 的 Raji Cell Line 细胞孔板中。

k) 然后再将步骤 b 准备好的 Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line 细胞取出，加入到步骤 j 混合液中，每孔 33 μ L，盖上盖板，孵育 7 h。

l) 收样检测 Luciferase。

报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

	0 $\mu\text{g/mL}$ Blinatumomab	1 $\mu\text{g/mL}$ Blinatumomab	953.67 fg/mL Blinatumomab
Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line + Raji Cell Line	12478	2419654	13674
Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line	9780	475236	11333
	0 $\mu\text{g/mL}$ OKT-3	1 $\mu\text{g/mL}$ OKT-3	953.67 fg/mL OKT-3
Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line + Raji Cell Line	10367	1112902	13318
Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line	8958	761768	9679

验证结果

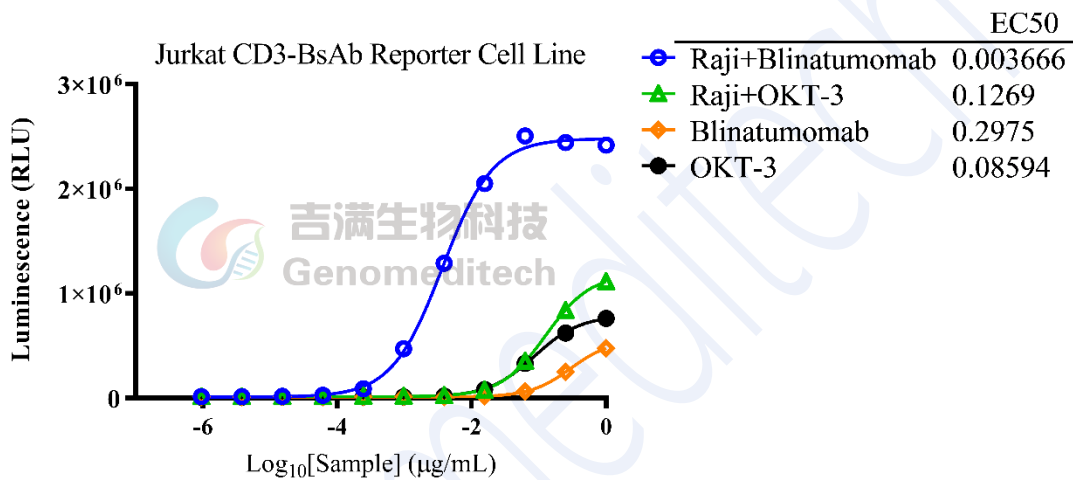


Fig 2. 功能验证结果

七、 使用方法（以 CHO-K1 为例）

本实验使用 1×10^5 cells/孔的 Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line、 1×10^4 cells/孔的 H_CD19 CHO-K1 Cell line、 1×10^4 cells/孔的 CHO-K1 Cell Line 进行实验。

以实验组 (Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line + H_CD19 CHO-K1 Cell line + 抗体) 为例：
Anti-CD3-CD19 Bispecific Antibody (Blinatumomab) (以下简称为 Blinatumomab; 57.4 kDa)，
Anti-CD3 epsilon hIgG1 Antibody [OKT-3 (muromonab)] (以下简称为 OKT-3; 150 kDa)，起始
终浓度 (Conc.01) 为 $1 \mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11、C1-C11，
B12、C12 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	Blinatumomab 1 μg/mL	250 ng/mL	62.5 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 pg/mL	15.26 pg/mL	3.81 pg/mL	953.67 fg/mL	0
C	OKT-3 1 μg/mL	250 ng/mL	62.5 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 pg/mL	15.26 pg/mL	3.81 pg/mL	953.67 fg/mL	0
D	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E												
F												
G												
H												

加样步骤

- 实验前 16–24 h, 消化离心收集 H_CD19 CHO-K1 Cell line 细胞, 以完全培养基重悬细胞, 计算细胞密度及活力, 通过补加完全培养基的方式, 调整细胞密度到 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 Jurkat CD3-BsAb 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 Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line 到 3.03×10^6 cells/mL 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 B1-B11、C1-C11)。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Blinatumomab	0.331 mg/mL	/	直接使用储液
OKT-3	2.595 mg/mL	0.2595 mg/mL	取 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 B1、C1 孔分别加入 47.96 μL、47.83 μL Assay Buffer, B2-B12、C2-C12 孔, 加入 36.3 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 B1 中加入 0.44 μL Blinatumomab、C1 中加入 0.57 μL OKT-3），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 12.1 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.44 μL Blinatumomab	47.96 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL
C	0.57 μL OKT-3	47.83 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL
D													
E													
F													
G													
H													

- h) 从第一个梯度稀释孔 B1、C1 中吸取 12.1 μL ，加入到第二个稀释孔 B2、C2，充分混匀。
- i) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11、C11）。
- j) 取出步骤 a 准备好 H_CD19 CHO-K1 Cell line 细胞孔板；吸弃上清 100 μL ；
- k) 将步骤 i 准备好的梯度药物各取出 33 μL ，加入到步骤 a 的 H_CD19 CHO-K1 Cell line 细胞孔板。
- l) 然后再将步骤 b 准备好的 Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line 细胞取出，加入到步骤 K 混合液中，每孔 33 μL ；然后每孔再分别加入 33 μL Assay Buffer，盖上盖板，孵育 7 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 µg/mL Blinatumomab	1 µg/mL Blinatumomab	953.67 fg/mL Blinatumomab
Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line + H_CD19 CHO-K1	9966	811425	10953
Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line + CHO-K1	8855	474068	9198
Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line	9780	475236	11333
	0 µg/mL OKT-3	1 µg/mL OKT-3	953.67 fg/mL OKT-3
Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line + H_CD19 CHO-K1	10237	704038	11314
Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line + CHO-K1	9687	668131	10577
Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line	8958	761768	9679

验证结果

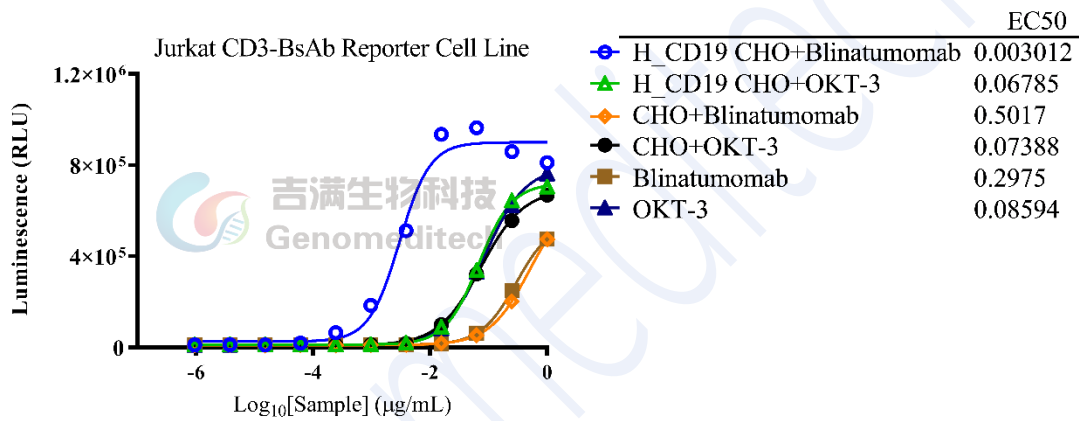


Fig 3. 功能验证结果

附录 1: Raji Cell Line 流式验证结果

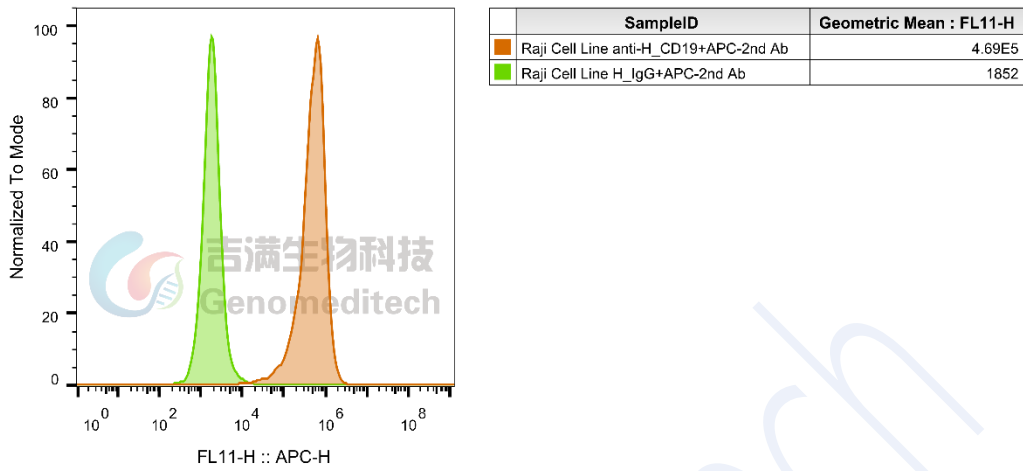


Fig 4.功能验证结果

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