

产品手册

H_OX40 Reporter Cell Line

H_OX40 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：V2.9.4

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.	Human OX40L 激活实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	Human OX40L 激活, Anti-OX40L 抑制实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	10
3.	共培养激活; Anti-OX40L 抑制实验.....	11
1)	加样步骤.....	11
2)	报告基因检测.....	12
3)	验证结果.....	13
附录 1:	流式验证结果.....	14
附录 2:	稳定性验证结果.....	14
使用许可协议:	15

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-C30855	H_OX40 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-C30855	H_OX40 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

OX40是一种细胞膜上的蛋白质，也被称为CD134。它是一种重要的共刺激分子，主要表达在活化的T细胞和NK细胞上。OX40的信号通路在调节免疫应答过程中起着重要作用。当OX40与其配体结合时，会激活多种信号通路，从而促进T细胞增殖、生存和功能。这种信号通路对于调节免疫细胞的活性和免疫应答的维持至关重要。OX40信号通路也被认为在免疫治疗和免疫调节中具有潜在的应用前景。

吉满生物H_OX40 Reporter Cell Line报告基因细胞系，是一种Luciferase报告基因细胞系。通过加入OX40L的拮抗型抗体，阻断由OX40L激活的OX40下游信号，阻断效果可以通过测定荧光信号确定荧光素酶（Luciferase）的表达来反映。因此可用于筛选靶向OX40L/OX40的拮抗型药物。

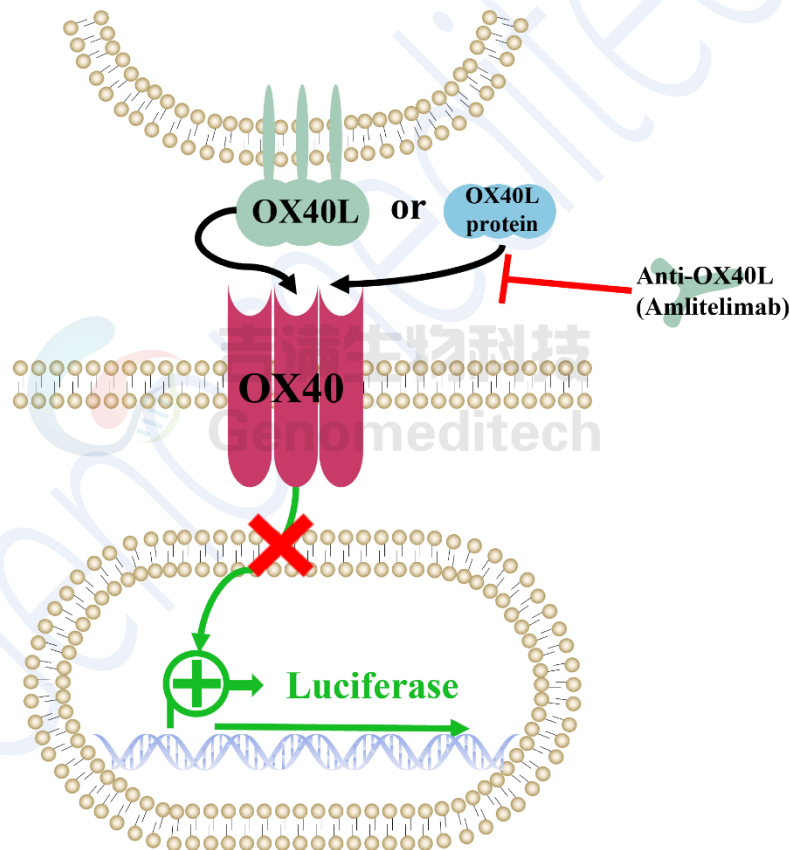


Fig 1.作用原理

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.
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/ GM-040401-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell BIOSCIENCES/C3010-0500
96 Well round Well culture plate	96-Well	NEST/701001
96 孔 U 底细胞培养板	96-well	角端/1014010
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated	96-well	Corning/3912
Microplate		
Human OX40L Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-83111RP
Anti-OX40L hIgG4 Antibody(Amlitelimab)	/	Genomeditech/GM-82533AB
Anti-H_OX40 hIgG2 Antibody (Ivuxolimab)		Genomeditech/GM-23373AB
H_OX40L CHO-K1 Cell Line	1 管 (5E6 Cell/mL)	Genomeditech/GM-C35016
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 × 10⁵ 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 × 10⁶ 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 × 10⁶ cells/mL, 1 传 3, 隔 2-3 天继续传代,不要让其密度超 2 × 10⁶ 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. Human OX40L 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_OX40 Reporter Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Human OX40L Protein; His Tag 作为阳性药物（分子量：16.9 KDa；以下简称：Human OX40L），Conc.01 终浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ ，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	Human OX40L	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	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

- 在实验前 1-2 h，将细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 2×10^6 cells/mL。以排枪加 $50 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上市盖，于孵箱中孵育待用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human OX40L	1 mg/mL	0.1 mg/mL	取 $2 \mu\text{L}$ 储液+ $18 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 $71.87 \mu\text{L}$ Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 $55 \mu\text{L}$ Assay Buffer。
- 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 $1.47 \mu\text{L}$ Human OX40L），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.33 μ L, 加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.47 μ L Human OX40L	加入	71.87 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.33 μ L, 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 孵育的孔板取出, 加入之前准备好的梯度稀释液, 每孔 50 μ L。
- j) 盖上班盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- k) 使用 GMOne-Step 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_OX40 Reporter Cell Line	0 μ g/mL	1 μ g/mL	15.26 pg/mL
	125374	1484140	141958

3) 验证结果

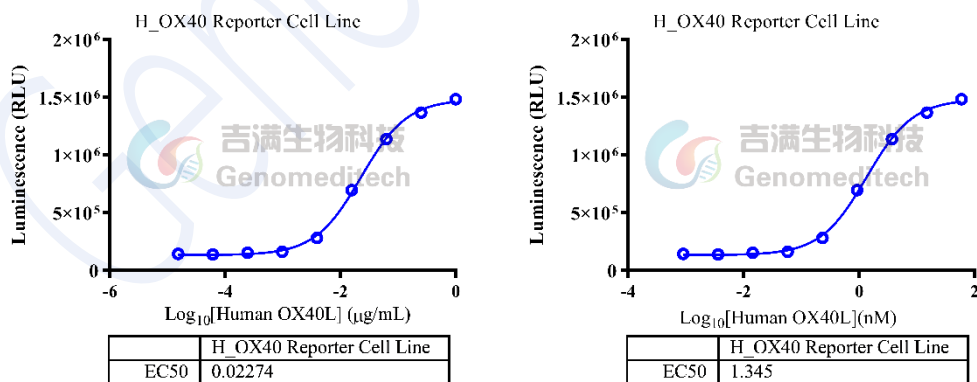


Fig 2.功能验证结果

2. Human OX40L 激活, Anti-OX40L 抑制实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 H_OX40 Reporter Cell Line 细胞量为 1×10^5 Cells/孔。本次实验使用 Anti-OX40L hIgG4 Antibody(Amlitelimab) (150 kDa; 以下简称 Amlitelimab) 作为阳性 Block 抗体; Amlitelimab Conc.01 终浓度为 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。周围孔加入 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	Amlitelimab	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													

1) 加样步骤

- 实验前 1-2 h, 离心收集 H_OX40 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, 调整细胞浓度到 3.04×10^6 cells/mL, 以排枪加 33 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育待用。
- 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-B11)。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Amlitelimab	3.995 mg/mL	/	直接使用储液
Human OX40L	1 mg/mL	0.01 mg/mL	取 2 μL 储液 + 198 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 46.56 μL Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 36.3 μL Assay Buffer。
- 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 1.84 μL Amlitelimab), 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	1.84 μL Amlitelimab	加入	46.56 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													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 12.1 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) 配置 3 \times 激活剂, 150 ng/mL Human OX40L (7.3 μL 0.01 mg/mL Human OX40L 母液加入到 478.3 μL Assay Buffer 中, 混匀后使用)。
- j) 将配置好的激活剂加入梯度稀释的抗体中, 每孔加入 36.3 μL 混匀, 盖上盖板放入培养箱孵育 1 h。
- k) 1 h 后取出步骤 j 孵育好的混合溶液孔板, 每孔取 66 μL 加入到步骤 a 的细胞孔板中。
- l) 盖上盖板, 继续孵育 6 h。
- m) 使用报告基因检测试剂盒, 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_OX40 Reporter Cell Line	Human OX40L+0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amlitelimab	Human OX40L + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amlitelimab	Human OX40L + 762.94 pg/ mL Amlitelimab
		297720	33246

3) 验证结果

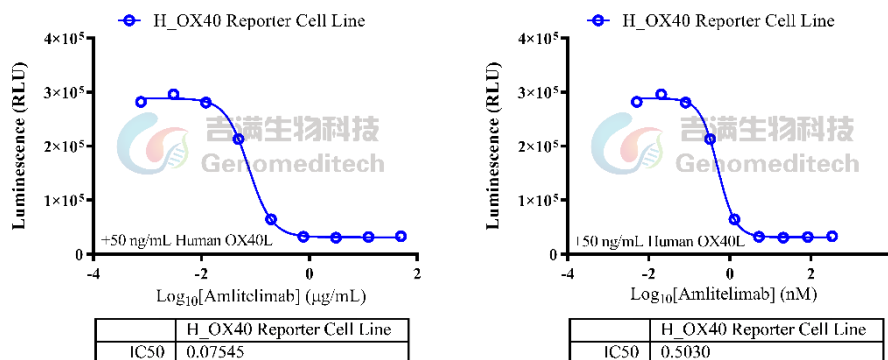


Fig 3.验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

3. 共培养激活; Anti-OX40L 抑制实验

本实验使用 1×10^5 cells/孔的 H_OX40 Reporter Cell Line 和 1×10^4 cells/Well 的 H_OX40L CHO-K1 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-OX40L hIgG4 Antibody(Amlitelimab)(以下简称为 Amlitelimab;150 kDa), 起始终浓度(Conc.01)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	Amlitelimab 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 ng/mL	137.17 ng/mL	45.72 ng/mL	15.24 ng/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_OX40L 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。
- 离心收集 H_OX40 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_OX40 Reporter Cell Line 到 2×10^6 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 B2-B10)。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Amlitelimab	3.995 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 78.37 μL Assay Buffer，B3-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 4.13 μL Amlitelimab），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	4.13 μL Amlitelimab	加入	78.37 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 27.5 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) 取出步骤 a 准备好的 H_OX40L CHO-K1 Cell Line 细胞孔板，吸弃上清 100 μL ；然后将步骤 i 准备好的药物各取出 50 μL ，依次加入到步骤 a 的 H_OX40L CHO-K1 Cell Line 细胞孔板中，孵育 1 h。
- k) 1 h 后将步骤 b 准备好的 H_OX40 Reporter Cell Line 细胞取出，吸取 50 μL 分别加入步骤 j 孵育好的混合液中，盖上盖板，继续孵育 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_OX40 Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	15.24 ng/mL
	4201405	47850	4497661

3) 验证结果

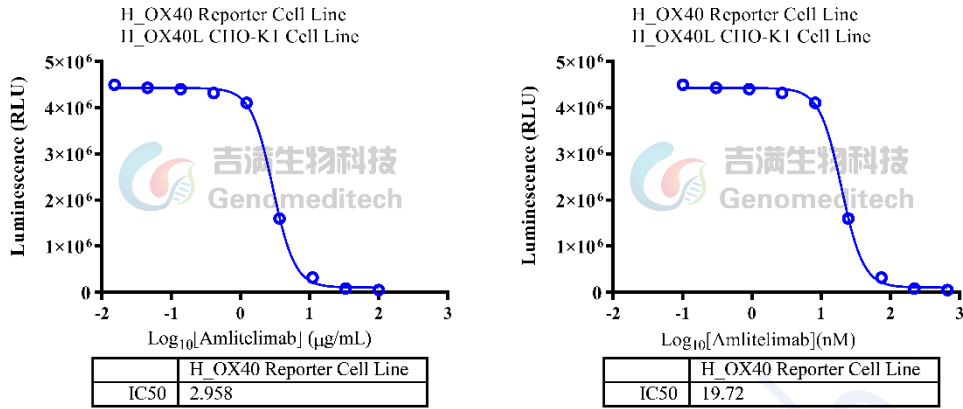


Fig 4. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1: 流式验证结果

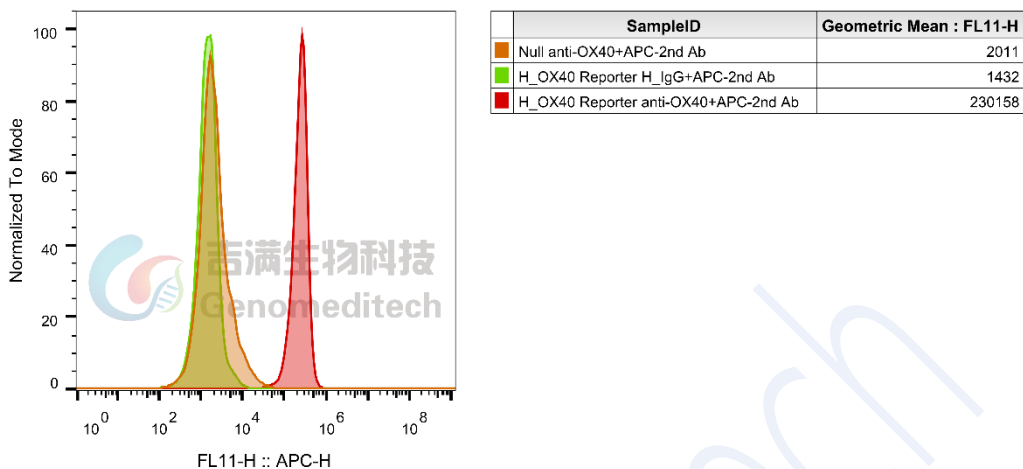


Fig 5. 流式验证结果

附录 2: 稳定性验证结果

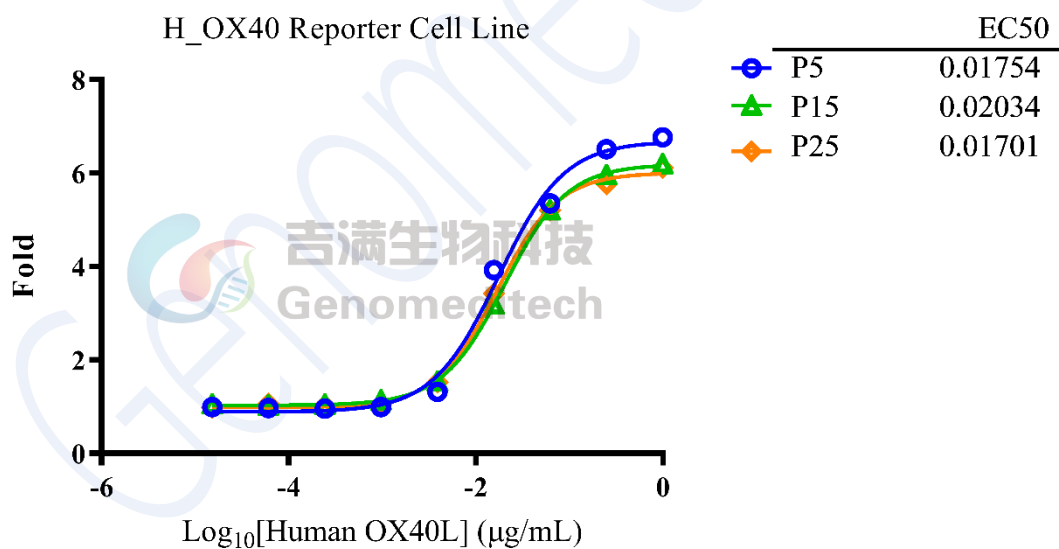


Fig 6. 稳定性验证结果

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