

PD1/OX40 Dual Effector Reporter Cell CBP74163 操作说明书



4008-750-250

目录

1. 背景信息	1
2. 产品介绍	1
3. 细胞基本信息	3
4. 主要仪器试剂耗材	4
5. 细胞培养	4
5.1 细胞复苏	4
5.2 细胞传代	5
5.3 细胞冻存	5
6. 细胞实验流程	5
6.1 PD1&OX40 Blockade Assay	5
7. 数据展示	7
8. 相关产品	7



1. 背景信息

Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1),一种在激活的 T 细胞上表达的受体, 与其配体 PD-L1 和 PD-L2 结合, 负向调节免疫反应。PD-1 配体存在于大多数癌症中, PD-1:PD-L1/2 相互作用会抑制 T 细胞活性, 并使癌细胞逃避免疫监视。PD1/PDL1 信号转导通路是肿瘤免疫抑制的重要组成部分, 可以抑制 T 淋巴细胞的兴奋, 增强肿瘤细胞的免疫耐受, 从而实现肿瘤免疫逃逸。综上所述, PD1 与 PDL1 结合可以减弱 T 细胞介导的免疫监视, 导致免疫反应缺失, 甚至导致 T 细胞凋亡。PD1/PDL1 抑制剂可解除抗肿瘤 T 细胞的免疫抑制, 从而导致 T 细胞增殖并渗透到肿瘤微环境中并诱导抗肿瘤反应。PD-1:PD-L1/2 通路还参与调节自身免疫反应, 使这些蛋白质成为多种癌症以及多发性硬化症、关节炎、狼疮和 I 型糖尿病的有希望的治疗靶点。

OX40 (又称为 CD134) 是一种在激活的人类 T 细胞上瞬时表达的共刺激分子, 在 T 细胞激活、扩增、分化、生成和维持记忆性 T 细胞中发挥作用。它属于 TNF 受体 (TNFR) 超家族, 该分子及其配体复合体 (OX40L) 的晶体结构是由一个三聚体 OX40L 分子和三个 OX40 单体组成的三聚体构型, 同属 TNFR 超家族 (TNFRSF) 的成员都需要形成类似这样的高阶多聚结构才能实现足够的下游信号激活。在临床上, 由于缺乏足够强度的激活, 激动剂抗体单一疗法通常表现出相对微弱的疗效, 因此 OX40 激动剂抗体作为单一疗法显示出的疗效非常有限, 但在一些临床前模型中, 与单独的检查点阻断抗体相比, 抗 OX40+抗 PD-1/L1 以及抗 CTLA-4 的抗体联合治疗显示出了更好的抗肿瘤效果。因此, OX40 激动剂抗体与针对抑制性受体如抗 PD-1/L1 的免疫疗法结合使用是一种很有前途的治疗策略。

2. 产品介绍

科佰生物推出 PD1/OX40 Dual Effector Reporter Cell 报告基因细胞, 在由调控因子调控并表达报告基因的重组细胞上, 稳定表达人 PD1(Programmed Cell Death 1, PDCD1, SLEB2, CD279, GenBank Accession #NM_005018)和 OX40(Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 4, TNFRSF4, and CD134, GenBank Accession No. NM_003327)。见图 1 流式验证 PD1 表达。见图 2 流式验证 OX40 表达。

	Population Name	Mean , FL1-A
	PD-1 / OX40 Dual Effector Reporter Cell+anti-PD-1 FITC	2.43E4
	Control Cell+anti-PD-1 FITC	689

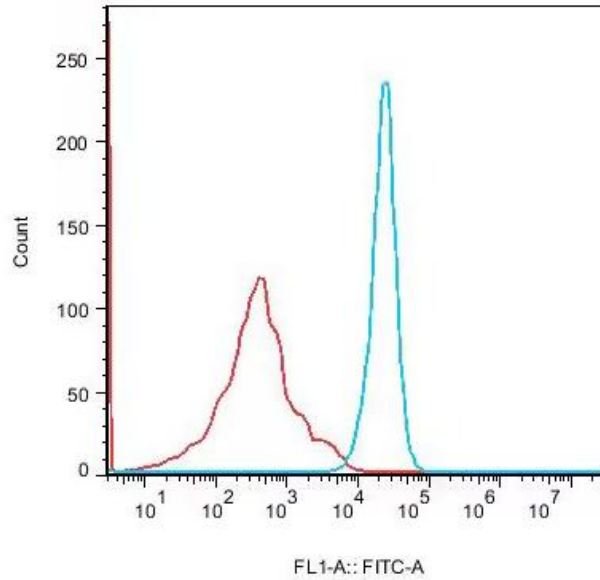




图 1: PD1/OX40 Dual Effector Reporter Cell 细胞稳定表达人 PD1

	Population Name	Mean , FL4-A
	PD-1 / OX40 Dual Effector Reporter Cell+anti-OX40 APC	2.90E5
	Control Cell+anti-OX40 APC	1725

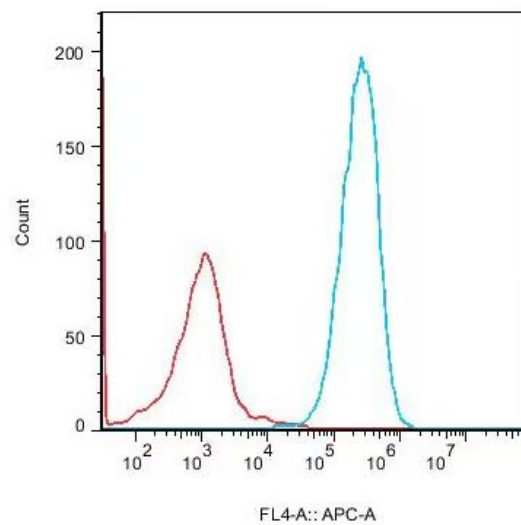


图 2: PD1/OX40 Dual Effector Reporter Cell 细胞稳定表达人 OX40

报告基因细胞模型可以很好的反映分子作用机制，同时具备更小的变异性和更好的可操作性，已被中检院及药企广泛应用于抗体药物生物活性的检定，对于药物研发、质量控制、批次放行都有重要意义。

PD1&OX40 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 PD1&OX40 的信号转导过程，原理见图 1 所示。

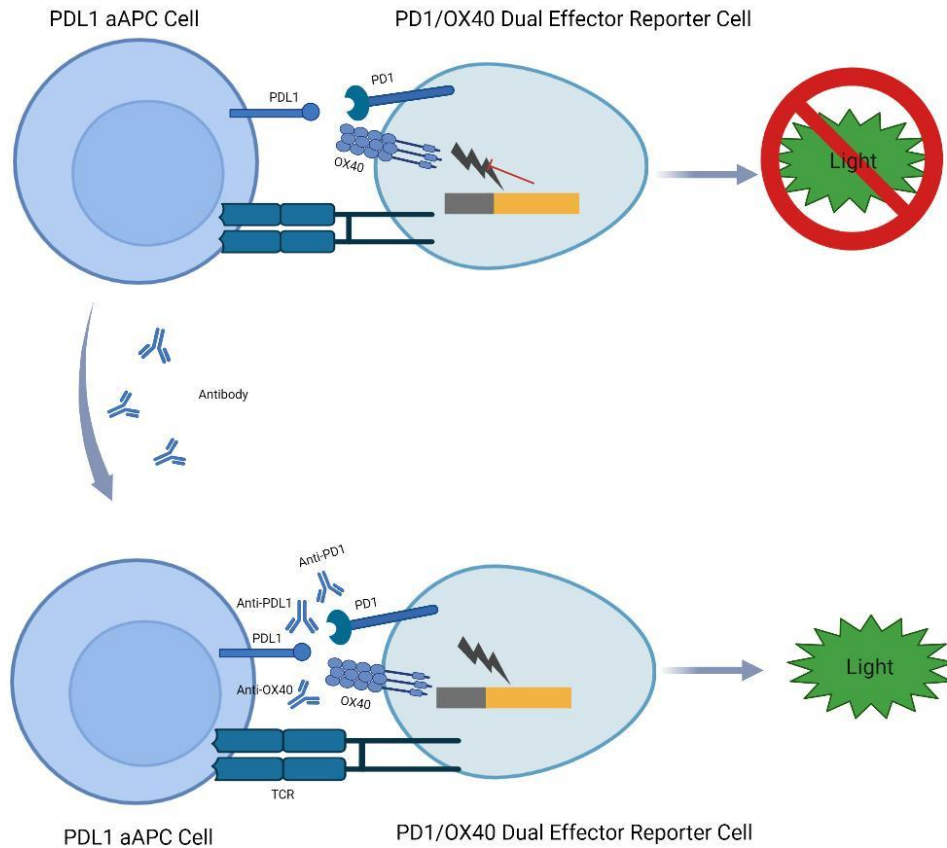


图 3: PD1&OX40 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: PD1, OX40

别名: Programmed cell death 1, PDCD1, PD-1, PD1, SLEB2, CD279, TNFRS9, Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 4, TNFRSF4, and CD134

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+1ug/ml puromycin+800ug/ml hygromycin+5ug/ml blasticidin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 悬浮

支原体检测: 阴性

稳定性: 32 代 (室内测试结果, 不表示超过 32 代以上不稳定)

保存条件: 液氮保存

应用: 细胞水平 PD1&OX40 信号传导的激活剂或抑制剂的活性检测, 可用于高通量筛选或 QC 放行

4. 主要仪器试剂耗材

名称	品牌	货号
PD1/OX40 Dual Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74163M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
PDL1 aAPC Cells 细胞	Cobioer	CBP74164
Anti-PD1 mAb	Cobioer	CBP74018A
Anti-OX40 mAb	Cobioer	CBP74017A
Ultra Luciferase Detection Kit	Cobioer	CBPH0001
96 Well Assay Plate (White Plate, Clear Bottom with Lid Tissue Culture Treated Polystyrene 1/Pack)	Costar	3610
Synergy H1 多功能酶标仪	Biotek	/

5. 细胞培养

5.1 细胞复苏

- 1) 在 37°C 水浴中快速融化细胞约 60 秒。一旦细胞解冻 (可能比 60 秒稍快或稍慢), 快速将冻存管中的细胞吸入装有 10 ml 预热 PD1/OX40 Dual Effector Reporter Cell 完全培养基的 15 ml 离心管中。
- 2) 1000 转、5 分钟离心细胞, 除去培养基并将细胞重悬于 5 ml 预热的完全培养基中。
- 3) 调整细胞密度到 $3-6 \times 10^5$ cells/ml, 加入 T25 培养瓶中, 放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中。

5.2 细胞传代

每 1-2 天取细胞悬液计数，当密度大于 1×10^6 cells/ml 时,请及时传代或补加新鲜完全培养基. 保持细胞密度在 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cells/ml 之间。

5.3 细胞冻存

取 $4-8 \times 10^6$ 细胞离心后弃上清。加 1ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入细胞冻存管。立即放入细胞冻存盒（Nalgene 5100-0001），加异丙醇到刻度线，放 -80°C 冰箱。24 小时后将冻存管转到液氮中长期保存。

6. 细胞实验流程

6.1 PD1&OX40 Blockade Assay

PD1&OX40 Blockade Assay 由报告细胞 PD1/OX40 Dual Effector Reporter Cell，Cat. #CBP74163 细胞和靶细胞 PDL1 aAPC Cell，Cat. #CBP74164 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-PD1 mAb，Cat.#CBP74018A 和 Anti-OX40 mAb，Cat.#CBP74017A 和 Anti-PDL1/OX40 Bispecific 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证(我们分别验证了单独 Anti-PD1 mAb 作用、单独 Anti-OX40 mAb 作用、Anti-PD1 mAb&Anti-OX40 mAb 共作用、Anti-PDL1/OX40 Bispecific 作用的结果)。

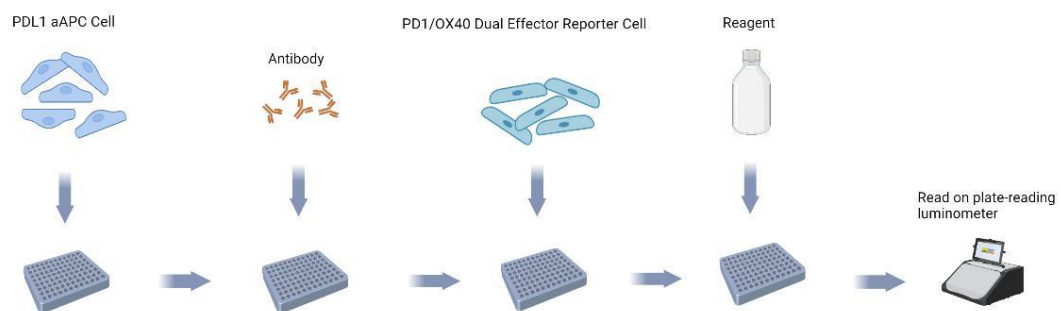


图 4: PD1&OX40 Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 PDL1 aAPC Cells 细胞离心弃上清，重悬于新鲜的含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基中，将重悬的细胞密度调整为 5×10^5 cells/ml，然后将细胞加入 96 孔细胞培养板

中，每孔 40 ul。

- 2) 然后用 RPMI1640 培养基对测试样本进行梯度稀释，加入梯度稀释的 5*浓度样品（20 ul/孔）到接种好细胞的 96 孔板中，并另外设置空白培养基对照孔，继续在 37°C 细胞培养箱中培养 60 分钟。（注意：样品浓度及梯度设置跟样品本身的特性及客户的实验需求高度相关，客户应根据自身的实际情况优化设置，我们不做具体推荐，本梯度稀释方案仅适用我们本次验证实验涉及样本）
- 3) 取对数期生长的 PD1/OX40 Dual Effector Reporter Cell 细胞离心弃上清，重悬于新鲜的 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中将重悬的细胞密度调整为 2×10^6 cells/ml，然后将细胞加入步骤 3 的 96 孔板中，每孔 40 ul，放置 37°C 培养箱中继续培养 5.5 到 6 小时。
- 4) 将 96 孔板从培养箱中取出，加入 100 ul/孔 Ultra Luciferase Detection Kit, Cat.#CBPH0001 放置 3 到 5 分钟，放入酶标仪中读取数值。
- 5) 根据每个梯度浓度孔对应的读值，利用 Prism Graphpad 软件拟合样品对细胞激活的梯度曲线，并且计算样品的 EC50。

孔板排布：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer
B	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
C	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
D	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
E	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
F	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
G	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
H	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer

图 5： 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

Dose Response of Blocking Antibodies in PD-1/OX40 Dual Effector Reporter Cells (C22) With PD-L1 aAPC Cells

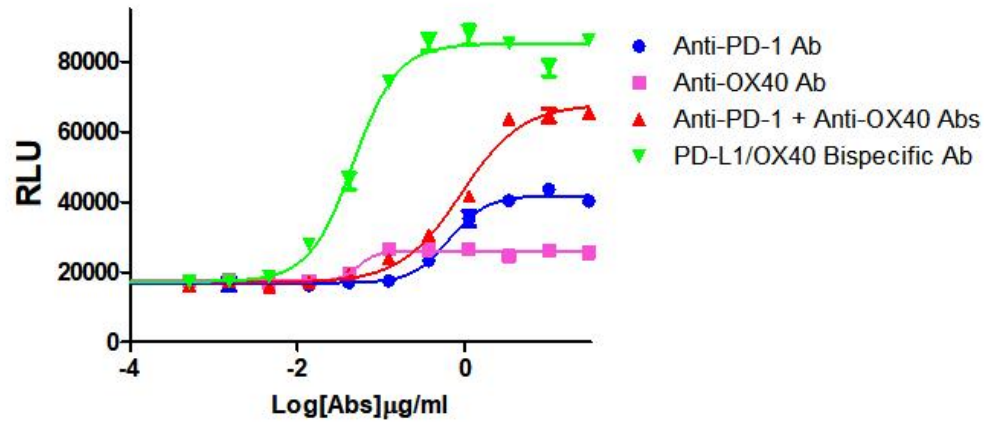


图 6: PD1&OX40 Blockade Assay 验证结果

8. 相关产品

名称	货号
PDL1 aAPC Cell	CBP74164
PDL1/CD80&CD86 aAPC Cells	CBP74151
PD1-IL2 Pathway Effector Reporter Cell	CBP74144
PDL1/aAPC/Raji	CBP74145
PDL1/TCR Activator/CHO	CBP74066
PDL2/TCR Activator/CHO	CBP74065
PDL1/HEK293	CBP74001
PDL1/CHO	CBP74032
PDL1/Raji	CBP74095
PDL2/CHO	CBP74064
PD1/HEK293	CBP74042
PD1/CHO	CBP74043
PD1/LAG3 Dual Effector Reporter Cell	CBP74147
PD1/TIGIT Dual Effector Reporter Cell	CBP74126
PDL1/CD155/TCR Activator/CHO	CBP74127

PD1/NFAT-Luc/Jurkat	CBP74018
PDL1/MHCII APC Cell	CBP74146
PD1/41BB Dual Effector Reporter Cell	CBP74172
PD1/CTLA4 Dual Effector Reporter Cell	CBP74150
SIRP α /PD-1 Dual Effector Reporter Cell	CBP74154
CD47/PD-L1 Dual Target Cell	CBP74155
CD80/PDL1/TCR Activator/CHO	CBP74129