

## 产品手册

### H\_OX40 Reporter DDX35<sup>TM</sup> Cell Line

### H\_OX40 Reporter DDX35<sup>TM</sup> 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.2

## 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、	传代稳定性验证结果.....	5
五、	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
六、	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
七、	使用方法（示例）.....	8
1.	蛋白激活实验.....	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	9
2.	蛋白激活；Amlitelimab 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：	流式验证结果.....	13
相关产品	.....	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-C36735	H_OX40 Reporter DDX35 <sup>TM</sup> Cell Line	5E6 Cells/mL

### 组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C36735	H_OX40 Reporter DDX35 <sup>TM</sup> 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 DDX35™ Cell Line 报告基因细胞系，是基于 OX40 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 OX40L 蛋白与受体结合后，激活下游信号通路，从而激活荧光素酶（Luciferase）的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 OX40 相关药物的体外效果评价。细胞通过多轮单克隆筛选，是具有高稳定特性同时兼具高灵敏性、高倍率性的优选单克隆。可以满足客户批量建库、放行实验等标准。

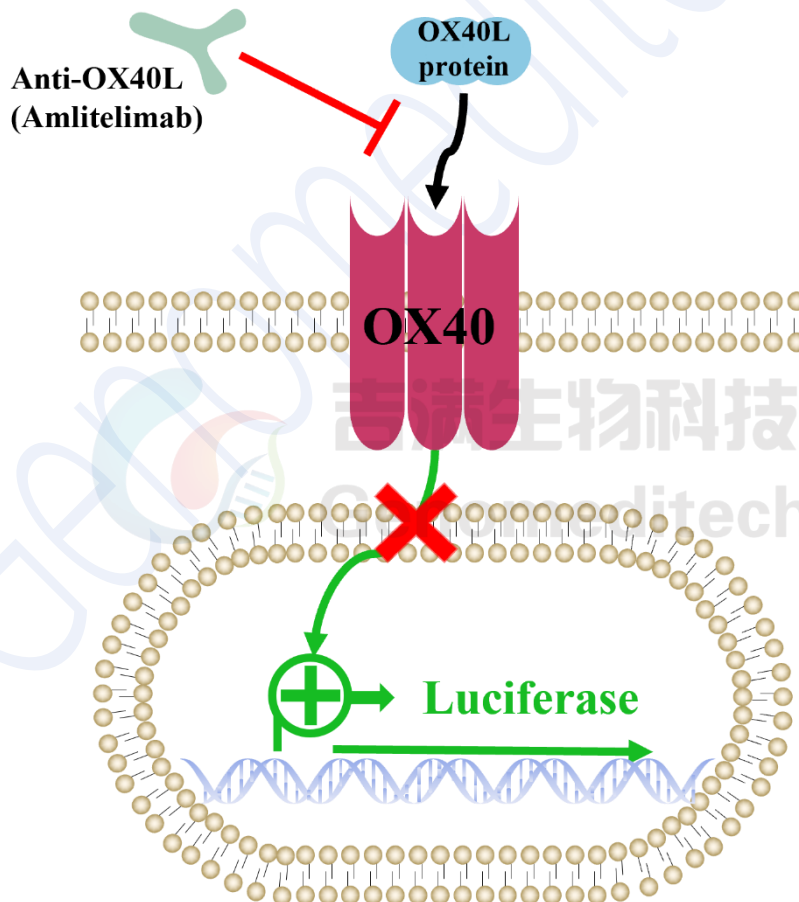


Fig 1.信号通路图

#### 四、 传代稳定性验证结果

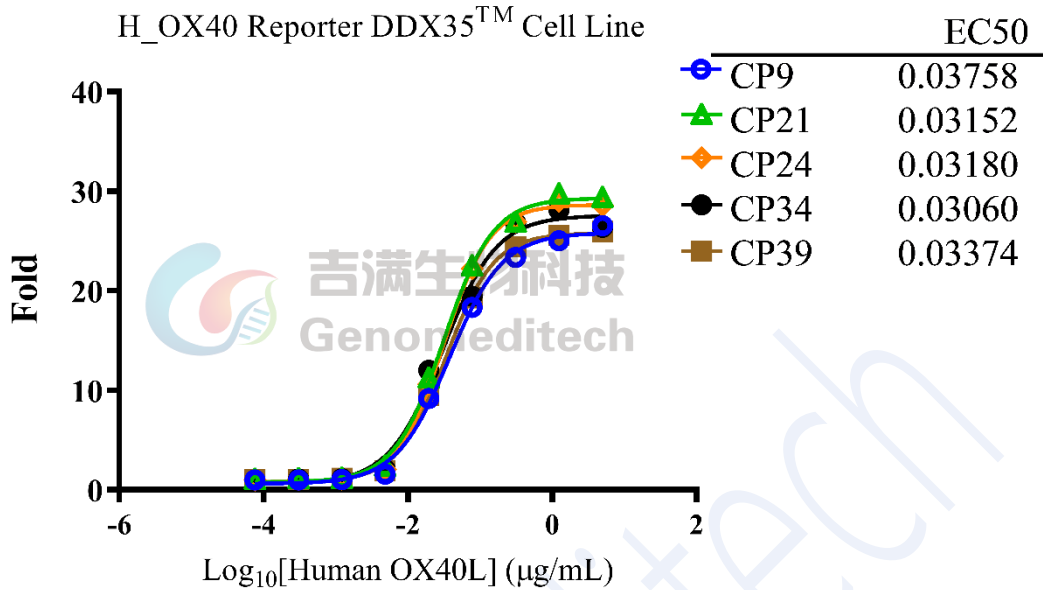


Fig 2. 制备 Human OX40L Protein (Genomeditech/GM-83111RP) 梯度稀释液; 提前 1-2 h 配置 H\_OX40 Reporter DDX35<sup>TM</sup> Cell Line (Genomeditech/GM-C36735), 每孔细胞量  $5 \times 10^4$  个。取出提前准备的细胞孔板, 然后加入稀释好的 Human OX40L Protein 溶液, 孵育 6 h 后检测 Luciferase 数值, 使用 GraphPad 系统进行数据分析, 纵坐标转换为倍率。结果显示, 不同代次间倍率、EC50 数值稳定。

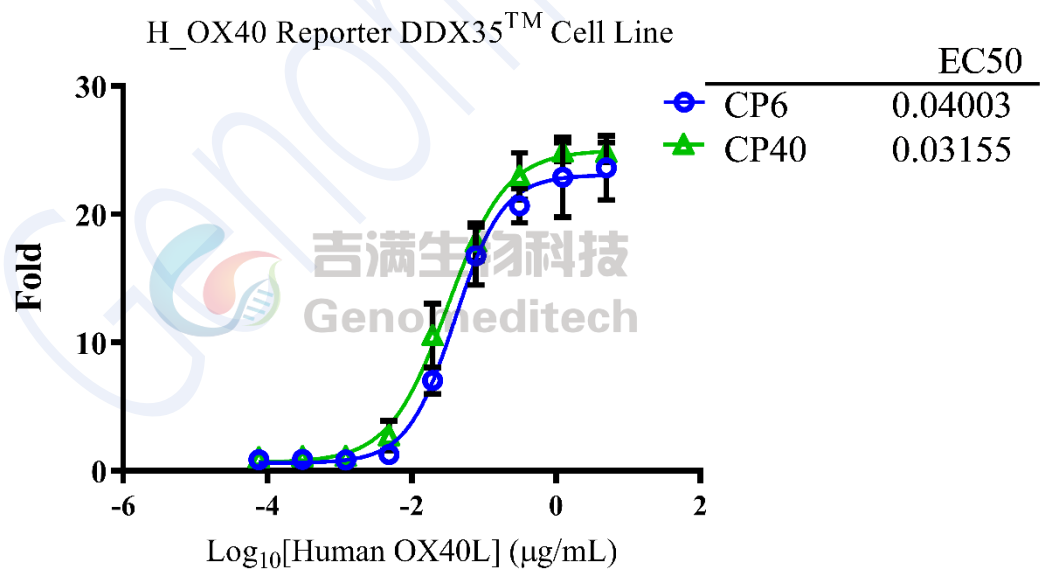


Fig 3. 制备 Human OX40L Protein (Genomeditech/GM-83111RP) 梯度稀释液; 提前 1-2 h 配置 H\_OX40 Reporter DDX35<sup>TM</sup> Cell Line (Genomeditech/GM-C36735), 每孔细胞量  $5 \times 10^4$  个。取出提前准备的细胞孔板, 然后加入稀释好的 Human OX40L Protein 溶液, 3 复孔, 孵育 6 h 后检测 Luciferase 数值, 使用 GraphPad 系统进行数据分析, 纵坐标转换为倍率。结果显示, CP6 代与 CP40 代倍率、EC50 数值稳定。

## 五、 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+10% 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	ExCell/FSP500
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
96 孔 U 底细胞培养板	96-well	角端/1014010
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Human OX40L Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-83111RP
Anti-H_OX40 hIgG2 Antibody(Ivuxolimab)	/	Genomeditech/GM-23373AB
Anti-OX40L hIgG4 Antibody(Amlitelimab)	/	Genomeditech/GM-82533AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C

#### 重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

## 六、 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  $5 \times 10^6$  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。
- 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。

## 七、使用方法（示例）

### 1. 蛋白激活实验

操作步骤可根据示例调整优化，对于本次实验，推荐 H\_OX40 Reporter DDX35™ Cell Line 细胞量为  $5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 Human OX40L Protein; His Tag (16.9 KDa; 以下简称 Human OX40L) 作为阳性药物, Conc.01 浓度为  $5 \mu\text{g/mL}$ , 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	Human GIP	PBS	$5 \mu\text{g/mL}$	$1.25 \mu\text{g/mL}$	$312.5 \text{ ng/mL}$	$78.13 \text{ ng/mL}$	$19.53 \text{ ng/mL}$	$4.88 \text{ ng/mL}$	$1.22 \text{ ng/mL}$	$305.18 \text{ pg/mL}$	$76.29 \text{ pg/mL}$	0	PBS
C		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, 轻柔吹打混匀后, 直接吸取合适体积检测细胞活力并计数。使用 Assay Buffer 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  cells/mL (注意此过程不要离心处理, 避免因离心造成细胞机械性损失而导致功能活性不稳定)。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	$2.2 \text{ mg/mL}$	$0.22 \text{ mg/mL}$	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  $70 \mu\text{L}$  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  $3.33 \mu\text{L}$  Human OX40L), 混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.33 $\mu\text{L}$ , 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	3.33 $\mu\text{L}$ Human OX40L	加入	70 $\mu\text{L}$	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													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.33  $\mu\text{L}$ , 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  $\mu\text{L}$ 。
- j) 盖上班盖, 于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养 6 h。
- k) 使用试剂盒检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_ OX40 Reporter DDX35 <sup>TM</sup> Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	76.29 $\mu\text{g/mL}$
	5814	126228	5118

## 3) 验证结果

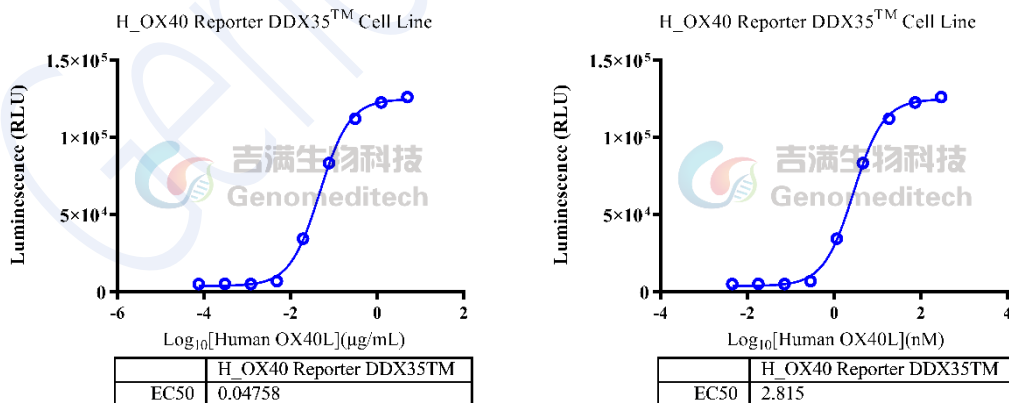


Fig 4. 功能验证结果

## 2. 蛋白激活; Amlitelimab 抑制实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 H\_OX40 Reporter DDX35™ Cell Line 细胞量为  $5 \times 10^4$  Cells/孔。使用 Anti-OX40L hIgG4 Antibody(Amlitelimab)(以下简称为 Amlitelimab; 约 150 kDa)作为阳性药物, Conc.01 终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$ , 5 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排在 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		
B	Amlitelimab	PBS	50.00 $\mu\text{g/mL}$	10.00 $\mu\text{g/mL}$	2.00 $\mu\text{g/mL}$	400.00 $\text{ng/mL}$	80.00 $\text{ng/mL}$	16.00 $\text{ng/mL}$	3.20 $\text{ng/mL}$	640.00 $\text{pg/mL}$	128.00 $\text{pg/mL}$	0	PBS
C		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, 轻柔吹打混匀后, 直接吸取合适体积检测细胞活力并计数。使用 Assay Buffer 调整细胞浓度为  $1.51 \times 10^5$  cells/mL (注意此过程不要离心处理, 避免因离心造成细胞机械性损失而导致功能活性不稳定)。以排枪加 33  $\mu\text{L}$  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	1.981 mg/mL	/	直接使用储液
Human OX40L	2.2 mg/mL	0.022 mg/mL	取 2 $\mu\text{L}$ 储液+198 $\mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 49.5  $\mu\text{L}$  Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 39.6  $\mu\text{L}$  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 中加入 4.1  $\mu\text{L}$  Amlitelimab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 9.9 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	4.1 $\mu\text{L}$ Amlitelimab	加入	49.5 $\mu\text{L}$	39.6 $\mu\text{L}$	39.6 $\mu\text{L}$	39.6 $\mu\text{L}$	39.6 $\mu\text{L}$	39.6 $\mu\text{L}$	39.6 $\mu\text{L}$	39.6 $\mu\text{L}$	39.6 $\mu\text{L}$	39.6 $\mu\text{L}$	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 9.9  $\mu\text{L}$ ，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) 配置 3  $\times$  激活剂，150 ng/mL Human OX40L（5.49  $\mu\text{L}$  0.022 mg/mL Human OX40L 母液加入到 792  $\mu\text{L}$  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 39.6  $\mu\text{L}$  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，每孔取 66  $\mu\text{L}$  分别加入到步骤 a 的细胞孔板中，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 DDX35 <sup>TM</sup> Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$ Amlitelimab + 50 ng/mL Human OX40L	50 $\mu\text{g/mL}$ Amlitelimab + 50 ng/mL Human OX40L	128 pg/mL Amlitelimab + 50 ng/mL Human OX40L
	59374	5083	57988

### 3) 验证结果

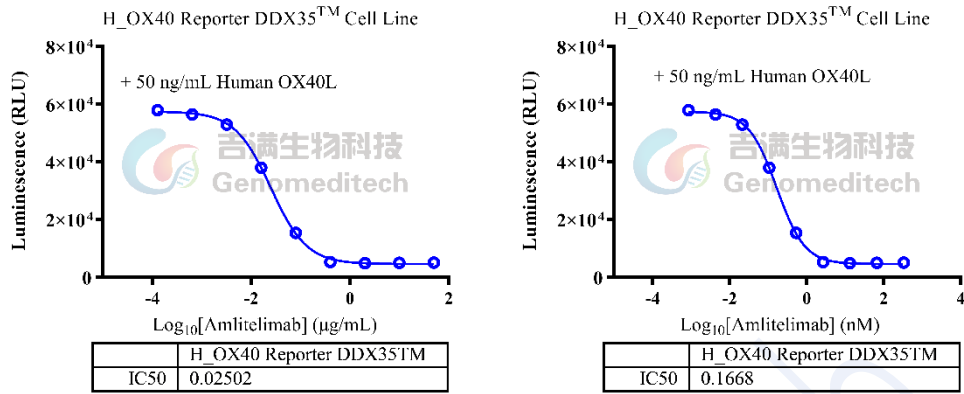


Fig 5. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 附录：流式验证结果

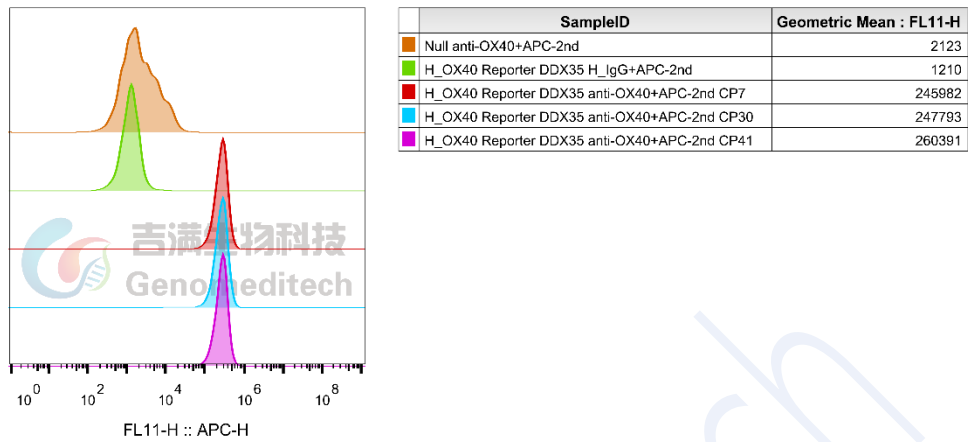


Fig 3. 使用 Anti-H\_OX40 hIgG2 Antibody(Ivuxolimab) (Genomeditech/GM-23373AB) 抗体流式验证结果

## 相关产品

OX40	
H_OX40 Reporter Cell Line	Cynomolgus_OX40L CHO-K1 Cell Line
H_OX40 CHO-K1 Cell Line	H_OX40L CHO-K1 Cell Line
H_OX40L HEK-293 Cell Line	
Anti-H_OX40 hIgG2 Antibody(Ivuxolimab)	Anti-OX40L hIgG1 Reference Antibody(Oxebio)
Anti-OX40L hIgG4 Antibody(Amltelimab)	Anti-OX40L hIgG4 Reference Antibody(Amlbio)
Biotinylated Human OX40L Protein; His-Avi Tag	Cynomolgus OX40 Protein; His Tag
Cynomolgus OX40L Protein; His Tag	Cynomolgus OX40L Protein; mFc Tag
Human OX40 Protein; His Tag	Human OX40L Protein; His Tag
Human OX40L Protein; mFc Tag	
IL-4/IL-13	
IL-4 Reporter Cell Line	IL-4/IL-13 Reporter 293 Cell Line
IL-4/IL-13 Reporter 293 DDX35TM Cell Line	Cynomolgus_IL4R CHO-K1 Cell Line
H_IL4R CHO-K1 Cell Line	
Anti-IL-4R hIgG1 Antibody(12B5)	Anti-IL4R hIgG4 Antibody(Dupilumab)
Anti-IL4R hIgG4 Reference Antibody (Dupbio)	
Human IL-4R alpha Protein; mFc Tag	
IL-31	
Cynomolgus_IL-31RA OSMR Reporter Baf3 Cell Line	H_IL-31 Reporter Cell Line
Cynomolgus_IL31RA CHO-K1 Cell Line	H_IL31RA CHO-K1 Cell Line
H_IL31RA HEK-293 Cell Line	H_IL-31RA OSMR Baf3 Cell Line
Anti-IL31 hIgG1 Antibody(mAb33)	Anti-IL31RA hIgG1 Antibody(NA633)
Anti-IL31RA hIgG2 Antibody(Nemolizumab)	Anti-OSMR hIgG4 Antibody(Vixarelimab)

## 使用许可协议:

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策:

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。

Genomeditech