

产品手册



ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line

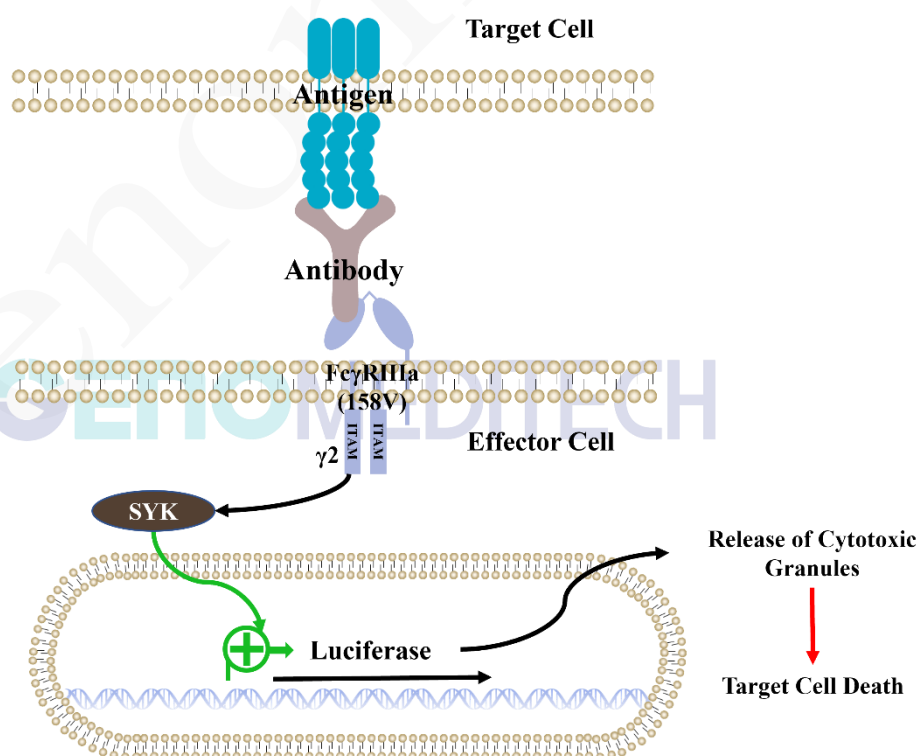
货号: GM-C05619

版本号: 4.0.26.1012

ADCC 即抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)，是指表达 Fc 受体的免疫细胞通过识别抗体的 Fc 段直接杀伤与抗体特异性结合的靶细胞的作用。现如今，ADCC 作用机制被用来检测、评定抗体或靶细胞的功效。抗体与细胞表面上的目标抗原结合。如果抗体的 Fc 段同时结合到效应细胞（主要为自然杀伤细胞，natural killer cells）表面的 FcγRIIIa 受体上，两种类型的细胞即发生多重交联，导致 ADCC 作用机制通路的激活。靶细胞的杀伤是此活化途径的终点，这一指标被用在经典的 ADCC 生物活性检测中，这些经典的检测方法利用供者的外周血单核细胞 (PBMC) 或自然杀伤 (NK) 细胞亚群作为效应细胞。这些细胞的应答变异性很大，难于制备，并容易引起很高的背景读数。

ADCC Reporter 细胞系选择了 ADCC 作用机制通路激活过程中较早的事件作为检测的读出指标：即效应细胞中由转录因子介导的基因转录的激活。此外，ADCC 报告基因检测试剂盒使用工程改造的 Jurkat 细胞作为效应细胞，该细胞稳定表达了 FcγRIIIa 受体(高亲和 158V)和由转录因子驱动表达的萤火虫萤光素酶。抗体在 ADCC 作用机制中的生物活性通过转录因子活化产生的萤光素酶定量，而效应细胞中的萤光素酶活性通过生物发光读数定量。检测的信号值高，且背景很低。

吉满生物依靠多年研究经验，利用巧妙的载体设计和第三代慢病毒报告基因系统，推出 ADCC 相关细胞系和 ADCC 活性检测服务，并可接受 ADCC 细胞系定制服务。



规格参数

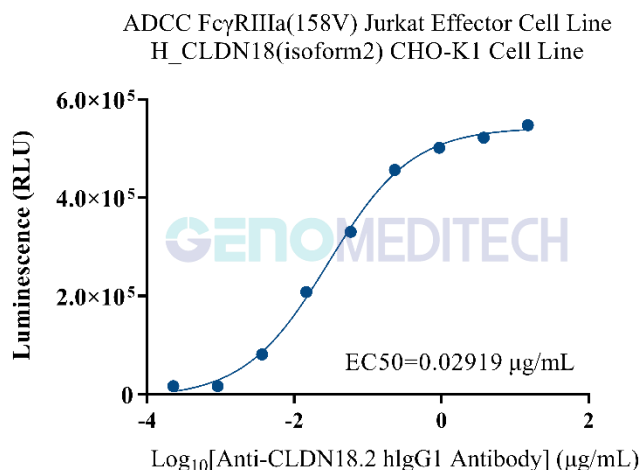
数量	5E6 Cells per vial, 1 mL
产品形式	1 支冻存细胞
储运条件	干冰运输, -196°C 以下长期储存
复苏培养基	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S
生长培养基	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+3.5 µg/mL Blasticidin+0.75 µg/mL Puromycin
培养备注	无
细胞冻存液	90% FBS+10% DMSO
生长特性	悬浮
培养条件	37°C, 5% CO ₂
支原体检测	该细胞系已通过支原体检测, 结果为阴性。
生物安全等级	Biosafety Level 2
备注	建议尽早扩增该细胞, 并冻存至少 10 支, 以便后续使用。

实验材料与仪器

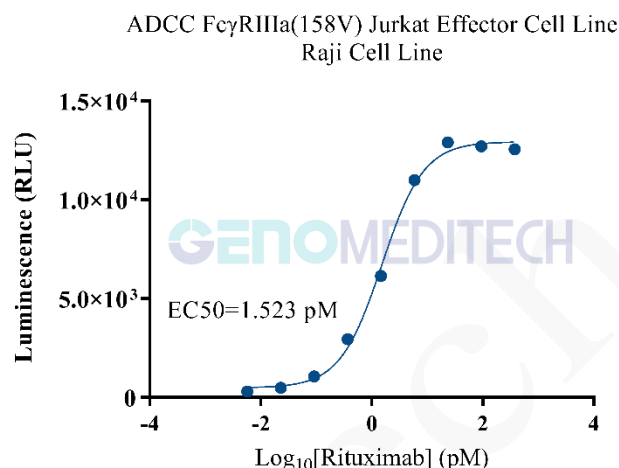
名称	Manufacturer/Catalogue No.
RPMI 1640	gibco/C11875500BT
Fetal Bovine Serum	ExCell/FSP500
Pen/Strep	Thermo/15140-122
Blasticidin	Genomeditech/ GM-040404
Puromycin	Genomeditech/ GM-040401
H_CLDN18.2(isoform2) CHO-K1 Cell Line	Genomeditech/ GM-C05273
Raji Cell Line	Genomeditech/GM-C19100
Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody(Zolbetuximab)	Genomeditech/ GM-34137AB
Anti-H_MS4A1(CD20) hIgG1 Antibody(Ocrelizumab)	Genomeditech/ GM-27200AB
PE anti-human CD16 Antibody	BioLegend/302007
96 well round cell culture plate	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	Saining/1014010
Countess 3 Automated Cell Counter	ThermoFisher/A49891
SpectraMax® L Microplate Luminometer	Moleculardevices/SpectraMax L
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	Genomeditech/ GM-040513

验证结果

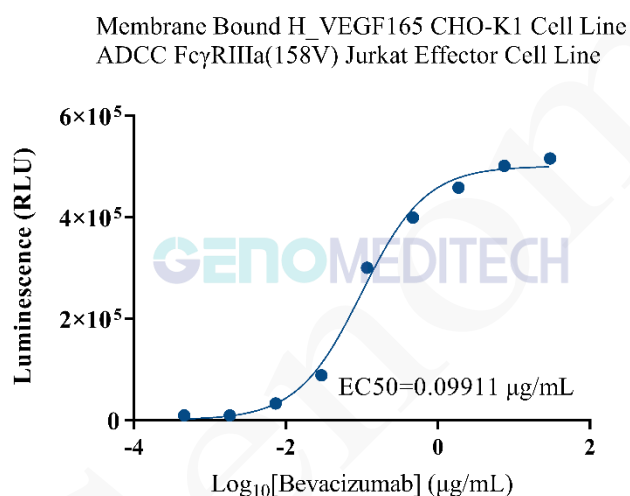
应用



Anti-CLDN18.2 抗体 (Zolbetuximab) 激活验证。将 H_CLDN18.2 CHO-K1 细胞系 (GM-C05273) 按 1.5E4 细胞/孔接种于 96 孔板并过夜孵育, 次日加入梯度稀释的 Anti-CLDN18.2 hIgG1 抗体 (Zolbetuximab) (GM-34137AB) 与按 1.5E5 细胞/孔接种的 ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector 细胞系 (GM-C05619), 继续孵育 6 小时后, 采用 Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) 检测萤火虫荧光素酶活性, 最大诱导倍数约为 [49.8], 数据以药物质量浓度表示。[protocol]

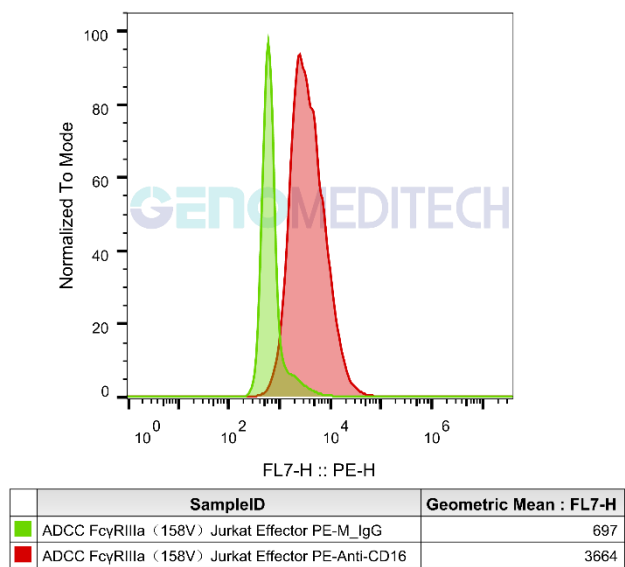


Anti-CD20 抗体 (Rituximab) 激活验证。将 Raji 细胞系 (GM-C19100) 按 2.5E4 细胞/孔接种于 96 孔板, 加入梯度稀释的 Anti-CD20 抗体 (Rituximab) 与按 1.5E5 细胞/孔接种的 ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector 细胞系 (GM-C05619), 继续孵育 6 小时后, 采用 Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) 检测萤火虫荧光素酶活性, 最大诱导倍数约为 [45.9], 数据以药物质量浓度表示 [protocol]

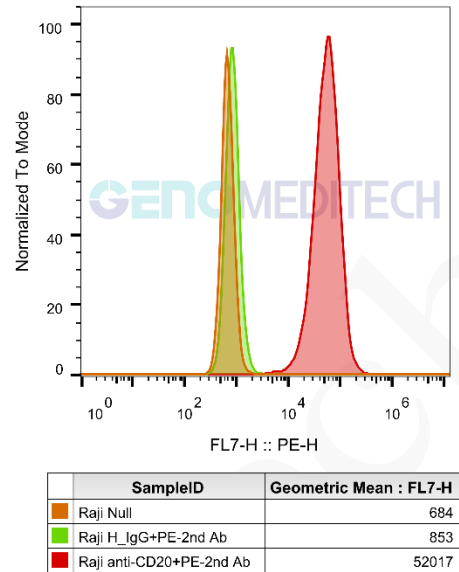


Anti-VEGF hIgG1 Reference 抗体 (Bevbio) 激活验证。将 Membrane Bound H_VEGF165 CHO-K1 细胞系 (GM-C40448) 按 1.5E4 细胞/孔接种于 96 孔板并过夜孵育, 次日加入梯度稀释的 Anti-VEGF hIgG1 Reference 抗体 (Bevbio) (GM-87758MAB) 与按 1E5 细胞/孔接种的 ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector 细胞系 (GM-C05619), 继续孵育 6 小时后, 采用 Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) 检测萤火虫荧光素酶活性, 数据以药物质量浓度表示。

表达

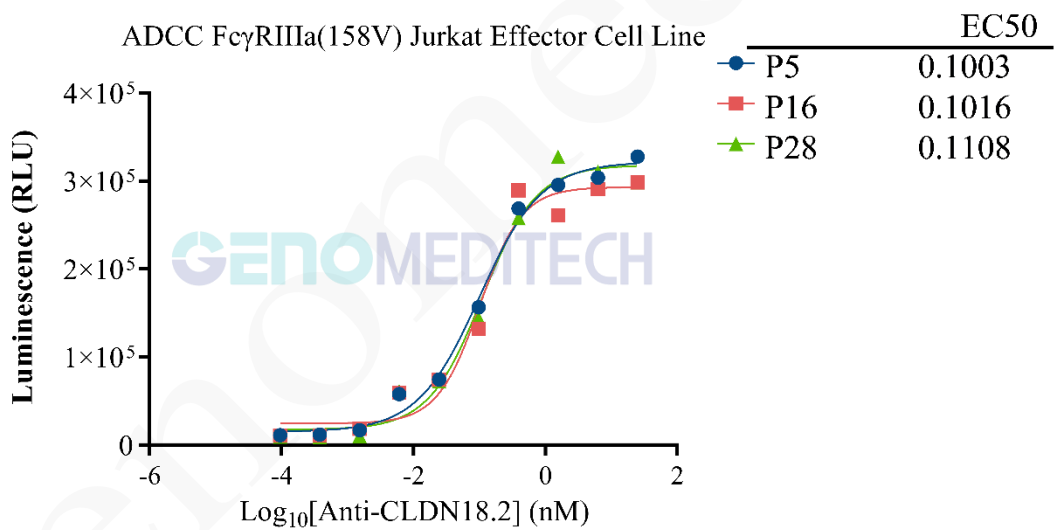


CD16 流式表达验证。采用流式细胞术，用 PE anti-human CD16 抗体 (BioLegend/302007) 检测 ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector 细胞系 (GM-C05619) 的 CD16 表达。



CD20 流式表达验证。采用流式细胞术，用 Anti_H_MS4A1(CD20) hIgG1 抗体 (Ocrelizumab) 检测 Raji 细胞系 (GM-C19100) 的 CD20 表达。

稳定性



传代稳定性: Anti-CLDN18.2 抗体 (Zolbetuximab) 响应 (第 5–28 代)。将 H_CLDN18.2 CHO-K1 细胞系 (GM-C05273) 按 1.5E4 细胞/孔接种于 96 孔板并过夜孵育，次日加入梯度稀释的 Anti-CLDN18.2 hIgG1 抗体 (Zolbetuximab) (GM-34137AB) 与按 1.5E5 细胞/孔接种的 ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector 细胞系 (GM-C05619)，继续孵育 6 小时后，采用 Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) 检测萤火虫荧光素酶活性，数据以药物质量浓度表示。

细胞复苏

复苏培养基：RPMI 1640+10% FBS+1% P.S

为确保最高存活率，应在收到冻存细胞后立即解冻并复苏培养。如果在收到细胞后需要继续储存，将其置于液氮罐中，严禁储存在-70°C，因为在-70°C 下储存会导致活性丧失。

- 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 $\geq 3E6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $4-6E5$ 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。

细胞冻存

细胞冻存液：90% FBS+10% DMSO

- 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 $5E6$ 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。

细胞传代

生长培养基：RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+3.5 μ g/mL Blasticidin+0.75 μ g/mL Puromycin

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。

- 细胞为淋巴细胞状，悬浮生长。
- 当细胞密度达到 $1.5-2E6$ cells/mL，1 传 3，隔 2-3 天继续传代，不要让其密度超 $2E6$ 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。

细胞传代比例为 1:3，2-3 天传代。

培养备注

- 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。

实验方案

概要

- a) 针对不同抗体样品，操作步骤可调整优化。如果是针对固定的抗体和靶细胞进行检测，建议先优化 E:T(效应细胞:靶细胞)比例，针对此次实验 ADCC 效应细胞量为 $1.5 \times 10^5/\text{Well}$ ，调整靶细胞数。对于贴壁靶细胞推荐的 E:T ratios 为 10 : 1(1.5×10^5 效应细胞 : 1.5×10^4 靶细胞)。对于悬浮靶细胞推荐的 E:T ratios 为 6 : 1(1.5×10^5 效应细胞 : 2.5×10^4 靶细胞)。

以靶细胞为贴壁细胞举例说明

本实验使用 1.5×10^5 Cells/Well 的 ADCC Bioassay 效应细胞和 1.5×10^4 Cells/Well 的靶细胞(接种密度)。本次实验使用 Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody(Zolbetuximab) (母液浓度 0.35 mg/mL; 150 kDa; 以下简称 Zolbetuximab) 为阳性抗体，起始浓度 (Conc.01) 为 15 $\mu\text{g/mL}$ ，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	Zolbetuximab	PBS	15 $\mu\text{g/mL}$	3.75 $\mu\text{g/mL}$	937.5 ng/mL	234.38 ng/mL	58.59 ng/mL	14.65 ng/mL	3.66 ng/mL	915.53 pg/mL	228.88 pg/mL	0	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

加样步骤

- a) 在实验前 20-24 h，取出 H_CLDN18.2 CHO-K1 cell line (Genomeditech/ [GM-C05273](#)) 消化离心收集细胞沉淀，使用适量完全培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以完全培养基调整细胞浓度为 1.5×10^5 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。
- b) 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。每个待测样品，使用一行 (如 B2-B10 行)。
- c) 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 67 μL Assay Buffer，B3-B11 加入 55 μL 的 Assay Buffer。
- d) 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 6.29 μL Zolbetuximab)，混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.33 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	6.29 μL Zolbetuximab	加入	67 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													

- e) 从第一个稀释孔在 B2 吸取 18.33 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3 中，充分混匀。
- f) 以此类推，直至 B10 孔；B11 为不加抗体的对照。
- g) 实验前 1-2 h，离心收集 ADCC Fc γ RIIIa(158V) Jurkat Effector 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 ADCC Fc γ RIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line 到 3×10^6 cells/mL。

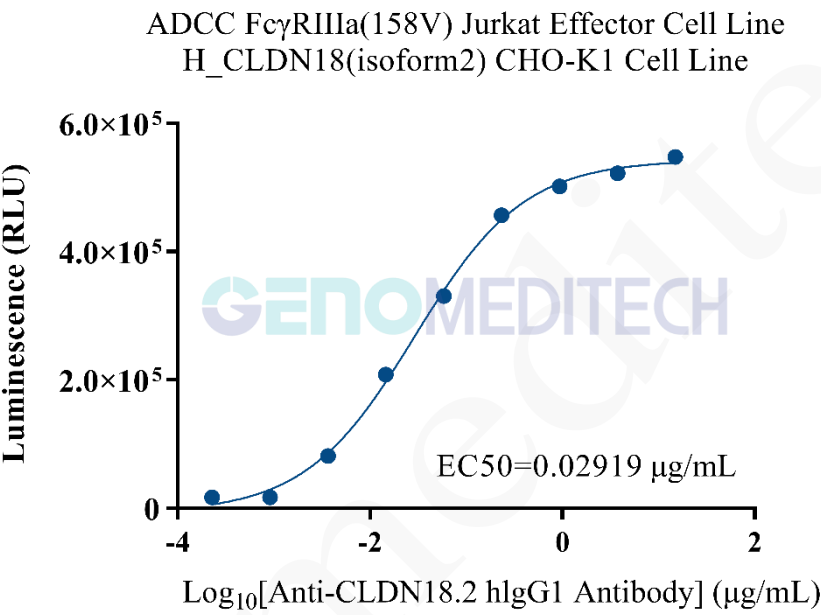
- h) 取出步骤 a 准备好的细胞孔板，吸弃上清。加入准备好的 ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line 细胞溶液，每孔 50 μL。
- a) 然后再加入步骤 f 准备好的抗体梯度稀释液，每孔加入 50 μL。
- b) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- c) 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line+Anti-CLDN18.2	0 μg/mL	15 μg/mL	228.88 pg/mL
	11008	547705	16519

验证结果



以靶细胞悬浮细胞举例说明

本实验使用 1.5×10^5 Cells/Well 的 ADCC Bioassay 效应细胞和 2.5×10^4 Cells/Well 的靶细胞。使用 Anti-CD20 (Rituximab) 为阳性抗体（母液浓度 $3.5 \mu\text{g/mL}$ ；约 150 kDa；以下简称：Rituximab），起始浓度（Conc.01）为 56.45 ng/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	Rituximab	PBS	56.45 ng/mL	14.11 ng/mL	3.53 ng/mL	882.04 pg/mL	220.51 pg/mL	55.13 pg/mL	13.78 pg/mL	3.45 pg/mL	861.37 fg/mL	0	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

加样步骤

- 在实验前 1-2 h，1) 离心收集 Raji 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，调整细胞浓度为 7.6×10^5 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。盖上板盖，于孵箱中孵育备用；
- 在实验前 1-2 h，离心收集 ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector 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 ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line 到 4.54×10^6 cells/mL。
- 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。每个待测样品，使用一行（如 B2-B10 行）。如在 B2 孔中加入 $52.8 \mu\text{L}$ 的 Assay buffer，B3-B11 加入 $39.6 \mu\text{L}$ 的 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 $2.7 \mu\text{L}$ Rituximab），混匀。

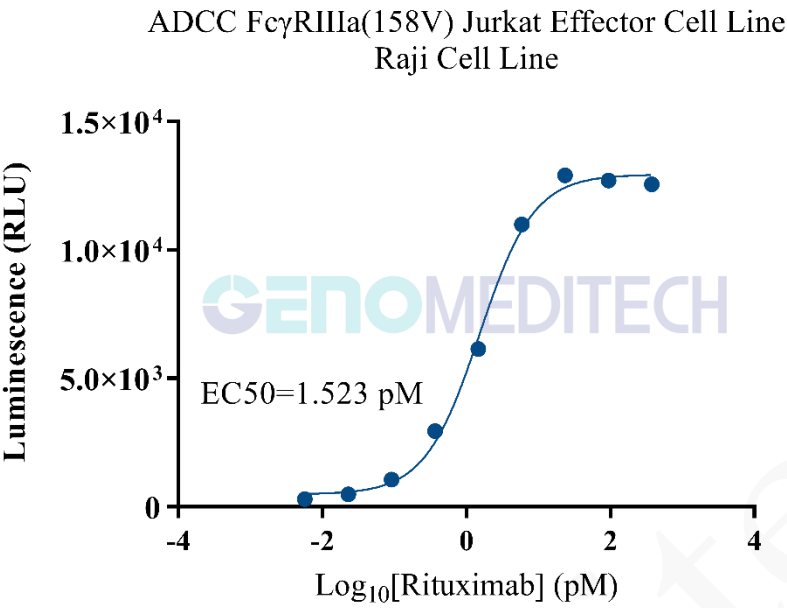
母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 $13.2 \mu\text{L}$ ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	2.7 μL Rituximab	加入	52.8 μL	39.6 μL	39.6 μL	39.6 μL	39.6 μL	39.6 μL	39.6 μL	39.6 μL	39.6 μL	39.6 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- 从第一个稀释孔在 B2 吸取 $13.2 \mu\text{L}$ ，加入到第二个梯度稀释孔 B3 中，充分混匀。
- 以此类推，直至 B10 孔，B11 为不加抗体的对照。
- 取出步骤 a 准备好的 Raji 细胞孔板，以排枪加入步骤 b 准备好的 ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line 细胞，每孔 $33 \mu\text{L}$ 。
- 然后再加入步骤 f 的抗体梯度稀释液，每孔加入 $33 \mu\text{L}$ 。
- 盖上检测板盖，于 37°C CO_2 培养箱中培养 6 h。
- 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line+Rituximab	0 $\mu\text{g/mL}$	56.45 ng/mL	861.37 fg/mL
	273	12552	298



相关产品

FcγR	
H_CD32B aAPC CHO-K1 Cell Line	Cynomolgus_FcRn MDCK Cell Line
H_FCGR1A(CD64) CHO-K1 Cell Line	H_FCGR1A(CD64) HEK-293 Cell Line
H_FCGR2A(CD32A) CHO-K1 Cell Line	H_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line
H_FCGR3A(CD16a) 158F CHO-K1 Cell Line	H_FCGR3A(CD16a) 158V CHO-K1 Cell Line
H_FCGR3B(CD16b) CHO-K1 Cell Line	H_FcRn CHO-K1 Cell Line
H_FcRn MDCK Cell Line	H_FcRn-GFP HEK-293 Cell Line
Mouse_FcγRIV FcγRIIb aAPC CHO-K1 Cell Line	Mouse_FcγRIV FcγRIIb CHO-K1 Cell Line
Mouse_FcRn MDCK Cell Line	
Anti-FcRn hIgG4 Reference Antibody(Rozabio)	Anti-H_FcRn IgG4 Antibody(Rozanolixizumab)
Anti-Mouse CD16/32 mIgG2b Antibody(2.4G2)	
Human IgG1 Fc Protein; His Tag	
ADCCP	
ADCC FcγRIIIa(158F) Jurkat Effector Cell Line	ADCC FcγRIIIa(158V) DDX35TM Jurkat Effector Cell Line
ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line	ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter Jurkat(CD3 KO) Cell Line
ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter NK-92 Cell Line	ADCC M_FcγRIV Jurkat Effector Cell Line
ADCP FcγRI Jurkat Effector Cell Line	ADCP FcγRIIa DDX35TM Jurkat Effector Cell Line
ADCP FcγRIIa Jurkat Effector Cell Line	ADCP FcγRIIa R131 Jurkat Effector Cell Line
ADCP FcγRIIb Jurkat Effector Cell Line	ADCC FcγRIIIa(158V) NK-92 Cell Line

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。