

产品手册

H_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat Cell Line

H_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.1

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（示例）	7
1.	激动剂验证实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	9
附录 1	RT 验证	10
附录 2	Western Blotting 验证	10
使用许可协议：		11

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-C44062	H_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C44062	H_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat 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

CLEC4E (又称 Mincle, Macrophage-inducible C-type lectin) 是 C 型凝集素受体 (CLR) 家族成员, 主要表达于巨噬细胞、树突状细胞及部分髓系来源免疫细胞表面, 是天然免疫识别"损伤相关分子模式 (DAMPs)"与病原相关分子模式 (PAMPs) 的关键传感器。Mincle 的经典配体包括死结核分枝杆菌细胞壁成分 trehalose-6,6'-dibehenate (TDB)、真菌来源的 β -葡聚糖类似物及内源性损伤信号 SAP130 (凋亡细胞释放)。Mincle 为非信号型 CLR, 其胞内区无 ITAM 基序, 必须通过共表达 FcR γ 链 (含 ITAM) 形成异源二聚体, 配体结合后 ITAM 被 Src 家族激酶磷酸化, 激活 NFAT 通路, 驱动促炎因子释放。

Mincle 是抗感染免疫与新型佐剂开发的热门靶点, TDB 作为 CAF01 佐剂 (SSI 开发, 用于结核/流感/COVID-19 候选疫苗) 的核心活性组分, 通过 Mincle 激活 APCs 增强 Th1/Th17 应答, 已进入多项临床前与临床研究; 同时 Mincle 在无菌性炎症 (如缺血再灌注、痛风) 及肿瘤微环境 (TAM 上 Mincle 介导 DAMPs 识别) 中亦发挥调控作用, 是抗炎与免疫调节药物的新兴干预节点。

吉满生物 H_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat Cell Line 报告基因细胞系, 是基于 CLEC4E 构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。该细胞稳定表达 CLEC4E、FcR γ 及 Luciferase 报告基因, 可用于靶向 CLEC4E 的相关药物效果评价。

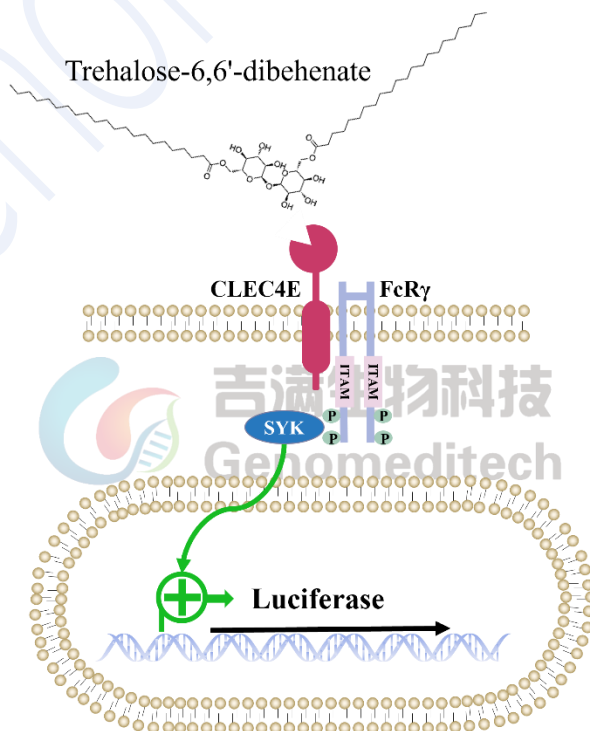


Fig 1. 原理示意图

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+200 µg/mL Hygromycin+0.75 µg/mL Puromycin
细胞冻存培养基:	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.
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
96 well round cell culture plate	Plate	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	Plate	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	Plate	Saining/1014010
Trehalose-6,6'-dibehenate	1 mg	MCE/HY-112137
FcR gamma (E6Y1A) Rabbit Monoclonal Antibody	100 µg	Cell Signaling/78401T
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

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 5 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 5×10^6 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 2×10^6 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 需 56° C 水浴 30 分钟，可热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。

六、 使用方法（示例）

1. 激动剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Trehalose-6,6'-dibehenate（以下简称 TDB；分子量 987.43 Da）作为阳性药物。Conc.01 浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ ，1.5 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μL 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	
B	TDB	15 μg/mL	10 μg/mL	6.67 μg/mL	4.44 μg/mL	2.96 μg/mL	1.98 μg/mL	1.32 μg/mL	877.91 ng/mL	585.28 ng/mL	390.18 ng/mL	260.12 ng/mL	0
C		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_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat Cell Line，以 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，调整细胞浓度至 5×10^5 cells/mL。
- 使用无菌 96 孔板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
TDB	1 mg/mL	0.1 mg/mL	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B1 孔中加入 24 μL 的 Assay buffer，B2-B12 加入 8 μL 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 B1 中加入 4.24 μL TDB），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 16 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	4.24 μL TDB 加入	24 μL	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔（如 B1）中吸取 16 μ L 溶液，加入到第二个梯度稀释孔中（如 B2），充分混匀，确保 TDB 悬浮液在孔板表面均匀分布。
- h) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11）。
- i) 将稀释好的孔板置于室温（15-25 $^{\circ}$ C）下干燥 1 h。
- j) 在加药干燥的孔板中加入步骤 a 准备好的 H_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat Cell Line 细胞 100 μ L/孔。
- k) 盖上检测板盖，于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 24 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_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat Cell Line	0 μ g/mL	15 μ g/mL	260.12 ng/mL
	22955	3744173	59142

3) 验证结果

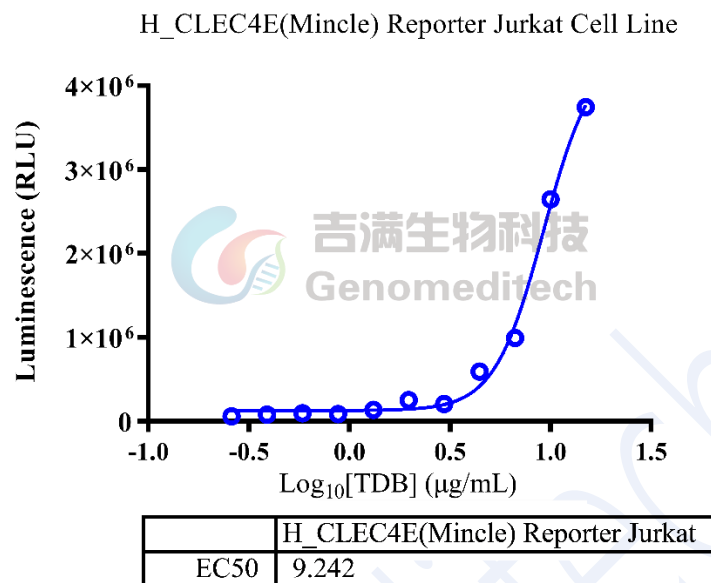


Fig 2. Response to TDB. The H_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat Cell Line (Cat. GM-C44062) at a concentration of 5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Trehalose-6,6'-dibehenate (MCE/HY-112137) in assay buffer (RPMI 1640 + 10% FBS + 1% P.S) for 24 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [257.1]. Data are shown by drug mass concentration.

附录 1 RT 验证

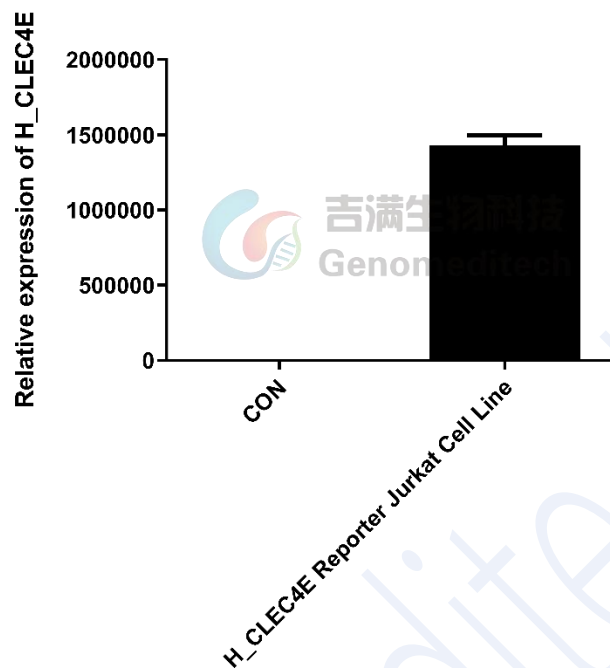
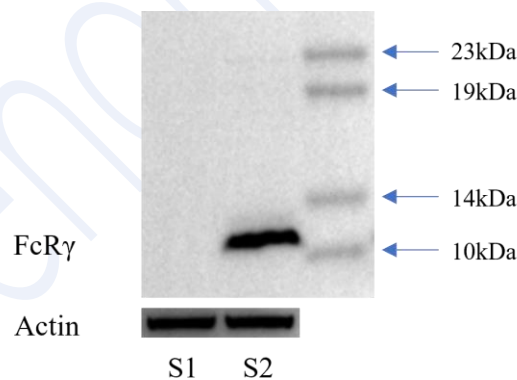


Fig 3. The mRNA expression levels of H_CLEC4E in the H_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat Cell Line (Cat. GM-C44062) were determined by RT-qPCR.

附录 2 Western Blotting 验证



S1: Con S2: H_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat Cell Line

Fig 4. The protein expression levels of H_FcR gamma in the H_CLEC4E(Mincle) Reporter Jurkat Cell Line (Cat. GM-C44062) were determined by Western blotting (WB).

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。