

产品手册

H_CLEC5A Reporter Jurkat Cell Line

H_CLEC5A 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.....	7
1.	激活验证实验（Crosslink）.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
附录：	流式验证结果.....	10
附录：	功能验证结果.....	10
产品清单：	11
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-C25939	H_CLEC5A 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-C25939	H_CLEC5A 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

骨髓细胞 C 型凝集素受体 5A (CLEC5A)，是一种在人体中由 CLEC5A 基因编码的蛋白质。CLEC5A 蛋白是 C 型凝集素超家族成员，主要在中性粒细胞、单核/巨噬细胞和树突状细胞等髓系免疫细胞表面高表达。它作为模式识别受体，是识别病原体相关分子模式、触发强烈炎症反应的关键分子，正日益成为败血症、病毒性脑炎及自身免疫性疾病等领域的重要受体，并具有显著的干预潜力和治疗靶点价值。

CLEC5A 通过其胞内段与含有免疫受体酪氨酸活化基序的接头蛋白 DAP12 或 FcR γ 相偶联。当受体与配体（如登革热病毒、甲型流感病毒或细菌成分）结合后，导致相连的接头蛋白其 ITAM 基序被 Src 家族激酶磷酸化。磷酸化的 ITAM 招募并激活 Syk 酪氨酸激酶，进而通过一系列适配蛋白激活下游关键信号分子，包括磷脂酶 C γ (PLC γ) 和 NF- κ B 通路。活化的 PLC γ 水解 PIP₂ 生成 IP₃ 和 DAG，介导钙内流和蛋白激酶 C (PKC) 激活，最终与 NF- κ B 通路协同，强烈诱导肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 等促炎细胞因子的产生与释放，驱动剧烈的炎症反应。

吉满生物 H_CLEC5A Reporter Jurkat Cell Line 报告基因细胞系，是基于 CLEC5A 下游信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。通过信号通路的激活，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 CLEC5A 相关药物的体外效果评价。

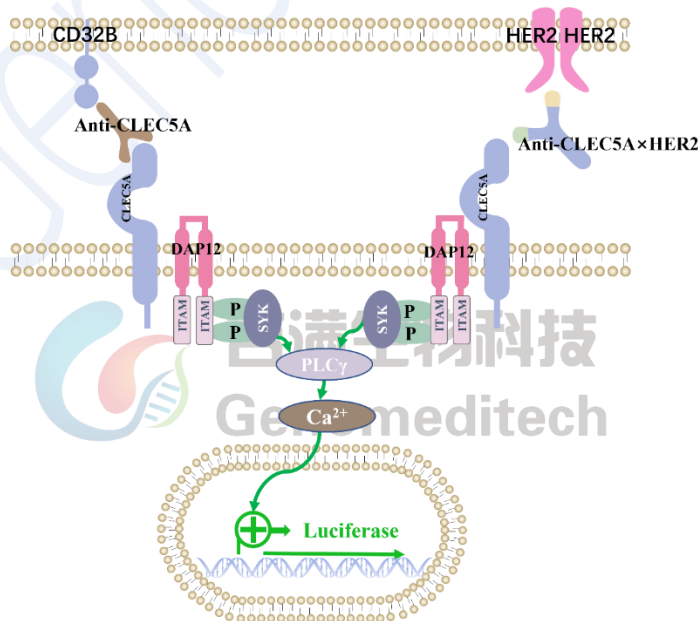


Fig 1. 信号通路图

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+400 µg/mL G418+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.
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
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
96 well round cell culture plate	96-well	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	96-well	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	96-well	Saining/1014010
H_HER2(ERBB2) CHO-K1 Cell Line	1 管(5E6 Cells/mL)	Genomeditech/GM-C18996
H_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line	1 管(5E6 Cells/mL)	Genomeditech/GM-C16925
Anti-CLEC5A×HER2 hIgG1 Bispecific Antibody(HER2/5C7)	/	Genomeditech/GM-88513AB
Anti-Human CLEC5A/MDL1 Antibody (DX246)		Antibodysystem/FHK16010
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	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， $176 \times g$ ，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 $176 \times g$ ，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 5×10^6 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 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。

六、 使用方法

1. 激活验证实验 (Crosslink)

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 H_CLEC5A Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 5×10^4 cells/孔, H_HER2(ERBB2) CHO-K1 Cell Line 和 CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Anti-CLEC5A×HER2 hIgG1 Bispecific Antibody(HER2/5C7) (约 150 kDa; 以下简称 Anti-CLEC5A×HER2) 作为阳性药物, Conc.01 浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$, 5 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.08 分别排布在 B2-B9, B10 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	Anti-CLEC5A×HER2	1.00 $\mu\text{g/mL}$	200.00 ng/mL	40.00 ng/mL	8.00 ng/mL	1.60 ng/mL	320.00 pg/mL	64.00 pg/mL	12.80 pg/mL	0	PBS	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 16-24 h, 将 H_HER2(ERBB2) CHO-K1 Cell Line 和 CHO-K1 Cell Line 细胞从培养瓶中取出, 消化离心收集细胞沉淀, 使用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 1×10^5 cells/mL。以排枪加 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上板盖, 放入培养箱中孵育过夜。
- 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。
- 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B9)。
- 母液配置

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-CLEC5A×HER2	4.64 mg/mL	46.4 $\mu\text{g/mL}$	取 2 μL 储液+198 μL Assay Buffer

- e) 96 孔 U 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 75 μL Assay Buffer, B3-B10 孔, 加入 60 μL 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 3.38 μL Anti-CLEC5A \times HER2), 混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 15 μL , 加入次孔									对照孔		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	3.38 μL Anti-CLEC5A \times HER2	加入	75 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL			
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 15 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 8 个梯度稀释孔 (B9)。
- i) 在实验前 1 h, 将 H_CLEC5A Reporter Jurkat Cell Line 细胞从培养瓶中取出, 离心收集细胞沉淀, 使用 Assay Buffer 重悬, 检测细胞活力并计数, 再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 1×10^6 cells/mL。
- j) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出, 弃上清; 加入步骤 i 准备好的 H_CLEC5A Reporter Jurkat Cell Line 溶液, 每孔 50 μL 。
- k) 然后加入步骤 h 准备好抗体溶液, 每孔 50 μL 。
- l) 盖上班盖, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- m) 使用报告基因检测试剂盒, 检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CLEC5A Reporter Jurkat Cell Line + H_HER2(ERBB2) CHO-K1 Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	12.80 pg/mL
	2630	2662781	2526
H_CLEC5A Reporter Jurkat Cell Line+ CHO-K1 Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	12.80 pg/mL
	2253	3192	2463

3) 验证结果

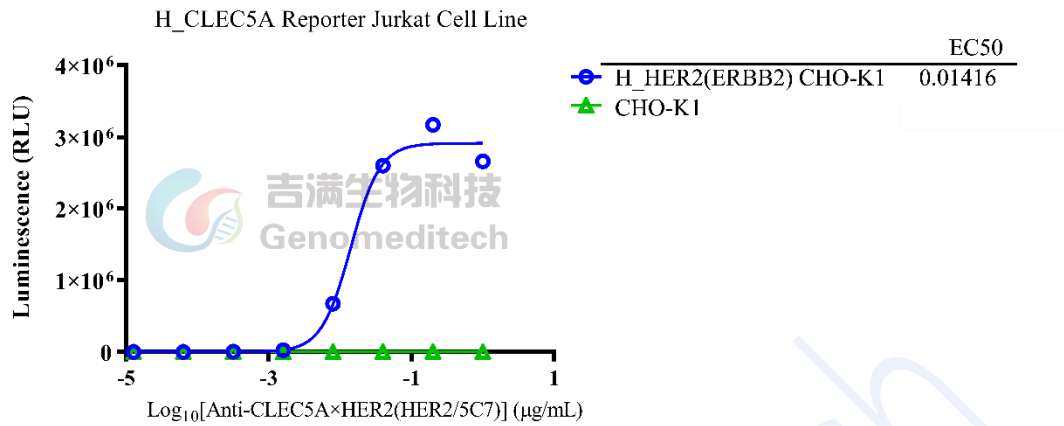


Fig 2. Response to Anti-CLEC5A×HER2 hIgG1 Bispecific Antibody(HER2/5C7). The H_HER2(ERBB2) CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C18996) and CHO-K1 Cell Line were seeded at a density of 1E4 cells per well in a 96-well plate and incubated overnight. The next day, serial dilutions of Anti-CLEC5A×HER2 hIgG1 Bispecific Antibody(HER2/5C7) (Cat. GM-88513AB) and the H_CLEC5A Reporter Jurkat Cell Line (Cat. GM-C25939) at a concentration of 5E4 cells per well were added to the pre-seeded cells. The mixture was incubated for an additional 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [1012.5]. Data are shown by drug mass concentration.

附录：流式验证结果

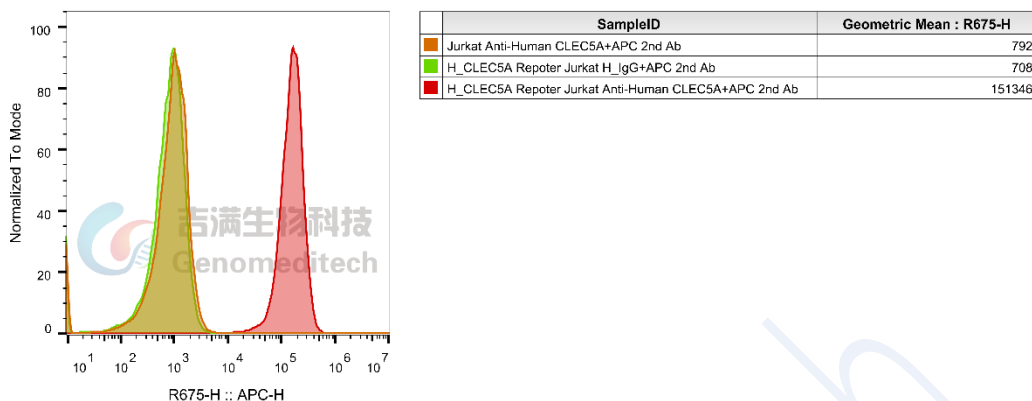


Fig 3. H_CLEC5A Reporter Jurkat Cell Line (Cat. GM-C25939) Was determined by flow cytometry using Anti-Human CLEC5A/MDL1 Antibody (DX246)(antibodysystem/FHK16010).

附录：功能验证结果

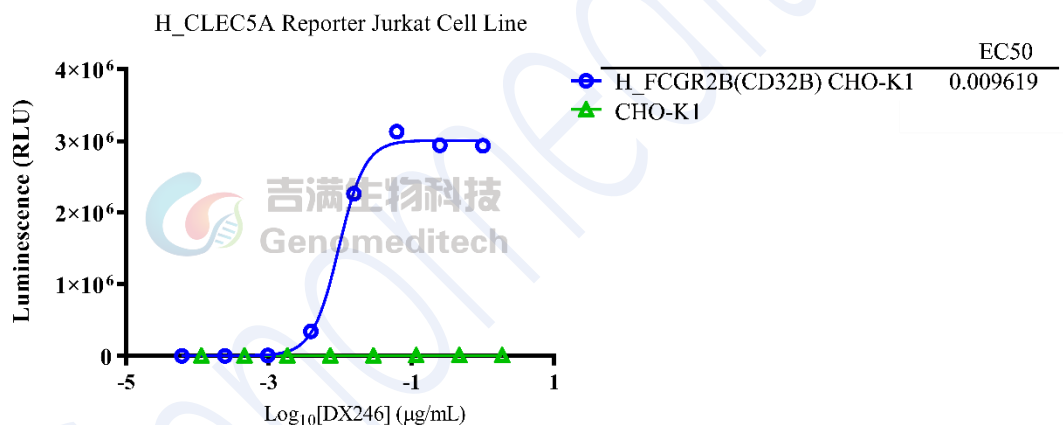


Fig 4. Response to Anti-Human CLEC5A/MDL1 Antibody (DX246). The H_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C16925) and CHO-K1 Cell Line were seeded at a density of 1E4 cells per well in a 96-well plate and incubated overnight. The next day, serial dilutions of Anti-Human CLEC5A/MDL1 Antibody (DX246) (antibodysystem/FHK16010) and the H_CLEC5A Reporter Jurkat Cell Line (Cat. GM-C25939) at a concentration of 5E4 cells per well were added to the pre-seeded cells. The mixture was incubated for an additional 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [740.6]. Data are shown by drug mass concentration.

产品清单:

TREM2	
Cynomolgus_CLEC5a CHO-K1 Cell Line	Anti-CLEC5A×HER2 hIgG1 Bispecific Antibody(HER2/5C7)
H_CLEC5a HEK-293 Cell Line	
H_CLEC5a CHO-K1 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。