

技术手册

H_SIRP α /CD47 Reporter Blockade Assay(Jurkat:CHO)

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.8.240522

目录

一、	产品描述.....	3
二、	产品基本信息及组分.....	4
三、	包装、运输及储存.....	4
四、	细胞信息.....	4
五、	实验仪器及试剂.....	5
1.	试剂和耗材.....	5
六、	细胞复苏、传代、冻存.....	6
1.	Jurkat 细胞复苏.....	6
2.	Jurkat 细胞传代.....	6
3.	Jurkat 细胞冻存.....	6
4.	CHO-K1 细胞复苏.....	7
5.	CHO-K1 细胞传代.....	7
6.	CHO-K1 细胞冻存.....	7
七、	使用方法.....	8
1.	共培养激活验证实验.....	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	9
2.	抗体抑制验证实验.....	10
1)	加样步骤.....	10
2)	报告基因检测.....	12
3)	验证结果.....	12
	使用许可协议:	13

一、 产品描述

CD47, 称为整合素相关蛋白 (IAP), 是在人体中由 CD47 基因编码的跨膜蛋白, 属于免疫球蛋白超家族, 可以与整合素 (Integrin)、血小板反应蛋白-1 (TSP-1) 和信号调节蛋白 α (Sirp α) 相互作用。其蛋白结构包括胞外 N 端 IgV 结构域、5 个跨膜域和胞内 C 末端的跨膜糖蛋白, 广泛表达于几乎所有的正常细胞表面。

Sirp α 是来自 SIRP 家族的调节膜糖蛋白, 表达局限于巨噬细胞、树突状细胞以及神经细胞表面。Sirp α 作为抑制受体, 与 CD47 相互作用, 释放“别吃我”信号, 从而抑制巨噬细胞吞噬作用。而一些肿瘤细胞也会高表达 CD47 以实现免疫逃逸。SIRP α 的细胞质区域在人、大鼠, 小鼠之间高度保守, 含有许多酪氨酸残基 ITIM。在与 CD47 结合时, Sirp α 被磷酸化并招募 SHP1 和 SHP2, 传递细胞内信号。

吉满生物 H_SIRP α /CD47 Reporter Blockade Assay (Jurkat:CHO) 报告基因细胞系, 当 CD47 结合 SIRP α 后, 激活 CD3 ζ , 从而激活荧光素酶 (Luciferase) 的表达, 且这种激活作用可以被具有 Block 效应的抗体阻断, 因此此细胞模型可用于筛选阻断型的抗体。Luciferase 读值即代表信号通路的激活和阻断效果, 因此可用于 CD47 和 SIRP α 相关抗体药物的体外效果评价。

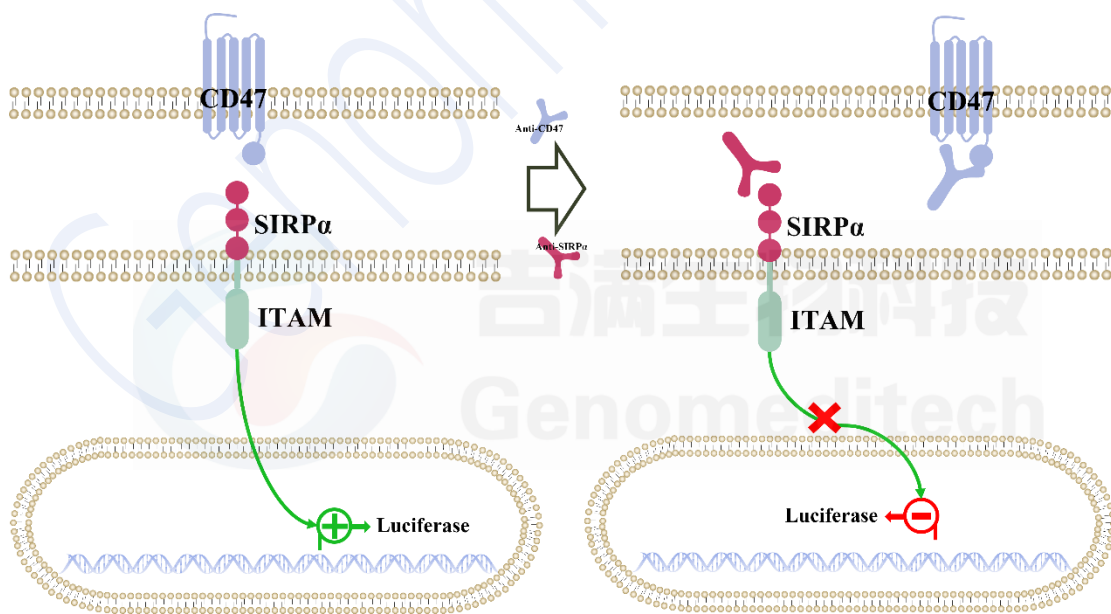


Fig1.CD47-SIRP α -CD3 ζ 原理示意图

二、产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-032AS007	H_SIRP α /CD47 Reporter Blockade Assay(Jurkat:CHO)	1 kit

组成成分

名称	Cat.	数量
H_SIRP α Blockade Reporter Cell Line	GM-C23900	1 管 (5E6 Cell/mL)
H_CD47 CHO-K1 cell line	GM-C09241	1 管 (5E6 Cell/mL)

三、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。

四、细胞信息

H_SIRP α Blockade Reporter Cell Line

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 μ g/mL Blasticidin+400 μ g/mL G418+200 μ g/mL Hygromycin+0.75 μ g/mL Puromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

Jurkat 来自中国科学院细胞库，悬浮细胞

H_CD47 CHO-K1 cell line

细胞复苏培养基: F12K+10% FBS+1% P.S

细胞生长培养基: F12K+10% FBS+1% P.S+4 μ g/mL Puromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

CHO-K1 来自中国科学院细胞库，贴壁细胞

Assay Buffer

RPMI 1640+1% FBS+1% P.S

五、 实验仪器及试剂

1. 试剂和耗材

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
G418	10 mg	Genomeditech/GM-040402-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell BIOSCIENCES/ C3010-0500
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Anti-CD47 hIgG4 Antibody(5F9)	/	Genomeditech/GM-27657AB
Anti-H_SIRP α hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-46164AB
Luciferase Assay Kit	100 tests	Genomeditech/GM-040501A

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. Jurkat 细胞复苏

- a) 37°C水浴锅预热培养基，加入预热后的完全培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- b) 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不断摇动至融化。
- c) 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，1000 rpm，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- d) 使用 1 mL 完全培养基重悬。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。
- e) 通过补加培养基的形式调整活细胞密度为 $4 - 6 \times 10^5$ cells/mL，将细胞悬液接种至 1 - 2 个 T25 中（3 - 5 mL 悬液），竖瓶培养。

2. Jurkat 细胞传代

- a) 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。
- b) 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新鲜培养液，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。
- c) 注意营养，不处理时务必隔天适当补加培养基。

3. Jurkat 细胞冻存

- a) 使用 1000 rpm，3 min 离心收集细胞。
- b) 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。
- c) 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。

4. CHO-K1 细胞复苏

- a) 37°C水浴锅预热培养基，加入预热后的完全培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- b) 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不断摇动至融化。
- c) 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，1000 rpm，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- d) 使用 1 mL 完全培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，活细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- e) 通过补加完全培养基的形式，调整活细胞密度到 $2 - 3 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中。

5. CHO-K1 细胞传代

- a) 当细胞密度大于 60%时，即可进行传代。推荐细胞传代比例为 1:4 - 1:5，2-3 天传代传代。
- d) 将皿或培养瓶中的培养基弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- e) 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液润洗一遍，吸弃，再次吸取 1 mL 消化液，37°C 消化 2 - 3 min，显微镜下观察。
- f) 待细胞变圆，细胞间隙明显，部分细胞刚开始脱离瓶壁时，加 2 mL 左右完全培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，1000 rpm 室温离心 3 min。
- g) 弃上清，细胞沉淀用完全培养基重悬，根据传代前细胞密度分盘（根据培养皿面积和细胞密度计算，传代后细胞密度为 20 - 30%）。

6. CHO-K1 细胞冻存

- a) 使用 1000 rpm，3 min 离心收集细胞。
- b) 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。
- c) 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。

七、使用方法

1. 共培养激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_SIRPα Blockade Reporter Cell Line 细胞量为 1.5×10^5 cells/孔。本次实验使用 H_CD47 CHO-K1 cell line 作为靶细胞，Conc.01 细胞量为 2×10^5 cells，2 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 细胞量对照。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	PBS
B	H_CD47 CHO-K1 cell line	2×10^5 cells	1×10^5 cells	50000 cells	25000 cells	12500 cells	6250 cells	3125 cells	1562.5 cells	781.25 cells	0	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_CD47 CHO-K1 细胞从培养瓶中消化下来，离心 130 - 200 × g（根据不同细胞可调整转速）收集细胞，适量新鲜培养基重悬后检测细胞活力并计数，再以新鲜培养基调整细胞密度至 2×10^6 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上市盖，于培养箱中孵育过夜。
- 实验前 1 h，将 H_SIRPα Blockade Reporter 细胞从培养瓶中取出，离心 130 - 200 × g（根据不同细胞可调整转速）收集细胞，重悬后检测细胞活力并计数，再以培养基调整细胞浓度为 1.5×10^6 cells/mL 备用。
- 步骤 a 接种过夜的靶细胞，每孔吸弃 100 μL 培养基。
- 加入步骤 2 准备的细胞悬液，100 μL 每孔， 1.5×10^5 cells/孔。
- 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 16 h。
- 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_SIRPα/CD47 Reporter	0 cells	2×10^5 cells	781.25 cells
Blockade Assay(Jurkat:CHO)	544	63857	3118

3) 验证结果

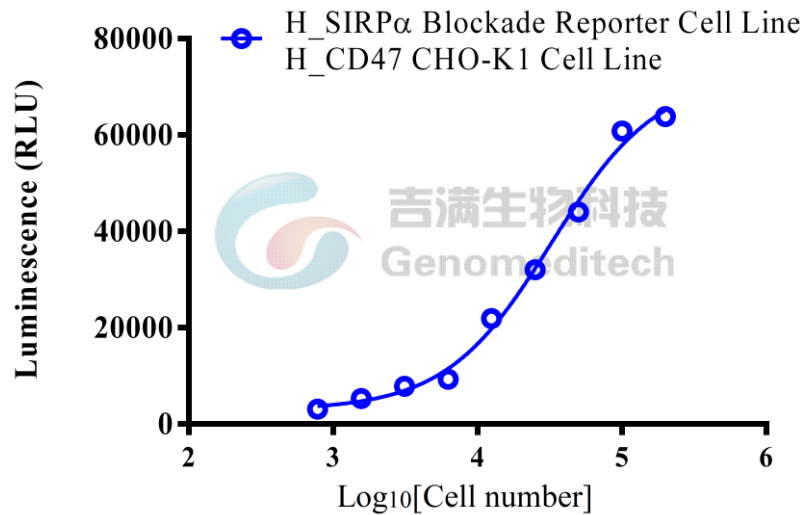


Fig 2.共培养激活验证结果

2. 抗体抑制验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_SIRPα Blockade Reporter Cell Line 细胞量为 1.5×10^5 cells/孔。本次实验使用 Anti-H_SIRPα (150 kDa) 和 Anti-H_CD47 (150 kDa) 作为阳性抗体。Anti-H_SIRPα: Conc.01 终浓度为 15 μg/mL, 3 倍梯度稀释。Anti-H_CD47: Conc.01 终浓度为 15 μg/mL, 3 倍梯度稀释。以 Anti-H_CD47 为例, Conc.01-Conc.09 分别排在 B2-B10, B11 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	PBS
B	Anti-H_CD47	15 μg/mL	5 μg/mL	1.67 μg/mL	555.56 ng/mL	185.19 ng/mL	61.73 ng/mL	20.58 ng/mL	6.86 ng/mL	2.29 ng/mL	0	PBS
C	Anti-H-SIRPα	15 μg/mL	5 μg/mL	1.67 μg/mL	555.56 ng/mL	185.19 ng/mL	61.73 ng/mL	20.58 ng/mL	6.86 ng/mL	2.29 ng/mL	0	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E												
F												
G												
H												

1) 加样步骤

- 在实验前 16-24 h, 将 H_CD47 CHO-K1 细胞从培养瓶中消化下来, 离心 130-200 × g (根据不同细胞可调整转速) 收集细胞, 适量新鲜培养基重悬后检测细胞活力并计数, 再以新鲜培养基调整细胞到 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。盖上市盖, 于培养箱中孵育过夜。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测样品, 使用一行 (B2-B11)。
- 母液配置

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-H_CD47	0.299 mg/mL	/	直接使用储液
Anti-H-SIRPα	1 mg/mL	/	直接使用储液

- 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 74.2 μL Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 55 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 孔中加入 8.28 μL Anti-H_CD47）。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 27.5 μL ，加入次孔										对照
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	8.28 μL Anti-H_CD47 加入	74.2 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	
C	2.48 μL Anti-H-SIRP α 加入	80 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 27.5 μL 液体，加入到第二个梯度稀释孔（如 B3），充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- i) 从细胞培养瓶中转移 H_SIRP α Blockade Reporter Cell Line 细胞至 50 mL 离心管中，离心后收集细胞沉淀，适量 Assay Buffer 重悬，检测细胞活力并计数，再使用 Assay Buffer 调整细胞浓度到 3×10^6 cells/mL。
- j) 将上一步的细胞悬液与梯度稀释的 Anti-H-SIRP α hIgG1 Antibody 孵育 1 h（52 μL +52 μL ）。
- k) 同步将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，B 行吸弃上清，加入梯度稀释的 Anti-CD47 hIgG4 Antibody(5F9)，50 μL 每孔，共同孵育 1 h。
- l) 1 h 后，B 行加入步骤 i 调整好的细胞悬液，50 μL 每孔；C 行吸弃上清，加入步骤 j 的混合液，100 μL 每孔。
- m) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 15 h。
- n) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_SIRP α Blockade Reporter Cell Line+Anti-H_CD47	0 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$	2.29 ng/mL
	10195	876	12121
H_SIRP α Blockade Reporter Cell Line+Anti-H_SIRP α	0 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$	2.29 ng/mL
	10386	3375	10478

3) 验证结果

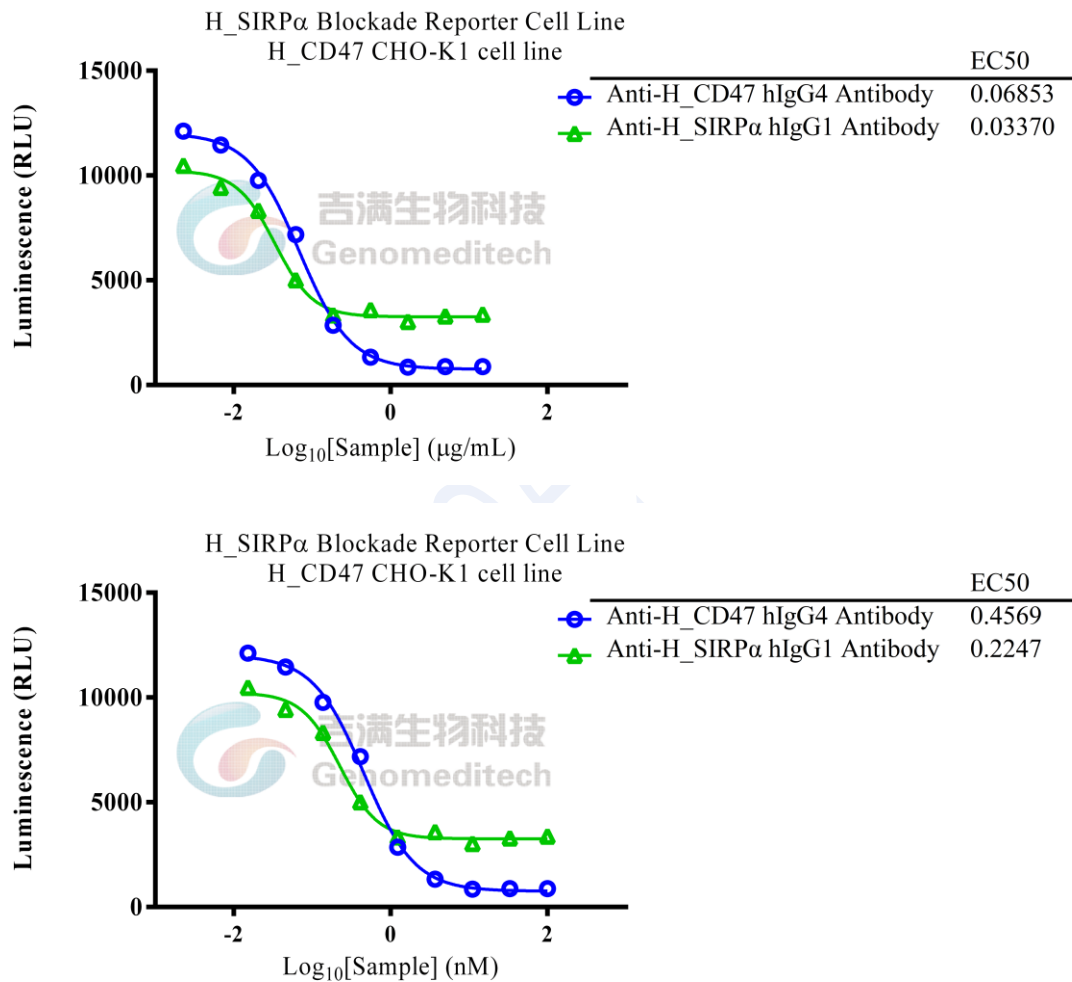


Fig 3.抗体抑制验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

使用许可协议:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech