

产品手册

H_NKG2D Blockade Reporter Jurkat Cell Line

H_NKG2D Blockade 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：V2.12.2

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、	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.	细胞共培养，抗体 block 实验——Tesnatilimab	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	9
附录 1	H_NKG2D Blockade Reporter Jurkat Cell Line 流式结果	10
相关产品		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-C27755	H_NKG2D Blockade 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-C27755	H_NKG2D Blockade 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

NKG2D 是一种活化受体(跨膜蛋白),属于 C 型凝集素样受体 NKG2 家族。NKG2D 由 KLRK1 (杀伤细胞凝集素样受体 K1) 基因编码,该基因位于小鼠 6 号染色体和人类 12 号染色体上的 NK 基因复合体 (NKC) 中。

在NK细胞中,主要有两种受体控制细胞激活和抑制的平衡:一种识别MHC I(HLA-A,B,C), 另一种识别非 MHC I。识别 MHC I 的为 NKG2A 和 NKG2C, 识别非 MHC I 的主要为 NKGD 和 NCR。NKG2D 是二型膜蛋白,以二聚体形式表达在细胞膜上,有两种转录本,长转录本 NGK2DL 和短转录本 NKG2DS。NKG2D 的配体主要有 MICA/MICB, ULBP1-6, 当配体与 NKG2D 结合后, DAP10 蛋白上 YXXM 序列可以招募 GRB2, PI3K, 进而激活 PLC γ , 激活 NK 细胞。NKG2D 也在 CD8+ T 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞上表达,但其仅作为共刺激信号, 需要与 T 细胞上的其他受体配合。

吉满生物 H_NKG2D Blockade Reporter Jurkat Cell Line 是一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 MICA 结合 NKG2D 后,激活下游信号通路,从而激活荧光素酶(Luciferase)的表达,使用阻断型的抗体可以阻断这一信号的传导。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果,因此可用于 NKG2D 相关药物的体外效果评价。

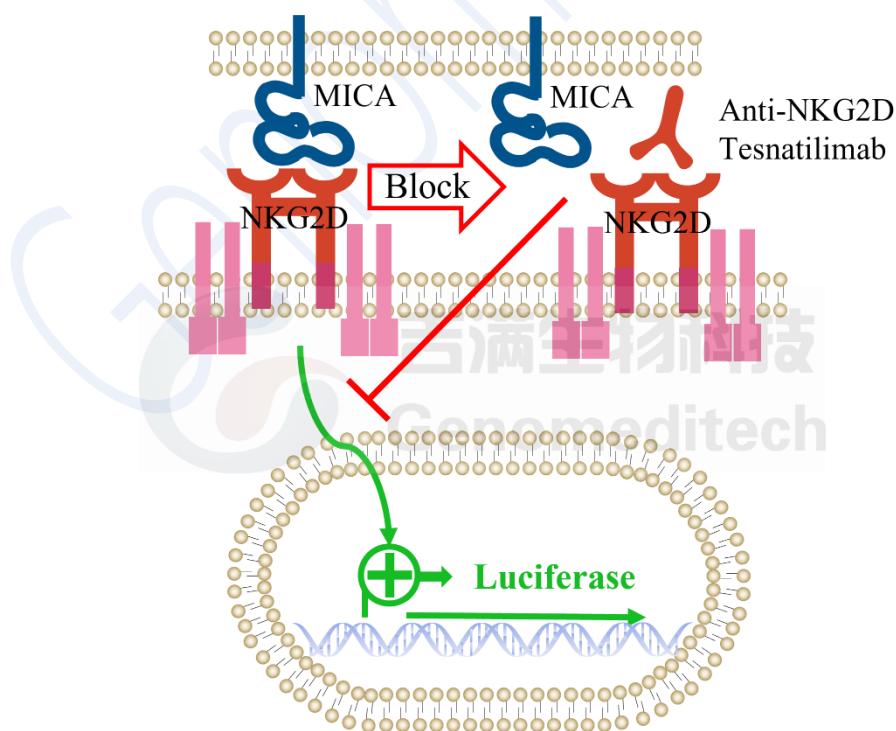


Fig 1.H_NKG2D Blockade 信号通路图

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+0.75 µg/mL Puromycin+3.5 µg/mL Blasticidin+400 µg/mL G418+200 µg/mL Hygromycin
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.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech /GM-040404-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
G418 Sulfate	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
RPMI 1640	500 mL	gibco/C11875500BT/8121699
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C
H_MICA CHO-K1 Cell Line	/	Genomeditech/GM-C22346
Anti-H_KLRK1(NKG2D) Antibody(Tesnatilimab)	hIgG4 /	Genomeditech/GM-28955AB

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 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 5×10^6 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 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。

六、 使用方法

1. 细胞共培养，抗体 block 实验——Tesnatilimab

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐目的细胞 H_NKG2D Blockade Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔，H_MICA CHO-K1 Cell Line 细胞量为 2×10^4 cells/孔。使用 Anti-H_KLRK1(NKG2D) hIgG4 Antibody(Tesnatilimab)(150 kDa; 以下简称为 Tesnatilimab) 作为阳性抗体。起始浓度(Conc.01)为 15 $\mu\text{g/mL}$ ，5 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	Tesnatilimab	PBS	15 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	600 ng/mL	120 ng/mL	24 ng/mL	4.8 ng/mL	960 pg/mL	192 pg/mL	38.4 pg/mL	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_MICA 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 2×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖板上盖，于孵箱中孵育过夜使用。
- 实验前 1-2 h，将 H_NKG2D Blockade Reporter Jurkat Cell Line 细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用适量 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 2×10^6 cells/mL。
- 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）。

e) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Tesnatilimab	1.3 mg/mL	/	直接使用储液

f) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 67.2 μ L

Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 μ L Assay Buffer。

g) 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 1.6 μ L Tesnatilimab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 13.8 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.6 μL Tesnatilimab	加入	67.2 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													

h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 13.8 μ L，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。

i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。

j) 将步骤 b 准备好的 H_NKG2D Blockade Reporter Jurkat Cell Line 细胞取出，加入到步骤 i 的梯度稀释液中，每孔 55 μ L，混匀后孵育 1 h

k) 1 h 后将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出，每孔吸弃 100 μ L 培养基。然后每孔依次加入步骤 j 的细胞抗体混合物 100 μ L。放入培养箱继续孵育 6 h。

l) 使用报告基因试剂检测，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_NKG2D Blockade Reporter Jurkat Cell Line+H_MICA CHO- K1 Cell Line+Tesnatilimab	0 μ g/mL	15 μ g/mL	38.4 pg/mL
	28371	3630	28270

3) 验证结果

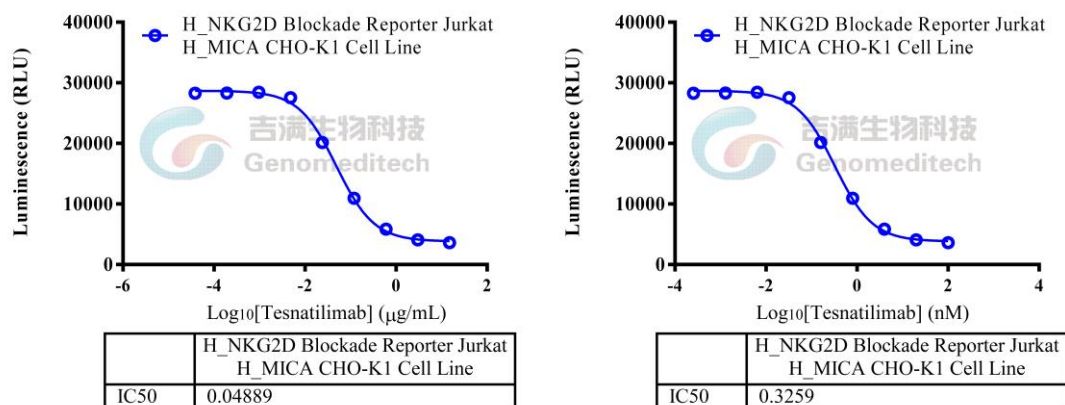


Fig 2. 验证结果
 (右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录1 H_NKG2D Blockade Reporter Jurkat Cell Line 流式结果

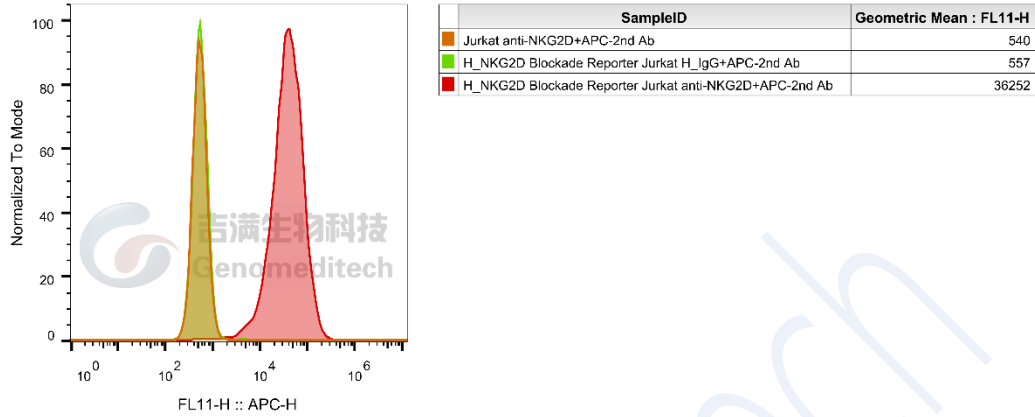


Fig 3. 功能细胞 H_NKG2D Blockade Reporter Jurkat Cell Line 使用 Anti-H_KLRK1(NKG2D) hIgG4 Antibody(Tesnatilimab)(Genomeditech/GM-28955AB)流式验证结果

相关产品

NKG2A:HLA-E	
H_HLA-E HEK-293 Cell Line	H_NKG2A H_CD94 CHO-K1 Cell Line
Anti-H_KLRK1 hIgG4 Antibody(Monalizumab)	Anti-HLA-E hIgG1 Antibody(ABX-0020)
MICA;MICB	
Cynomolgus_MICA(AAO24115) CHO-K1 Cell Line	Cynomolgus_MICA(Q2MGE0-1) CHO-K1 Cell Line
Cynomolgus_MICB CHO-K1 Cell Line	H_MICA CHO-K1 Cell Line
H_MICA HEK-293 Cell Line	H_MICA*001 Luciferase B16-F10 Cell Line
H_MICA*001 MC38 Cell Line	H_MICA*008 CHO-K1 Cell Line
H_MICB CHO-K1 Cell Line	H_MICB HEK-293 Cell Line
Anti-MICA/MICB hIgG1 Antibody(36 NF G236A)	Anti-MICA/MICB mIgG2a Antibody(7C6)
Anti-MICA/MICB mIgG2a Antibody(PDI-01)	
NKG2D	
Cynomolgus_NKG2D CHO-K1 Cell Line	H_NKG2D CHO-K1 Cell Line
H_NKG2D HEK-293 Cell Line	
Anti-H_KLRK1(NKG2D) Antibody(Tesnatilimab)	hIgG4 Anti-NKG2D hIgG1 Antibody(A49MI)

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。