

产品手册

H_BTLA Reporter Cell Line

H_BTLA Reporter 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.8.240524

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.	H_BTLA Reporter Cell Line 细胞复苏.....	6
2.	H_BTLA Reporter Cell Line 细胞传代.....	6
3.	H_BTLA Reporter Cell Line 细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	7
1.	BTLA 拮抗剂阻断 BTLA-HVEM 共培养抑制实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
	使用许可协议:	10
	附录 1 传代稳定性.....	11
	附录 2 BTLA 流式验证结果	12

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-C28122	H_BTLA Reporter Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C28122	H_BTLA Reporter 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. 本产品相关实验，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

B和T淋巴细胞衰减因子(BTLA; CD272)是Ig超家族成员并且是负性调节免疫细胞活化的检查点受体家族的部分。BTLA主要表达于B细胞、T细胞和树突状细胞上。BTLA的天然配体是肿瘤坏死因子受体超家族成员14 (HVEM; TNFRSF14)。

BTLA及HVEM主要通过其在细胞表面的动态表达来调节T细胞和APC的功能。BTLA与配体结合不仅抑制T细胞增殖，下调T细胞活化标志CD25，还可以抑制IFN- γ , IL-2, IL-4, 和IL-10等的产生，但不能诱导细胞凋亡。HVEM与BTLA结合导致T细胞活化和增殖的下调。

吉满生物H_BTLA Reporter Cell Line报告基因细胞系，是基于BTLA-HVEM信号通路构建的一种Luciferase报告基因细胞系。当H_BTLA Reporter 细胞与H_HVEM aAPC CHO细胞 (Genomeditech/GM-C25499) 共培养时，HVEM结合BTLA，招募SHP1，抑制TCR信号，从而抑制了荧光素酶 (Luciferase) 的表达。通过加入Anti-BTLA抗体，阻断BTLA-HVEM结合，恢复TCR信号，荧光素酶 (Luciferase) 正常表达，Luciferase报告基因读值即代表信号通路的激活效果。可用于靶向HVEM或BTLA功能性抗体的活性检测。

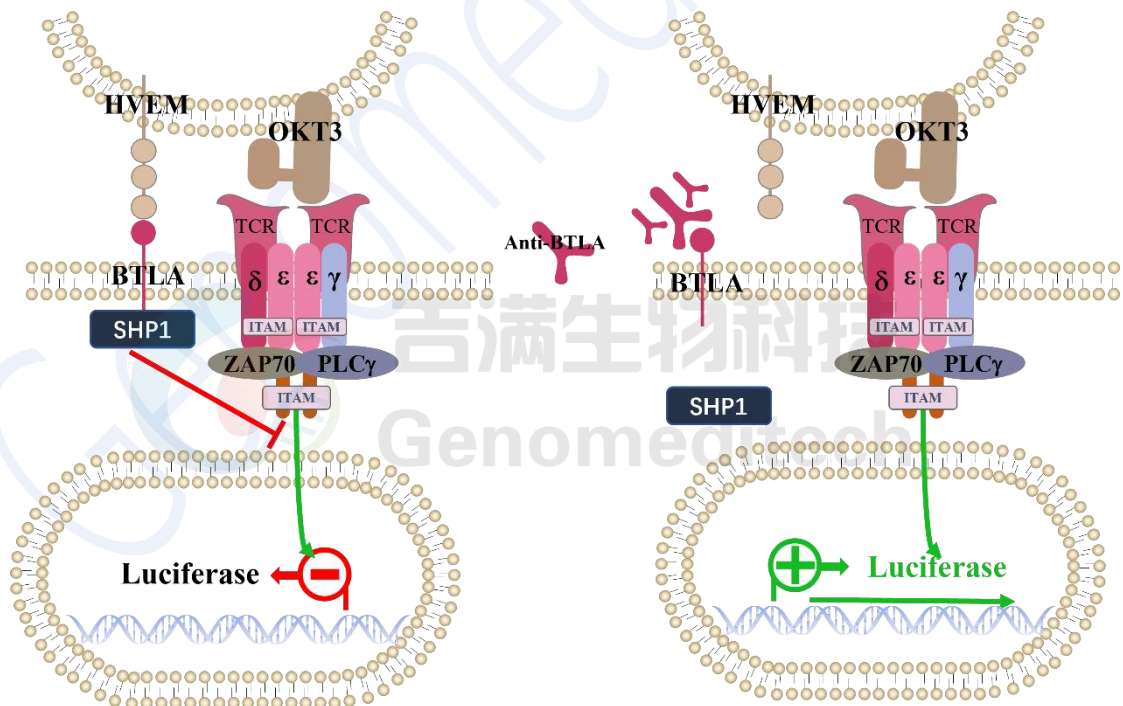


Fig 1.BTLA 原理图

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+200 µg/mL Hygromycin+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.
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
G418 Sulfate	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell BIOSCIENCES/C3010-0500
Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates	96-well	Thermo/42404
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
H_HVEM aAPC CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL	Genomeditech/GM-C25499
Anti-BTLA hIgG4 Antibody(22B3)	/	Genomeditech/GM-50103AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C

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. H_BTLA Reporter Cell Line 细胞复苏

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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. H_BTLA Reporter Cell Line 细胞传代

- 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。
- 注意营养，不处理时务必隔天适当补加培养基。

3. H_BTLA Reporter Cell Line 细胞冻存

- 使用 1000 rpm，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。

六、使用方法

1. BTLA 拮抗剂阻断 BTLA-HVEM 共培养抑制实验

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_BTLA Reporter Cell Line 和 2×10^4 cells/Well 的 H_HVEM aAPC CHO-K1 Cell Line (接种密度)进行实验。

使用 Anti-BTLA hIgG4 Antibody(22B3)(以下简称为 22B3;150 kDa),起始终浓度(Conc.01)为 100 $\mu\text{g/mL}$, 2 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	22B3	PBS	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{g/mL}$	3.13 $\mu\text{g/mL}$	1.56 $\mu\text{g/mL}$	781.25 ng/mL	390.63 ng/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

- 实验前 16 – 24 h, 消化离心收集 H_HVEM aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞, 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密度到 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, 盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h, 离心收集 H_BTLA Reporter 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 H_BTLA Reporter Cell Line 到 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)。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
22B3	2.82 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 102.2 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 μL 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 7.8 μL 22B3），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 55 μL ，加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	7.8 μL 22B3	加入	102.2 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 55 μL ，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_BT LA Reporter Cell Line 细胞取出，向步骤 i 的梯度稀释的抗体孔板中，依次加入 55 μL 细胞（B2-B10），孵育 1 h。
- k) 1 h 后将步骤 a 准备好的 H_HVEM aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞孔板取出，每孔吸弃 90 μL ，然后将步骤 j 孵育好的混合液，吸取 100 μL /孔加入到步骤 a 的细胞孔板中，盖上盖板，继续孵育 7 h。
- l) 使用 GMOne-Step 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_BT LA Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	390.63 ng/mL
	12209	124571	10649

3) 验证结果

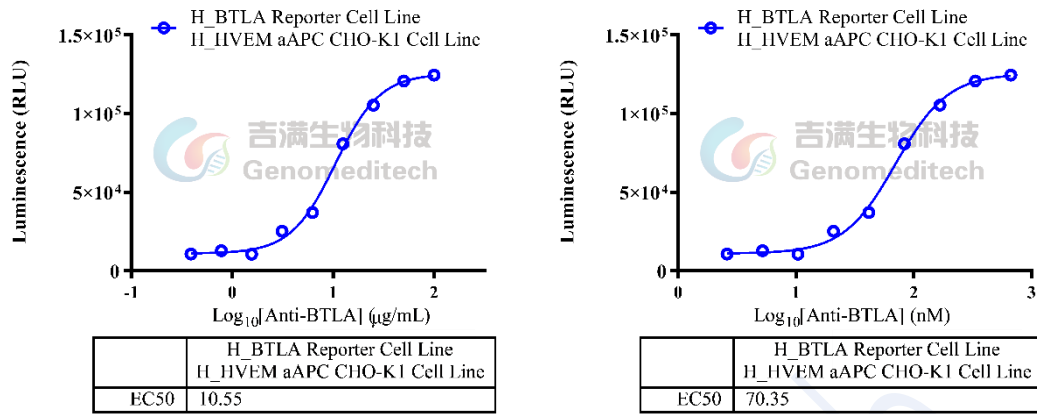


Fig 2. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

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

附录 1 传代稳定性

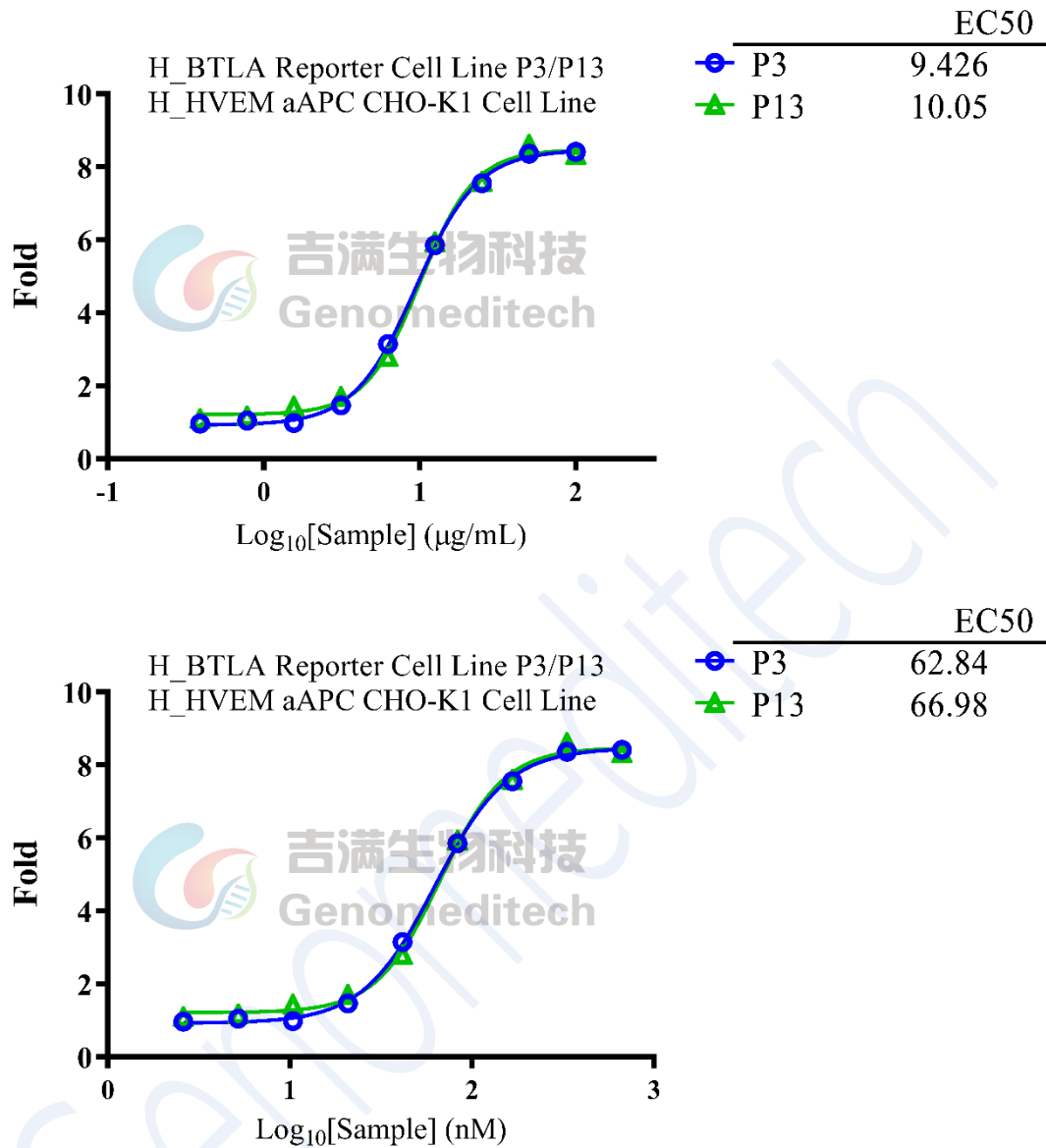


Fig 3. 纵坐标 Luciferase 数值换算成倍率
(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 2 BTLA 流式验证结果

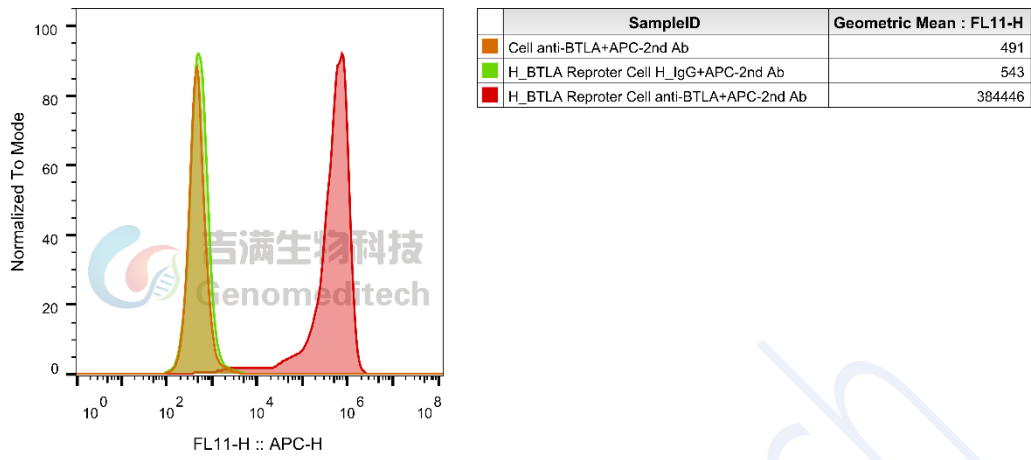


Fig 4. 使用 Anti-BTLA hIgG4 Antibody(22B3) (Genomeditech/GM-50103AB)流式检测结果