

产品手册

H_SIRP α Reporter Jurkat Cell Line

H_SIRP α 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：V2.9.1

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.....	6
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	6
2.	试剂耗材准备.....	6
五、	细胞复苏、传代、冻存.....	7
1.	细胞复苏.....	7
2.	细胞传代.....	7
3.	细胞冻存.....	7
六、	使用方法.....	8
1.	Anti-CD47 阻断 CD47-SIRP α 共培养抑制实验.....	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	10
2.	Anti-H_SIRP α 阻断 CD47-SIRP α 共培养抑制实验.....	10
1)	加样步骤.....	10
2)	报告基因检测.....	12
3)	验证结果.....	12
附录 1:	H_CD47 KO 测序结果.....	13
附录 2:	H_CD47 KO 流式验证结果.....	13
使用许可协议:	14

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-C28270	H_SIRP α 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-C28270	H_SIRP α 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

CD47, 也称为整合素相关蛋白 (IAP), 是一种跨膜蛋白, 由CD47基因编码。它属于免疫球蛋白超家族, 与多种蛋白如整合素、血小板反应蛋白-1 (TSP-1) 和信号调节蛋白 α (Sirp α) 可以相互作用。CD47蛋白的结构包括胞外N端IgV结构域、5个跨膜域和胞内C末端的胞质尾区, 该蛋白广泛表达于几乎所有的正常细胞表面。

SIRP α 是SIRP家族中的一种调节膜糖蛋白, 主要表达于巨噬细胞、树突状细胞和神经细胞表面。作为抑制受体, Sirp α 与CD47相互作用, 释放“别吃我”信号, 从而抑制巨噬细胞的吞噬作用。一些肿瘤细胞也会高表达CD47以实现免疫逃逸。在人类、大鼠和小鼠中, SIRP α 的细胞质区域高度保守, 含有多个酪氨酸残基ITIM。与CD47结合时, SIRP α 会被磷酸化, 并招募SHP1和SHP2, 传递细胞内信号。

吉满生物H_SIRP α Reporter Jurkat Cell Line报告基因细胞系, 是基于CD47-SIRP α 信号通路构建的一种Luciferase报告基因细胞系。当H_SIRP α Reporter Jurkat细胞与H_CD47 aAPC CHO-K1 (Genomeditech/GM-C13353) 共培养时, CD47结合SIRP α , 招募SHP1/2, 抑制TCR信号, 从而抑制了荧光素酶 (Luciferase) 的表达。通过加入Anti-CD47或Anti-H_SIRP α 抗体, 阻断CD47与SIRP α 结合, 恢复TCR信号, 荧光素酶 (Luciferase) 正常表达。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。

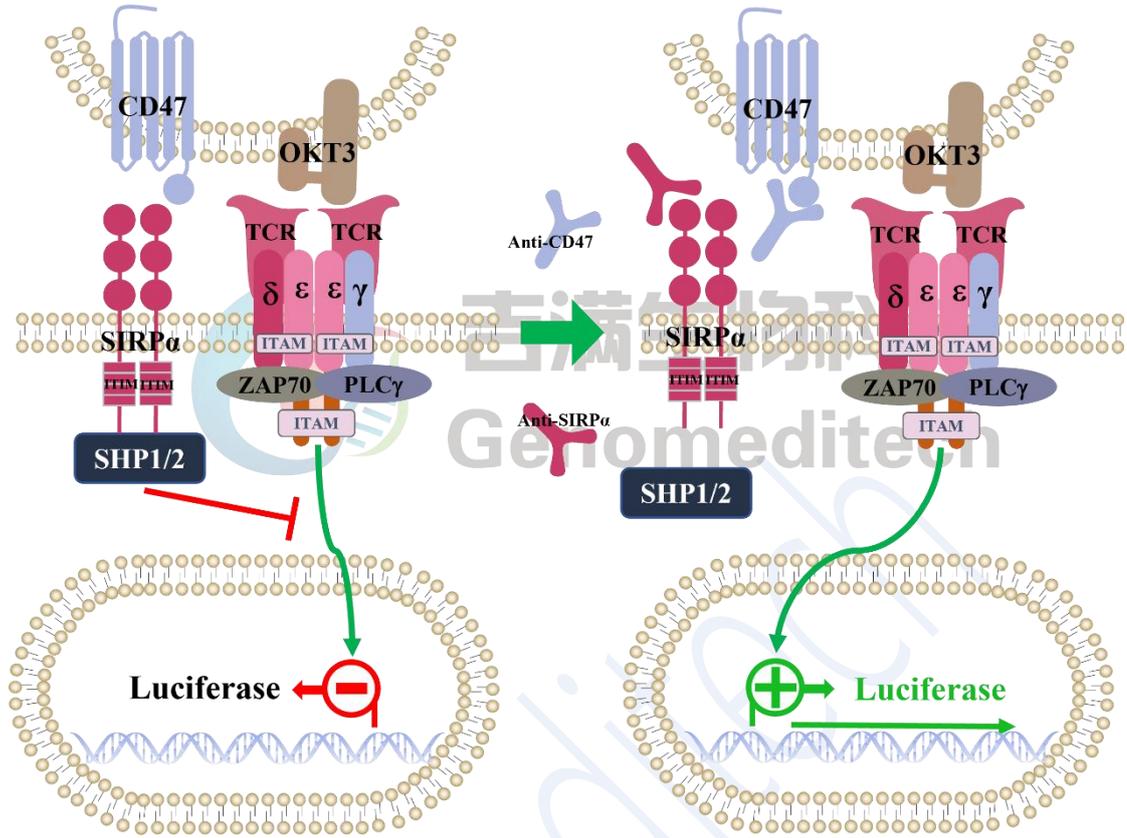


Fig 1. 信号原理图

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+200 µg/mL Hygromycin+0.75 µg/mL Puromycin+400 µg/mL Zeocin
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
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Zeocin	100 mg	Genomeditech/GM-040407-100MG
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
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
H_CD47 aAPC CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL	Genomeditech/GM-C13353
Anti-CD47 hIgG4 Antibody(5F9)	/	Genomeditech/GM-27657AB
Anti-H_SIRPα hIgG1 Antibody(Hu1H9-G1)	/	Genomeditech/GM-49522AB
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. 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 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 × 10⁵ 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 × 10⁶ 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 × 10⁶ cells/mL, 1 传 3, 隔 2-3 天继续传代,不要让其密度超 2 × 10⁶ 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,细胞增值相对缓慢。

六、使用方法

1. Anti-CD47 阻断 CD47-SIRP α 共培养抑制实验

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_SIRP α Reporter Jurkat Cell Line 和 1×10^4 cells/Well 的 H_CD47 aAPC CHO-K1 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-CD47 hIgG4 Antibody(5F9) (以下简称为 Anti-CD47;150 kDa), 起始终浓度 (Conc.01) 为 100 $\mu\text{g/mL}$, 3 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	Anti-CD47	100 $\mu\text{g/mL}$	33.33 $\mu\text{g/mL}$	11.11 $\mu\text{g/mL}$	3.7 $\mu\text{g/mL}$	1.23 $\mu\text{g/mL}$	411.52 ng/mL	137.17 ng/mL	45.72 ng/mL	15.24 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_CD47 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞, 以完全培养基重悬细胞, 计算细胞密度及活力, 通过补加完全培养基的方式, 调整细胞密度到 1×10^5 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, 于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h, 离心收集 H_SIRP α Reporter Jurkat 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_SIRP α Reporter Jurkat Cell Line 到 2×10^6 cells/mL, 待用。
- 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
Anti-CD47	2.91 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 76.83 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 5.67 μL Anti-CD47），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 27.5 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	5.67 μL Anti-CD47	加入	76.83 μL	55 μL									
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5 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 a 准备好的 H_CD47 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞取出，每孔吸弃 100 μL 上清；然后加入步骤 i 梯度稀释的抗体，每孔加入 50 μL ，孵育 1 h。
- k) 1 h 后再加入步骤 b 准备好的 H_SIRP α Reporter Jurkat Cell Line 细胞，每孔加入 50 μL ，盖上盖板，继续孵育 16 h。
- l) 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_SIRP α Reporter Jurkat Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15.24 ng/mL
	1027	11902	967

3) 验证结果

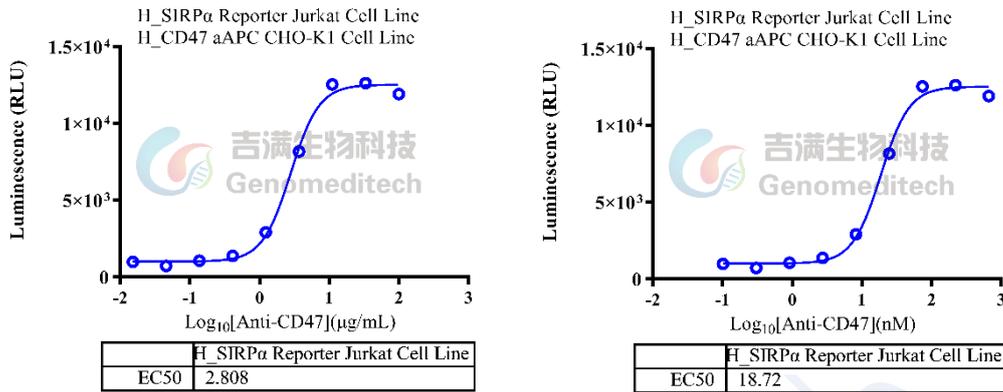


Fig 2. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

2. Anti-H_SIRPα 阻断 CD47-SIRPα 共培养抑制实验

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_SIRPα Reporter Jurkat Cell Line 和 1×10^4 cells/Well 的 H_CD47 aAPC CHO-K1 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-H_SIRPα hIgG1 Antibody(Hu1H9-G1) (以下简称为 Anti-H_SIRPα; 150 kDa), 起始浓度(Conc.01)为 100 µg/mL, 3 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排在 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	Anti-H_SIRPα	100 µg/mL	33.33 µg/mL	11.11 µg/mL	3.7 µg/mL	1.23 µg/mL	411.52 ng/mL	137.17 ng/mL	45.72 ng/mL	15.24 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_CD47 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞, 以完全培养基重悬细胞, 计算细胞密度及活力, 通过补加完全培养基的方式, 调整细胞密度到 1×10^5

cells/mL，以排枪加 100 μ L 细胞/孔至中间孔，周围的孔加 100 μ L PBS，盖板上盖，于孵箱中孵育过夜。

- b) 实验前 1-2 h，离心收集 H_SIRP α Reporter Jurkat 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_SIRP α Reporter Jurkat Cell Line 到 2×10^6 cells/mL，待用。
- c) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- d) 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
Anti-H_SIRP α	1.43 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 70.96 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 11.54 μ L Anti-H_SIRP α ），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 27.5 μ L，加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	11.54 μ L Anti-H_SIRP α	加入	70.96 μ L	55 μ L								
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5 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_SIRP α Reporter Jurkat Cell Line 细胞取出，加入到步骤 i 的梯度稀释的抗体孔板中，每孔 55 μ L，孵育 1 h。

- k) 1 h 后, 将步骤 a 准备好的 H_CD47 aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞孔板取出, 吸弃上清 100 μ L; 然后加入步骤 j 孵育好的混合液, 每孔加 100 μ L; 盖上盖板, 继续孵育 16 h。
- l) 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_SIRP α Reporter Jurkat Cell Line	0 μ g/mL	100 μ g/mL	15.24 ng/mL
	1352	23801	1154

3) 验证结果

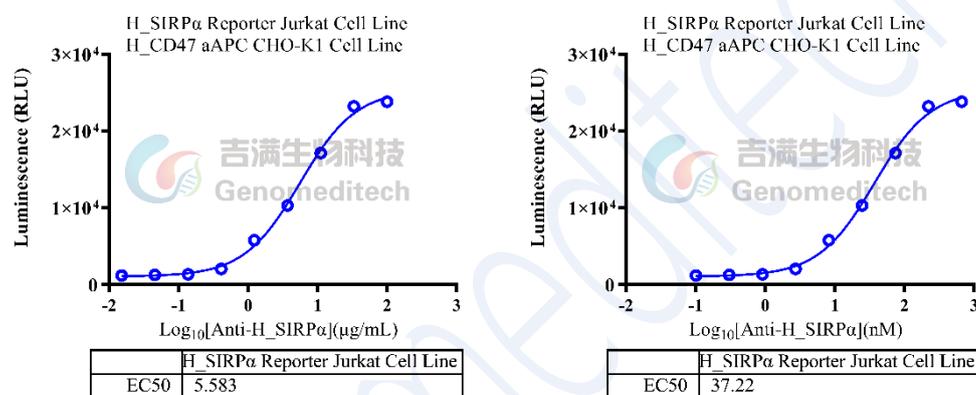


Fig 3. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1: H_CD47 KO 测序结果

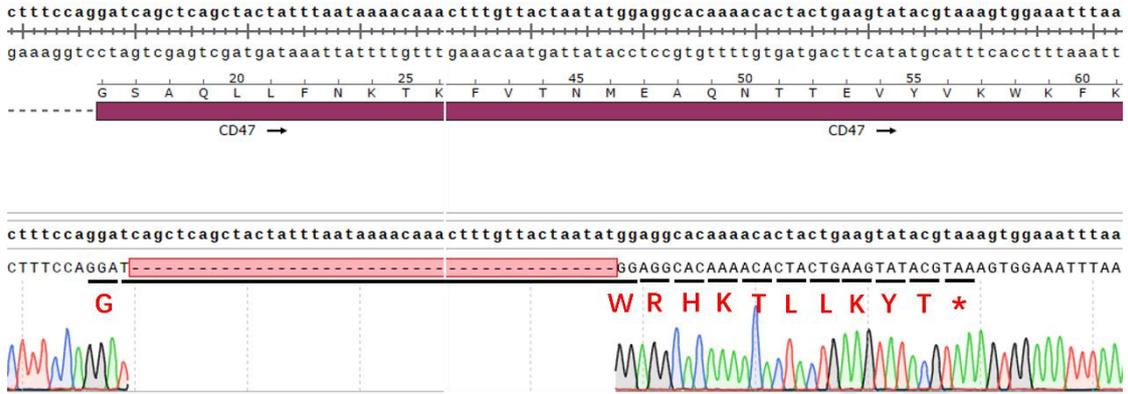


Fig 4. 母细胞 H_CD47 KO 测序验证结果

附录 2: H_CD47 KO 流式验证结果

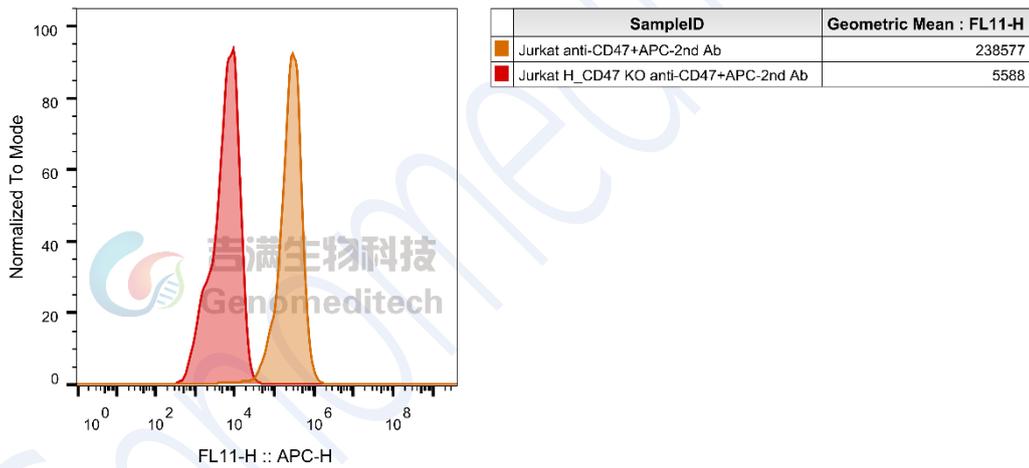


Fig 5. 母细胞 H_CD47 KO 流式验证结果

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