

产品手册

H_NKp30 Reporter Jurkat Cell Line

H_NKp30 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：V2.9.2

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.	激活验证实验——包被激活.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
附录一	H_NKp30 Reporter Jurkat Cell Line 流式验证结果.....	10
附录二	H_NKp30 Reporter Jurkat Cell Line 传代稳定性.....	11
使用许可协议:	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-C29776	H_NKp30 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-C29776	H_NKp30 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

自然杀伤 (NK) 细胞是先天免疫系统的重要组成部分。在目前已知的四种天然细胞毒性受体中，三种在NK细胞中组成型表达 (NKp30、NKp46和NKp80)，而NKp44仅存在于活化的NK细胞表面。NKp30，在几乎所有人类NK细胞上都有表达。该NCR已被证明通过促进未成熟DC的成熟和细胞毒性在NK细胞和树突细胞 (DC) 之间的串扰中发挥重要作用。当NKp30与激动剂抗体或配体结合后，会将强烈的激活信号转导给细胞，NCR的信号转导通过NKp30中的FcεRIγ和CD3ζ的ITAM基序发生。

吉满生物H_NKp30 Reporter Jurkat Cell Line报告基因细胞系，是经工程改造稳定表达NKp30、FcεRIγ、Luciferase的Jurkat细胞系。通过加入包被的NKp30激动剂抗体，刺激NKp30与CD3ζ和FcεRIγ结合，激活下游信号，从而激活荧光素酶 (Luciferase) 的表达。

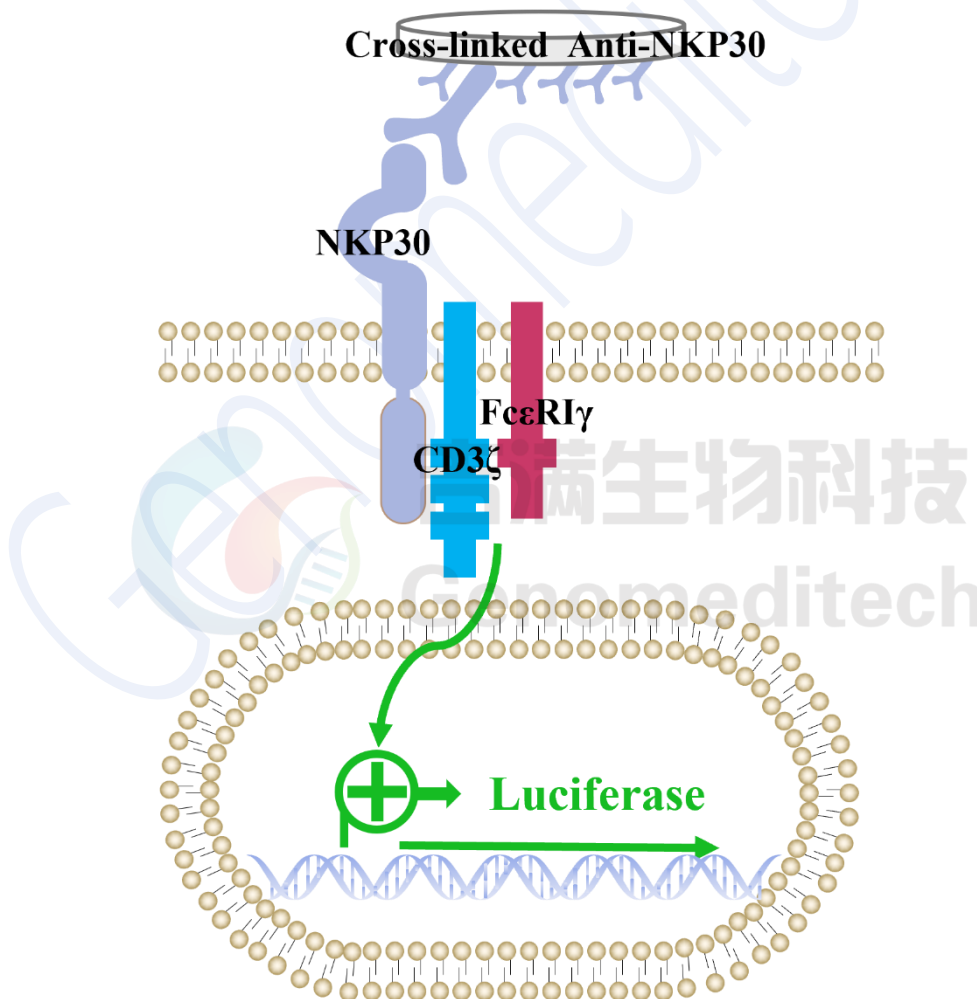


Fig 1.NKp30 原理图

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+0.75 µg/mL Puromycin+400 µg/mL G418+3.5 µg/mL Blasticidin
细胞冻存培养基:	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
G418 Sulfate	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	德国 Cegrogen/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Vivacell/C3010-0500
Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates	96-well	Thermo/442404
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Anti-NKP30 hIgG1 Antibody(BGA-1833)	/	Genomeditech/GM-49311AB
Anti-NKP30 hIgG1 Antibody(BJM-0411)	/	Genomeditech/GM-59269AB
Human IgG1 Isotype Control(Anti-RSV)	/	Genomeditech/GM-47471AB
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
流式细胞仪	贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司/CytoFLEX

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 $4-6 \times 10^5$ 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 × 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。

六、使用方法

1. 激活验证实验——包被激活

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_NKp30 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Anti-NKP30 hIgG1 Antibody(BGA-1833) (150 kDa; 以下简称为 BGA-1833) 和 Anti-NKP30 hIgG1 Antibody(BJM-0411) (150 kDa; 以下简称为 BJM-0411) 作为阳性药物，Human IgG1 Isotype Control(Anti-RSV) (150 kDa; 以下简称为 IgG Antibody) 作为阴性对照。以 BGA-1833 为例，Conc.01 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，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	BGA-1833	PBS	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	16.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$	617.28 ng/mL	205.76 ng/mL	68.59 ng/mL	22.86 ng/mL	7.62 ng/mL	0	PBS
C	BJM-0411	PBS	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	16.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$	617.28 ng/mL	205.76 ng/mL	68.59 ng/mL	22.86 ng/mL	7.62 ng/mL	0	PBS
D	IgG Antibody	PBS	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	16.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$	617.28 ng/mL	205.76 ng/mL	68.59 ng/mL	22.86 ng/mL	7.62 ng/mL	0	PBS
E		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 第一天，使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
BGA-1833	3.82 mg/mL	/	直接使用储液
BJM-0411	3.354 mg/mL	/	直接使用储液
IgG Antibody	5 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中，加入包被液（15 mM Na_2CO_3 ，35 mM NaHCO_3 ，pH 9.6），各孔体积见下表，如 B2 孔加入 162.8 μL 包被液，B3-B11 孔，加入 110 μL 包被液。
- 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，混匀。

- f) 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。
- g) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。

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	2.2 μL BGA-1833	加入	162.8 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	
C	2.5 μL BJM-0411	加入	162.5 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	
D	1.65 μL IgG Antibody	加入	163.35 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	
E													
F													
G													
H													

- h) 准备一个 96 孔高结合板，紫外灭菌 15 min。将梯度稀释液加入到高结合板中，100 μL 每孔，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后使用。
- i) 第二天，在实验前 1 h，将 H_NKp30 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 h 包被过夜的孔板取出，Assay Buffer 润洗 2 遍后，加入步骤 i 准备好的细胞悬液，每孔 100 μL 。
- k) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养 16 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_NKp30 Reporter Jurkat Cell Line+BGA-1833	0 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	7.62 ng/mL
	12730	1169300	9769
H_NKp30 Reporter Jurkat Cell Line+BJM-0411	0 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	7.62 ng/mL
	10331	1313288	11590
H_NKp30 Reporter Jurkat Cell Line+IgG Antibody	0 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	7.62 ng/mL
	10353	9675	9258

3) 验证结果

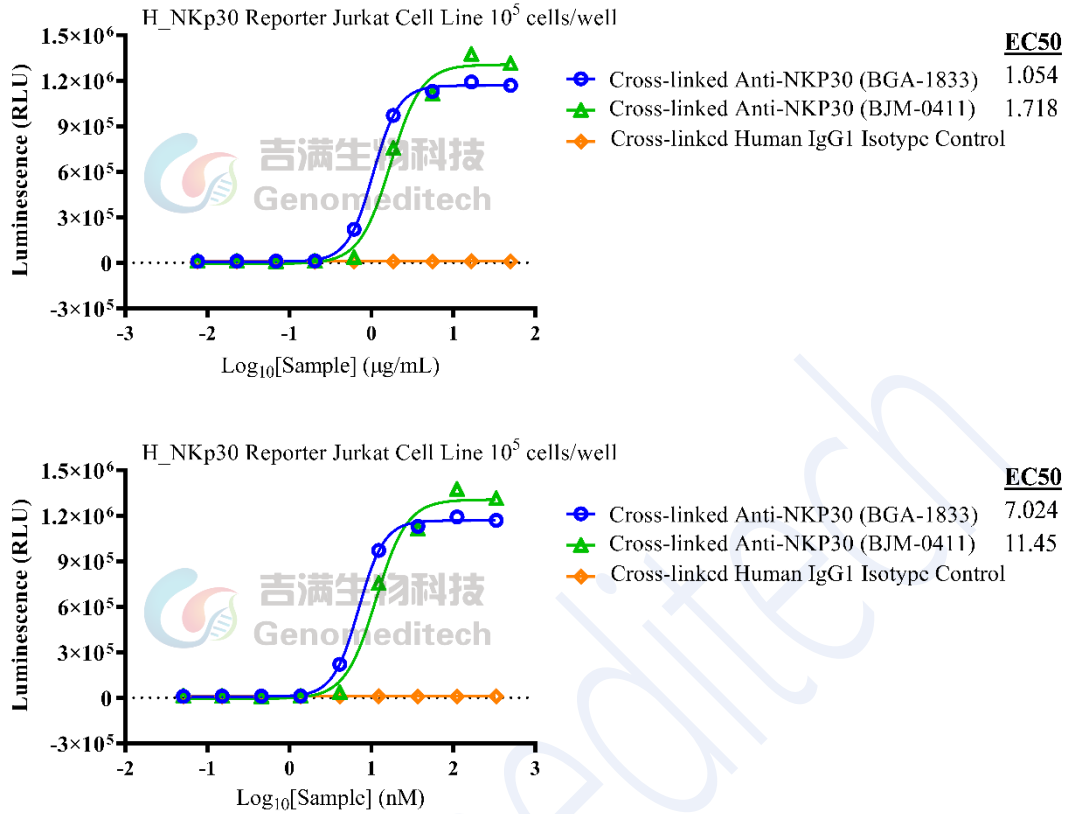


Fig 2.功能验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录一 H_NKp30 Reporter Jurkat Cell Line 流式验证结果

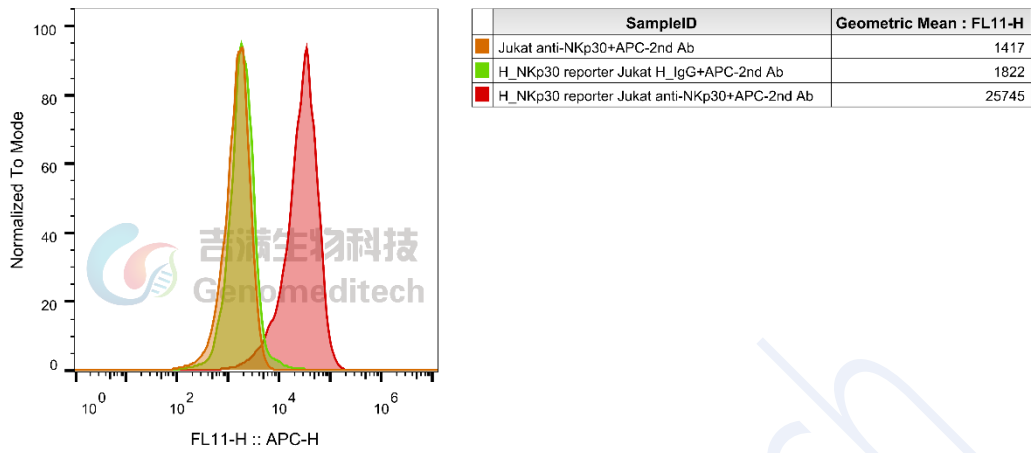


Fig 3. 使用 Anti-NKP30 hIgG1 Antibody(BGA-1833) (Genomeditech/GM-49311AB)流式验证
 H_NKP30 过表达结果

附录二 H_NKp30 Reporter Jurkat Cell Line 传代稳定性

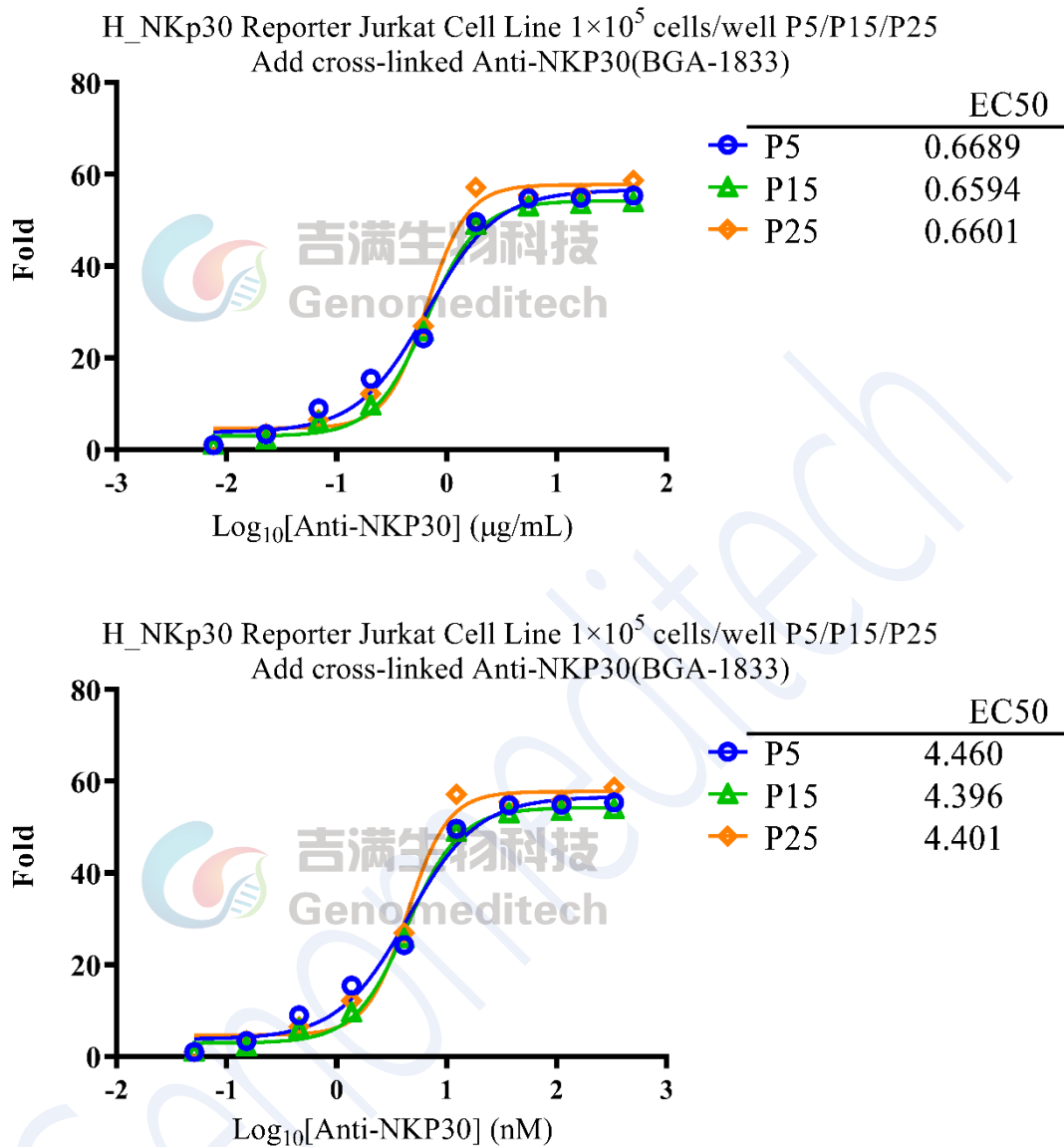


Fig 4. 5代、15代与25代细胞功能验证结果，抗体使用 49311AB: Anti-NKP30 hIgG1 Antibody(BGA-1833)

(纵坐标 luciferase 值换算为倍率，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