

产品手册

ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter NK-92 Cell Line

ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter NK-92 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（示例）	7
1.	Assay 验证实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	9
附录：	流式验证结果	10
使用许可协议：		10

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-C34558	ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter NK-92 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C34558	ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter NK-92 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

ADCC 即抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 是指表达 Fc 受体的免疫细胞通过识别抗体的 Fc 段直接杀伤与抗体特异性结合的靶细胞的作用。现如今, ADCC 作用机制被用来检测、评定抗体或靶细胞的功效。抗体与细胞表面上的目标抗原结合。如果抗体的 Fc 段同时结合到效应细胞 (主要为自然杀伤细胞, natural killer cells) 表面的 Fc γ RIIIa 受体上, 两种类型的细胞即发生多重交联, 导致 ADCC 作用机制通路的激活。靶细胞的杀伤是此活化途径的终点, 这一指标被用在经典的 ADCC 生物活性检测中, 这些经典的检测方法利用供者的外周血单核细胞 (PBMC) 或自然杀伤 (NK) 细胞亚群作为效应细胞。这些细胞的应答变异性很大, 难于制备, 并容易引起很高的背景读数。

吉满生物的 ADCC Fc γ RIIIa(158V) Reporter NK-92 细胞系是在 NK-92 细胞基础上, 稳定表达高亲和力 Fc γ RIIIa (158V) 及萤火虫萤光素酶报告基因。当抗体结合靶细胞后, 该受体介导信号传导, 激活报告基因表达并产生可被定量检测的发光信号, 从而灵敏、标准化地评估抗体介导的 ADCC 效应。

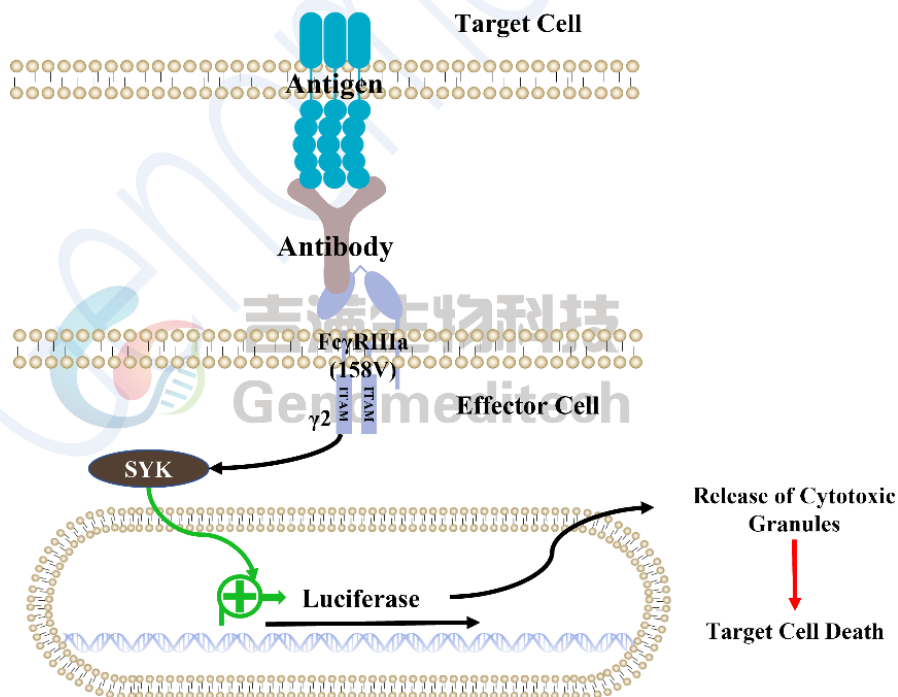


Fig 1. ADCC 原理示意图

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:	NK-92 细胞专用培养基 (含有 100U/mL IL-2)
细胞生长培养基:	NK-92 细胞专用培养基 (含有 100U/mL IL-2)
细胞冻存液:	90% FBS + 10% DMSO
Assay Buffer:	NK-92 细胞专用培养基 (含有 100U/mL IL-2)

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
NK-92 细胞专用培养基	125 mL × 4	Procell/CM-0530
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
H_CLDN18.2(isoform2) CHO-K1 Cell Line	1 管 (5E6 Cell/mL)	Genomeditech/GM-C05273
Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody(Zolbetuximab)	/	Genomeditech/GM-34137AB
PE anti-human CD16 Antibody	25 tests	Biologend/302007
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	/	Genomeditech/GM-040513

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 5 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 $\geq 4 \times 10^6$ 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 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

- 此细胞为淋巴细胞状，悬浮生长且聚团。
- 细胞较难复苏，复苏初期细胞生长缓慢(一周左右)，会有部分细胞破碎，出现大量死细胞和死细胞碎片，培养两周后有所好转。建议每 1-2 周 $176 \times g$ ，离心 5 min，弃上清，去除部分细胞碎片和颗粒，更换新鲜复苏培养基。首次复苏，若 48 h 不传代，适当补加复苏培养基。
- 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。
- 细胞除首次传代需离心收集细胞，后续细胞换液或传代时建议使用[半换液法]，即细胞自然沉降，弃去一半旧培养液，直接向培养瓶中添加等体积的新鲜培养液，然后将细胞吹打均匀或移入两个新的 T25 培养瓶中（1:2 传代），补充新的完全培养基至 8-10 mL/瓶。

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。
- 细胞生长对 IL-2 高度依赖，若培养液中缺少 IL-2，很容易死亡。IL-2 请提前分装避免反复冻融降低效价；
- IL-2 在含血清的完全培养基中，活性会随时间下降。预配的“含 IL-2 完全培养基”尽量在 1 周内使用完。
- 细胞生长状态呈现细胞聚团生长。细胞在培养过程中细胞碎片多、颗粒多是正常现象。当细胞密度较大或者培养液变黄时，需要及时半换液或者完全换液。在换液过程中尽量冲散细胞。

六、 使用方法（示例）

1. Assay 验证实验

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 ADCC FcγRIIIa(158V) Reporter NK-92 Cell Line 和 1×10^4 cells/Well 的 H_CLDN18.2(isoform2) CHO-K1 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody(Zolbetuximab)(150kDa; 以下简称 Zolbetuximab), 起始浓度 (Conc.01) 为 30 μg/mL, 4 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	Zolbetuximab	PBS	30 μg/mL	7.50 μg/mL	1.88 μg/mL	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.30 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 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

- 实验前 16 – 24 h, 消化离心收集 H_CLDN18.2(isoform2) 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, 盖上班盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 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

药物名称	储液	母液	配置方法
Zolbetuximab	2.5 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 80 μL Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 60 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 1.97 μL Zolbetuximab），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 20 μL，加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
												
1.97 μL Zolbetuximab	加入	80 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	

- h) 从第一个稀释孔 B2 中吸取 20 μL ，加入到第二个稀释孔 B3，充分混匀。
- i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- e) 实验前 1-2 h，离心收集 ADCC Fc γ RIIIa(158V) Reporter NK-92 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 ADCC Fc γ RIIIa(158V) Reporter NK-92 Cell Line 到 2×10^6 cells/mL，待用。
- j) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。然后加入步骤 i 准备好的溶液，每孔各 50 μL 。
- k) 再加入步骤 e 准备好的 ADCC Fc γ RIIIa(158V) Reporter NK-92 细胞，每孔各 50 μL 。
- l) 盖上板盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- m) 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。

ADCC Fc γ RIIIa(158V) Reporter	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	457.76 pg/mL
NK-92 Cell Line	765183	15032414	811737

3) 验证结果

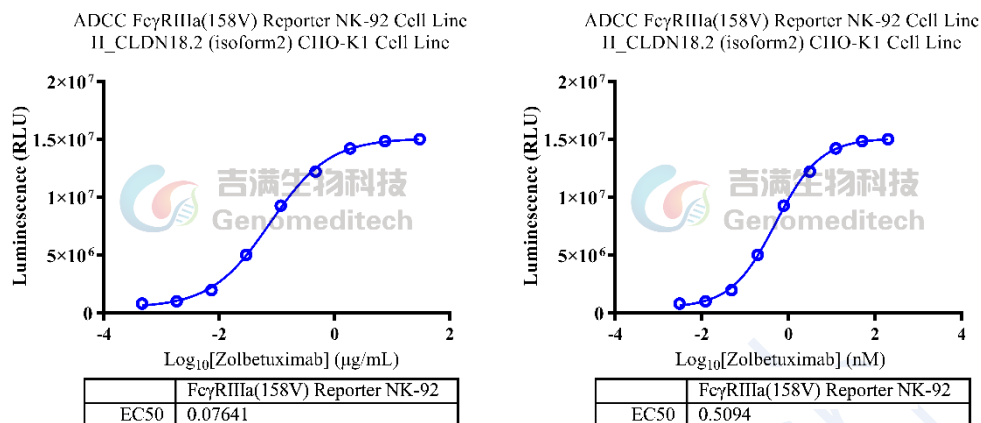


Fig 2. 验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

附录：流式验证结果

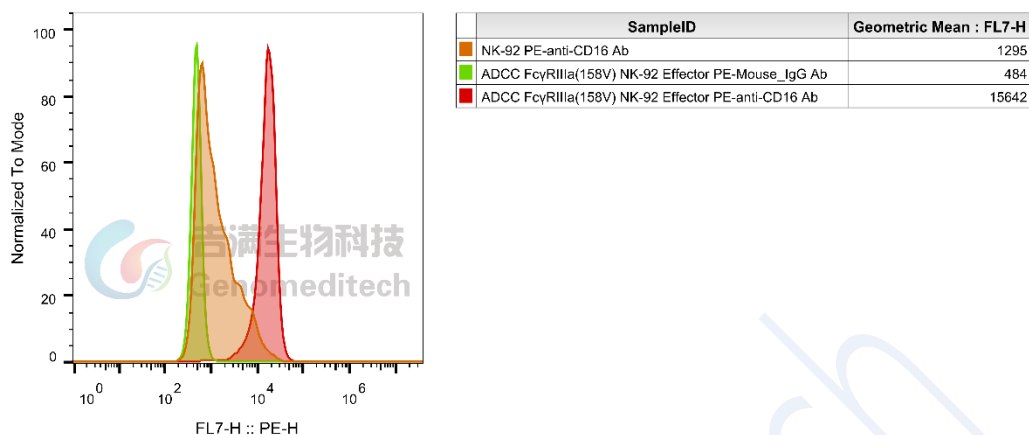


Fig 3. 使用 PE anti-human CD16 Antibody (Biolegend/302007)抗体流式验证结果

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。