

产品手册

CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat(CD58 KO) Cell Line

CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat(CD58 KO)细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.1

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	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.	激活剂验证实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	9
	附录 1 流式检测结果	10
	附录 2 流式检测结果	10
	附录 3 Sanger 测序结果	12
	相关产品	13
	使用许可协议:	13

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-C39956	CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat(CD58 KO) Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C39956	CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat(CD58 KO) 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

CD3 和 CD2 是免疫系统中重要的表面标志分子，主要分布于不同类型的淋巴细胞。CD3 是 T 细胞受体复合物（TCR complex）的核心组成部分，介导 T 细胞的活化和信号转导；CD2 则广泛存在于 T 细胞和自然杀伤细胞（NK 细胞）表面，参与细胞间黏附及协同刺激，进一步增强 T 细胞的免疫应答。两者的协同作用对于调控 T 细胞功能、清除异常细胞和维持免疫稳态都具有重要意义。因此，CD3 和 CD2 也成为近年来免疫治疗药物设计的重要靶点。以诺华公司研发的三特异性抗体 PIT565 为代表，该抗体可同时结合 T 细胞表面的 CD3 和 CD2 以及 B 细胞表面的 CD19。通过将 T 细胞定向招募并激活至致病性 B 细胞周围，PIT565 能够高效且特异性地清除异常 B 细胞，从而有效纠正自身免疫性疾病中免疫功能的异常，目前在系统性红斑狼疮、类风湿关节炎等以 B 细胞异常活跃为特征的自身免疫性疾病领域展现出广阔应用前景。

针对三特异性抗体的药效筛选和体外功能验证需求，吉满生物构建的 CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat(CD58 KO) Cell Line 是在 Jurkat 细胞中稳定整合含有 TCR 下游转录因子结合位点的荧光素酶（Luciferase）报告基因，同时还敲除了内源 CD58 基因。该细胞系的报告基因仅在 CD3 和 CD2 通路被激活时表达，Luciferase 信号强度可直接反映信号通路的激活效果。因此，该模型为 CD3-CD2-tsAb 三特异性抗体药物的体外功能评价和作用机制研究提供了高灵敏度、高特异性的检测平台。

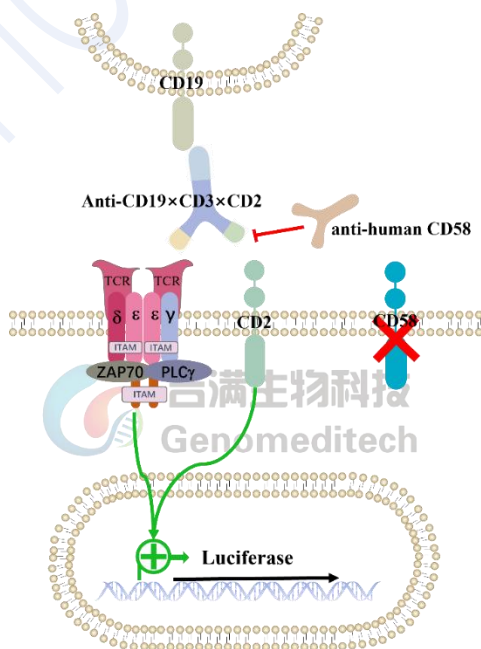


Fig 1. 原理示意图

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:	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
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
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_CD19 CHO-K1 Cell line	1 管 (5E6 Cell/mL)	Genomeditech/GM-C19025
Anti-CD19×CD3×CD2 hIgG1 Reference Antibody(PIT-565)	/	Genomeditech/GM-87914MAB
Purified anti-human CD58 (LFA-3) Antibody	100 µg	Biolegend/330902
Anti-CD3 hIgG1 Antibody(CH2527)	/	Genomeditech/GM-33037AB
Anti-CD2 hIgG1 Antibody(BTI-322)	/	Genomeditech/GM-79929AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C

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. 激活剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat(CD58 KO) Cell Line 细胞量为 1×10^5 Cells/孔。H_CD19 CHO-K1 Cell line 细胞量为 1×10^4 Cells/孔。

本次实验使用 Anti-CD19×CD3×CD2 hIgG1 Reference Antibody(PIT-565)（以下简称 Anti-CD19×CD3×CD2；分子量约 137 KDa）作为阳性药物，Anti-CD19×CD3×CD2 起始终浓度(Conc.01)为 100 µg/mL，4 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-CD19×CD3×CD2	100 µg/mL	25 µg/mL	6.25 µg/mL	1.56 µg/mL	390.63 ng/mL	97.66 ng/mL	24.41 ng/mL	6.10 ng/mL	1.53 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

- 在实验前 16-24 h，将 H_CD19 CHO-K1 Cell line 细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用完全培养基重悬，检测细胞活力并计数，再以完全培养基调整细胞浓度为 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。
- 实验前在实验前 1-2 h，离心收集 CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat(CD58 KO) Cell Line，以 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，调整细胞浓度为 2×10^6 cells/mL。于孵箱中孵育使用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B 行）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-CD19×CD3×CD2	4 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 80 μ L Assay Buffer，B2-B12，加入 60 μ L Assay Buffer。
- g) 吸取不同体积的待测样品，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2 中加入 4.21 μ L Anti-CD19×CD3×CD2），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 20 μ L，加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
												
4.21 μ L Anti- CD19 $\times$ CD3 $\times$ CD2	加 入	80 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	

- h) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 20 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 a 孵育过夜的 H_CD19 CHO-K1 Cell line 细胞孔板取出，吸弃上清。
- k) 先加入步骤 b 准备好的 CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat(CD58 KO)细胞溶液，每孔 50 μ L。然后在分别加入步骤 i 准备好的梯度稀释液，每孔 50 μ L。
- l) 盖上板盖，于 37 $^{\circ}$ 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。

CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat(CD58 KO) Cell Line + H_CD19 CHO-K1 Cell line	0 μ g/mL Anti- CD19×CD3×CD2	100 μ g/mL Anti- CD19×CD3×CD2	1.53 ng/mL Anti- CD19×CD3×CD2
	370	20521	4333

3) 验证结果

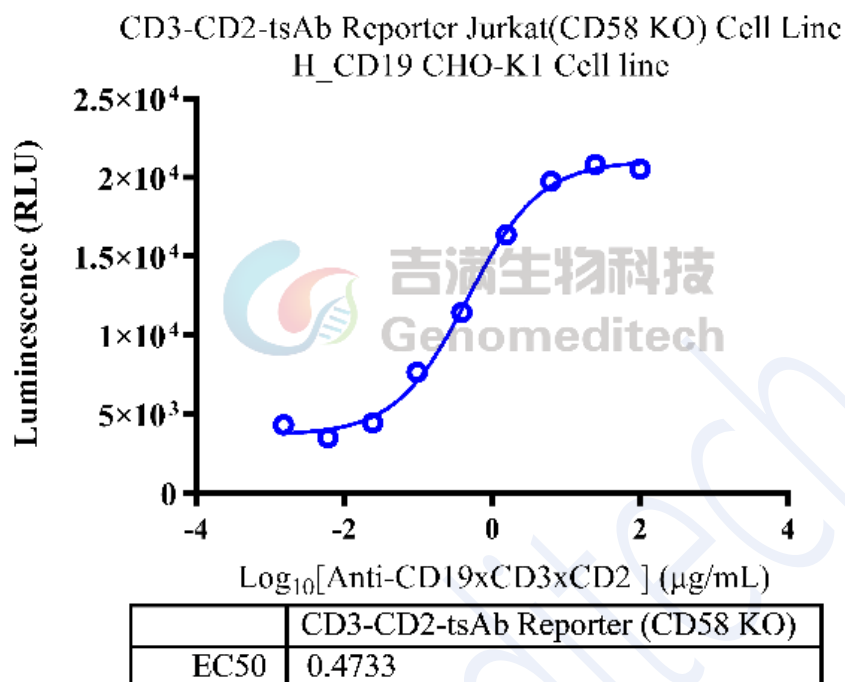


Fig 2. 激活验证结果

附录 1 流式检测结果

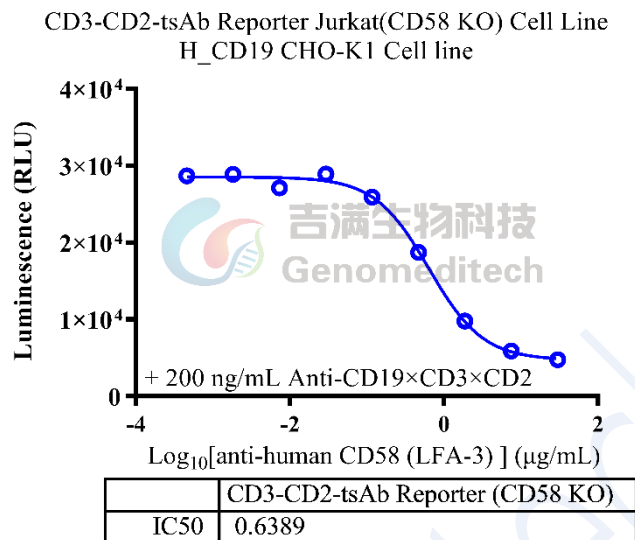


Fig 3. 抗人 CD58 (LFA-3) 抗体的阻断实验结果。制备 Purified anti-human CD58 (LFA-3) Antibody (Biolegend/330902) 梯度稀释液；提前 16-24 h 配置 H_CD19 CHO-K1 Cell line (Cat. GM-C19025)，细胞量 1×10^4 个/孔。次日，将不同梯度稀释的抗人 CD58 (LFA-3) 抗体 (BioLegend/330902) 与 20 ng/孔的 Anti-CD19 $\times$ CD3 $\times$ CD2 三特异性抗体 (Cat. GM-87914MAB) 共同孵育 1 小时。随后，将混合物与 CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat (CD58 KO) Cell Line (Cat. GM-C39956) 一起加入至预先铺板的细胞中，继续孵育 6 小时。之后，使用 GMPOne-Step 2.0 荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Cat. GM-040513) 测定萤火虫荧光素酶活性。

附录 2 流式检测结果

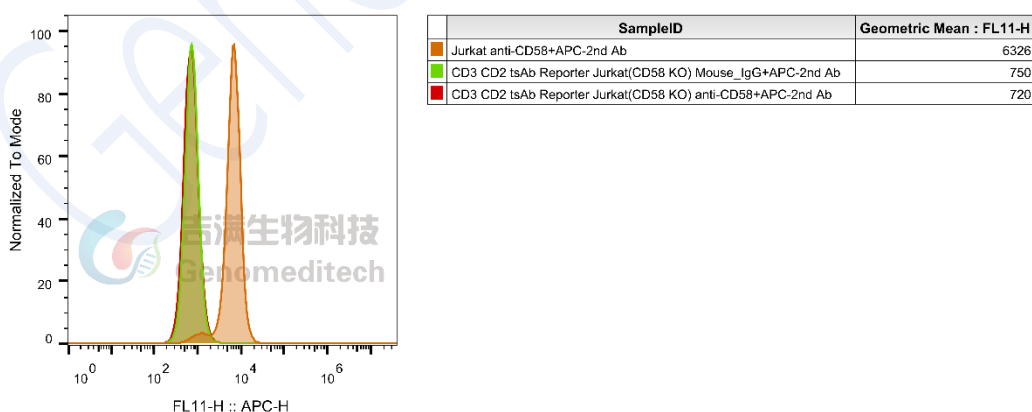


Fig 4. 使用 Purified anti-human CD58 (LFA-3) Antibody (Biolegend/330902) 抗体流式验证 CD58 敲除结果

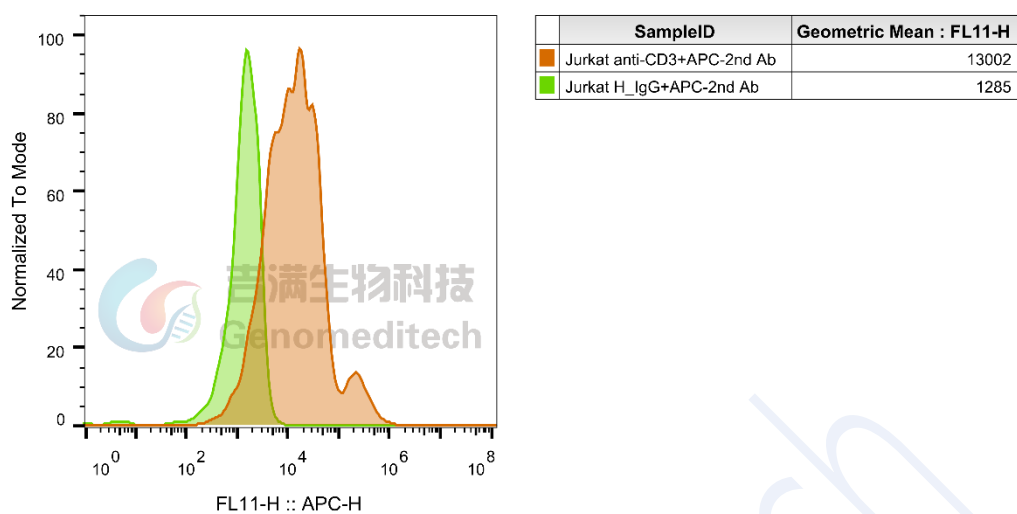


Fig 5. Jurkat Cell Line 使用 Anti-CD3 hIgG1 Antibody(CH2527) (Cat. GM-33037AB) 抗体流式验证 CD3 表达结果

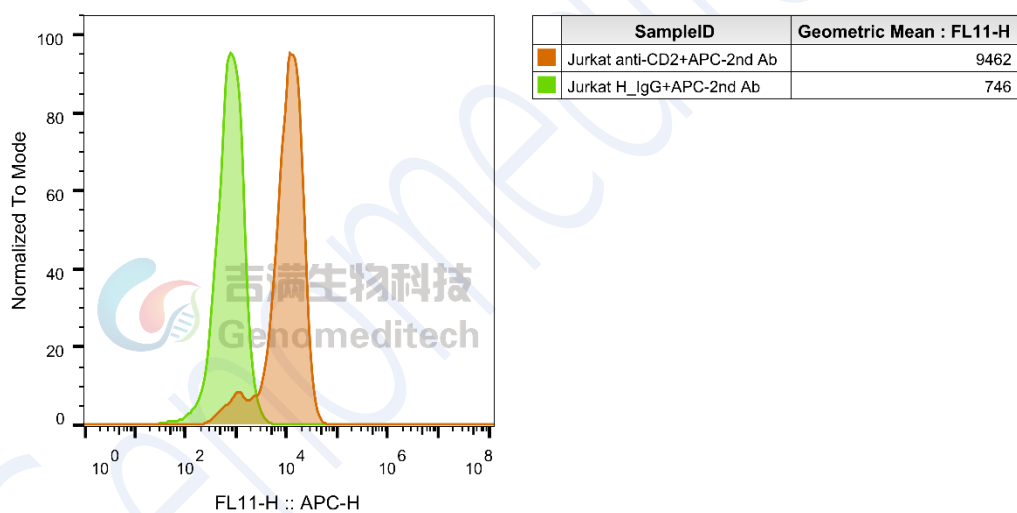


Fig 6. Jurkat Cell Line 使用 Anti-CD2 hIgG1 Antibody(BTI-322) (Cat. GM-79929AB) 抗体流式验证 CD2 表达结果

附录 3 Sanger 测序结果

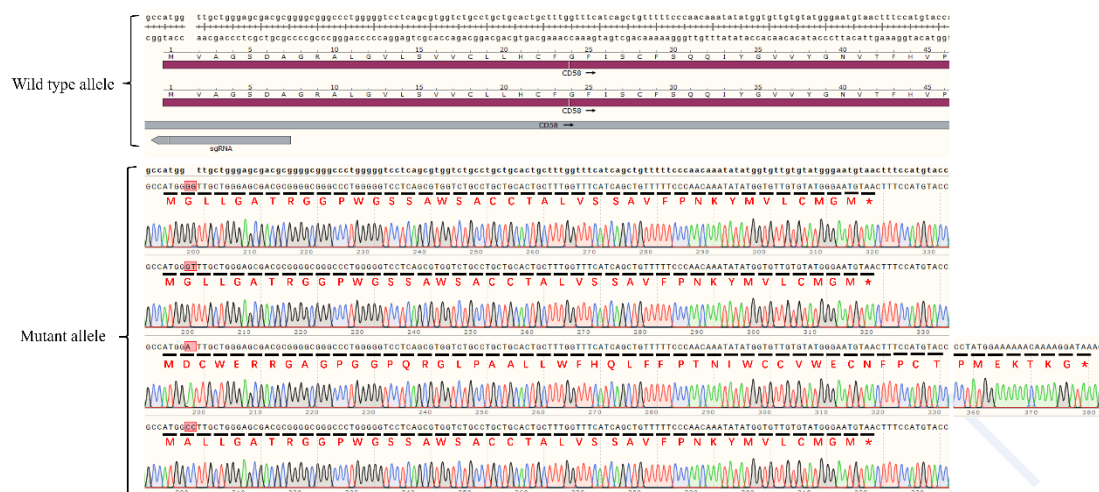


Fig 7. CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat(CD58 KO) Cell Line 使用 Sanger 测序验证 CD58 敲除效果

相关产品

CD28	
H_CD28 Reporter Jurkat Cell Line	Cynomolgus_CD28 CHO-K1 Cell Line
H_CD28 CHO-K1 Cell Line	H_CD28 HEK-293 Cell Line
Anti-CD28 hIgG4 Antibody(FR104)	Anti-H_CD28 hIgG4 Antibody(Theralizumab)
Anti-mouse CD28 Syrian Hamster IgG2 Antibody(37.51)	
CD19	
Cynomolgus_CD19 CHO-K1 Cell Line	Cynomolgus_CD19 HEK-293 Cell Line
H_CD19 CHO-K1 Cell line	H_CD19 HEK-293 Cell Line
Mouse_CD19 CHO-K1 Cell Line	
Anti-CD19 hIgG1 Reference Antibody (Loncbio)	Anti-H_CD19 hIgG1/hIgG2 Antibody(Tafasitamab)
CD3	
H_CD3D CD3E KO Jurkat Cell Line	Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line
Cynomolgus_CD3 HEK-293 Cell Line	Cynomolgus_CD3E(Membrane Bound ECD) CHO-K1 Cell Line
H_CD3 CHO-K1 Cell Line	H_CD3 HEK-293 Cell Line
H_CD3E(Membrane Bound ECD) CHO-K1 Cell Line	Mouse_CD3 HEK-293 Cell Line
	Anti-CD3 epsilon hIgG1 Antibody [OKT-3 (muromonab)]
Anti-CD3 hIgG1 Antibody(CH2527)	Anti-mouse CD3ε mIgG2a Antibody(145-2C11)
CD2	
Cynomolgus_CD2 CHO-K1 Cell Line	H_CD2 CHO-K1 Cell Line
Anti-CD2 hIgG1 Antibody(BTI-322)	

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。