

产品手册

Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO)
Cell Line

Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE 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.	激活验证实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
1)	验证结果	9
附录 1	功能验证结果	10
附录 2	流式验证结果	11
附录 3	测序验证结果	11
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-C45147	Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE 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-C45147	Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE 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

CD3D (CD3 δ) 与 CD3E (CD3 ϵ) 是 T 细胞受体-CD3 (TCR-CD3) 复合物的核心信号亚基，二者通过形成 CD3 $\delta\epsilon$ 异源二聚体参与 TCR 复合物的正确组装与膜表达；其胞质尾部均含有免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM)，当 TCR 识别抗原后，ITAM 被 Src 家族激酶磷酸化并招募 ZAP-70，进而激活下游 NFAT、MAPK 和 NF- κ B 等多条信号通路，驱动 T 细胞的增殖、分化与效应功能。CD3D 对胸腺细胞发育及复合物胞内转运至关重要，而 CD3E 参与 TCR 复合物的内吞调控。鉴于 CD3 复合物在 T 细胞激活中的不可替代性，CD3 已成为双特异性抗体和免疫治疗药物研发的最热门靶点之一，全球在研项目超过 400 项，其中靶向 CD3 ϵ 的抗体多以天然异源二聚体为识别表位，通过激活 T 细胞实现抗肿瘤作用。因此，建立能够特异性评价靶向食蟹猴 CD3 的药物活性的细胞模型，对临床前种属交叉反应性和药效学研究具有重要意义。

吉满生物 Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO) Cell Line 是在 Jurkat 细胞基础上，先敲除内源性人 CD3D 和 CD3E 基因，再过表达 Cynomolgus CD3D 和 CD3E 后构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当加入能够结合并激活 Cynomolgus CD3 药物时，TCR-CD3 复合物下游信号通路被激活，进而驱动荧光素酶表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，可用于评估候选药物对食蟹猴 CD3 的激动活性或功能性结合。

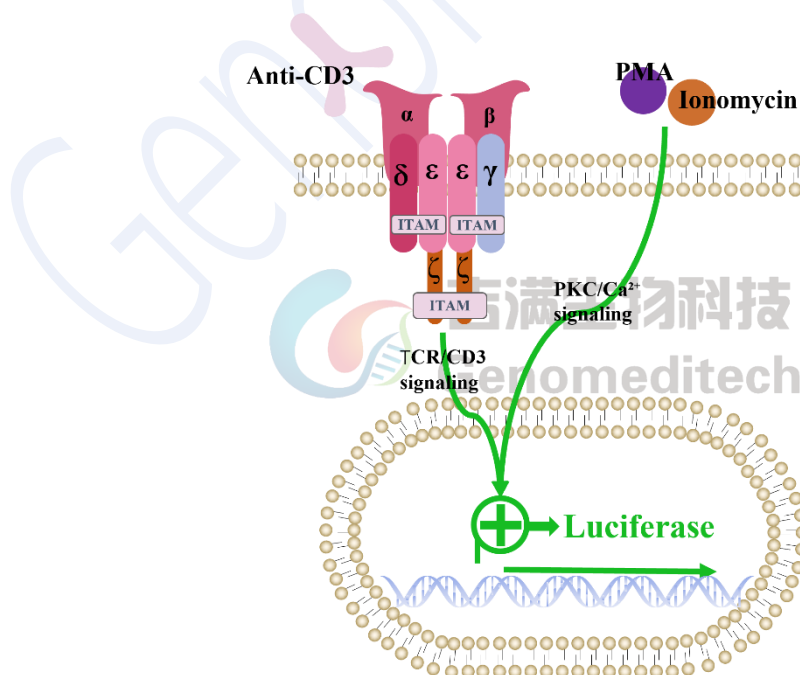


Fig1. 原理图

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+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.
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
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
96 well round cell culture plate	96-well	Thermo/236108
96-well White Opaque Plate	96-well	Thermo/442404
96-well U-bottom Plate	96-well	Saining/1014010
PMA/TPA	1 mg	Beyotime/S1819
Ionomycin (Synonyms: SQ23377)	1 mg	MCE/HY-13434
Anti-CD3 hIgG1 Antibody(CH2527)	/	Genomeditech/GM-33037AB
Anti-CD3 mIgG1 Antibody(SP34-2)	/	Genomeditech/GM-87919AB
Anti-CD3 epsilon Antibody [OKT-3 (muromonab)]	/	Genomeditech/GM-51478AB
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 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 $\geq 3 \times 10^6$ 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 需 56°C 水浴 30 分钟，可热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. 激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO) Cell Line 细胞量为 5×10^4 cells/孔。使用 Anti-CD3 hIgG1 Antibody(CH2527) (以下简称为 Anti-CD3) 作为阳性药物。起始终浓度(Conc.01)为 1 $\mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围为 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	Anti-CD3	PBS	1.00 $\mu\text{g/mL}$	250.00 ng/mL	62.50 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 pg/mL	15.26 pg/mL	0	
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 1-2 h，离心收集 Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO) 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，调整细胞浓度到 1×10^6 cells/mL，以排枪加 50 μL 细胞/孔至中间孔，周围的孔加 100 μL PBS，于孵箱中孵育待用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 U 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-CD3	3.101 mg/mL	31.01 $\mu\text{g/mL}$	取 2 μL 储液+198 μL Assay Buffer

- e) 96 孔 U 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 160 μ L Assay Buffer, B2-B11 孔, 加入 120 μ L Assay Buffer。
- f) 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 11.03 μ L Anti-CD3), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 40 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	11.03 μL Anti-CD3	加入	160 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 40 μ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 充分混匀以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- h) 将步骤 a 准备好的细胞孔板取出, 加入步骤 g 准备好的梯度稀释液, 每孔 50 μ L。
- i) 盖上检测板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- j) 收样, 转至 96 孔白底板上机, 检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO) Cell Line	0 μ g/mL	1 μ g/mL	15.26 pg/mL
	2923	368481	2588

1) 验证结果

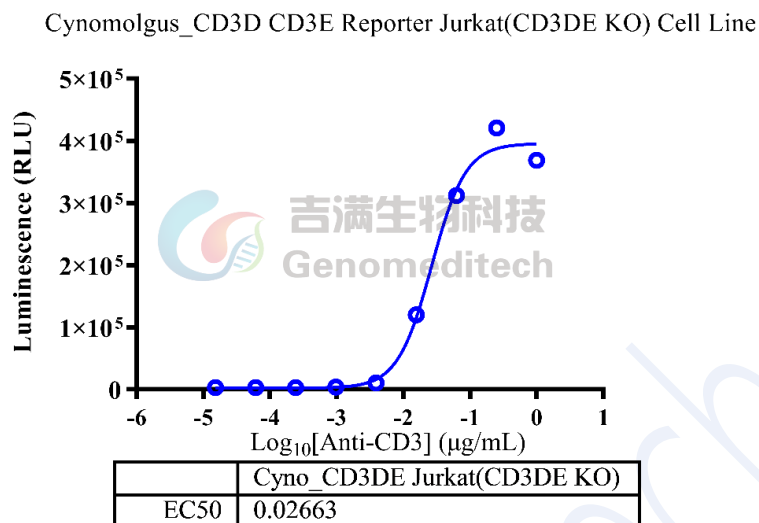


Fig 2. Response to Anti-CD3 hIgG1 Antibody(CH2527). The Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO) Cell Line (Cat. GM-C45147) at a concentration of 5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Anti-CD3 hIgG1 Antibody(CH2527) (Cat. GM-33037AB) in assay buffer (RPMI 1640+1% FBS+1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [126.1]. Data are shown by drug mass concentration.

附录 1 功能验证结果

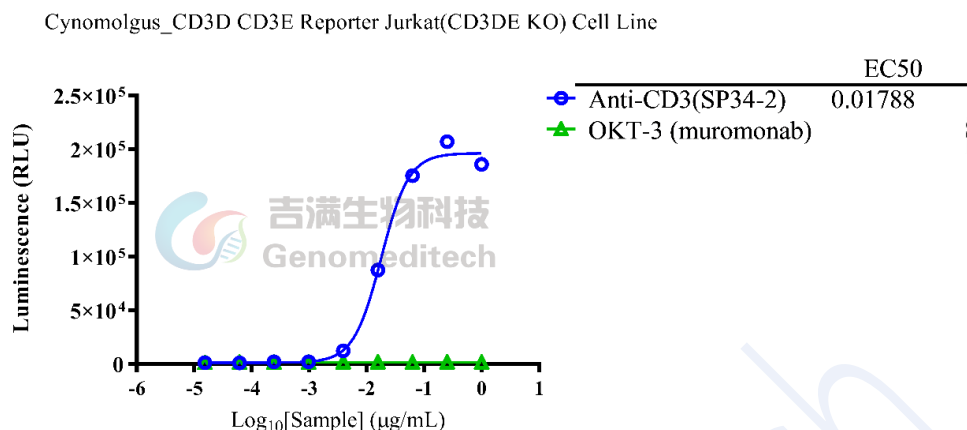


Fig 3. Response to Anti-CD3 mIgG1 Antibody(SP34-2). The Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO) Cell Line (Cat. GM-C45147) at a concentration of 5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Anti-CD3 mIgG1 Antibody(SP34-2) (Cat. GM-87919AB) and Anti-CD3 epsilon Antibody [OKT-3 (muromonab)](Cat. GM-51478AB) in assay buffer (RPMI 1640+1% FBS+1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [136.6]. Data are shown by drug mass concentration.

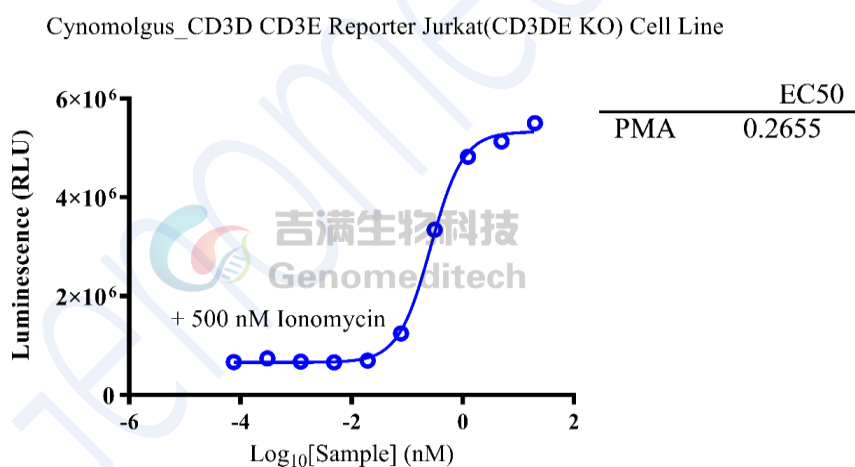


Fig 4. Response to PMA/TPA. The Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO) Cell Line (Cat. GM-C45147) at a concentration of 5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of PMA/TPA (Beyotime/S1819) and 500 nM Ionomycin (MCE/HY-13434) in assay buffer (RPMI 1640+1% FBS+1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [9.7]. Data are shown by drug molar concentration.

附录 2 流式验证结果

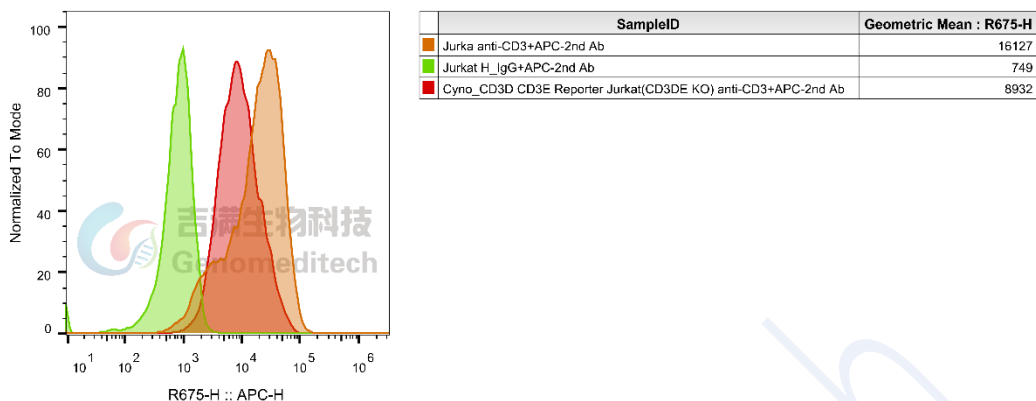


Fig 5. Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO) Cell Line (Cat. GM-C45147) was determined by flow cytometry using Anti-CD3 hIgG1 Antibody(CH2527)(Cat. GM-33037AB).

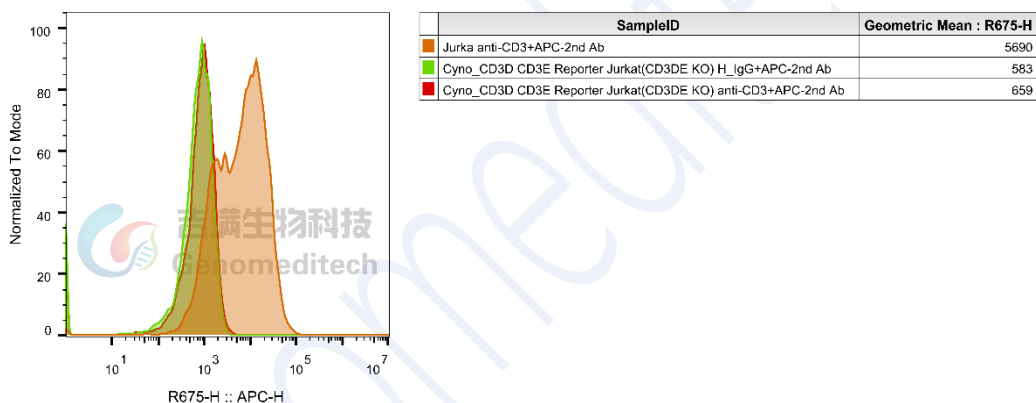


Fig 6. Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO) Cell Line (Cat. GM-C45147) was determined by flow cytometry using Anti-CD3 epsilon hIgG1 Antibody [OKT-3 (muromonab)](Cat. GM-51478AB).(The antibody does not recognize Cynomolgus.)

附录 3 测序验证结果

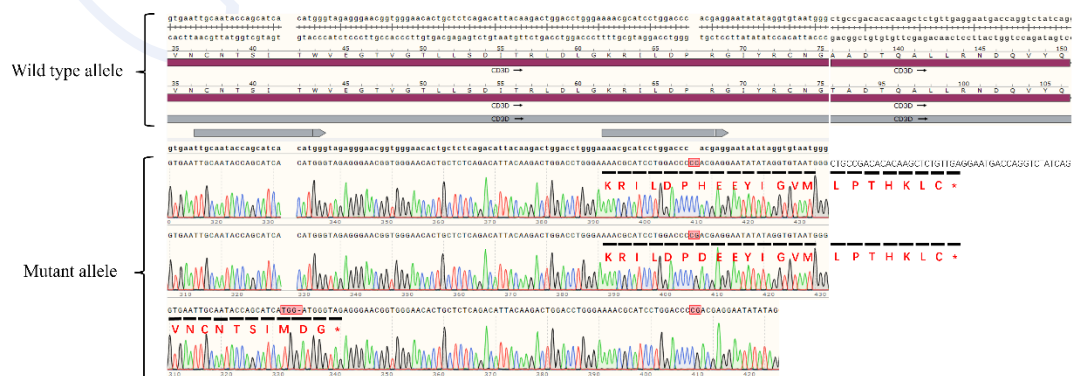


Fig 7. The Sanger sequencing of the Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO) Cell Line(Cat. GM-C45147) showed successful knockout of Human CD3D.

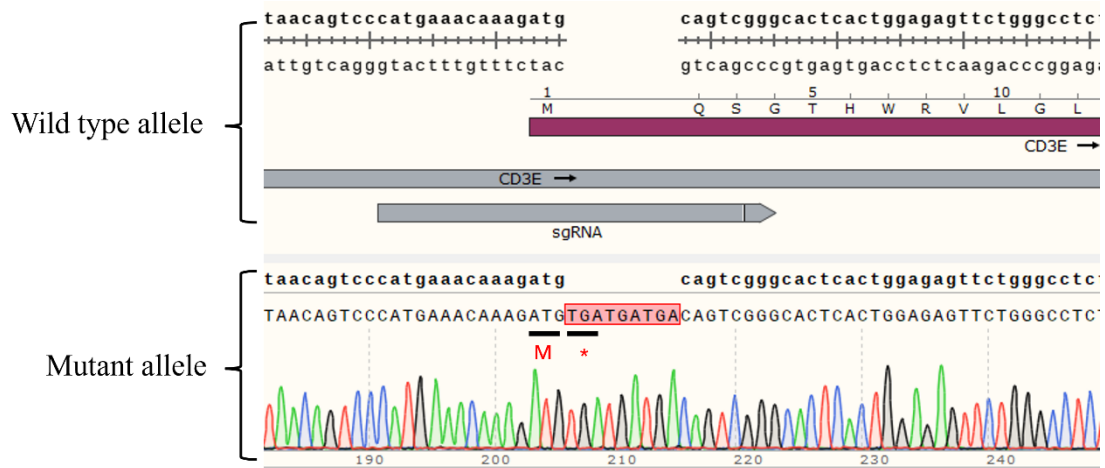


Fig 8. The Sanger sequencing of the Cynomolgus_CD3D CD3E Reporter Jurkat(CD3DE KO) Cell Line(Cat. GM-C45147) showed successful knockout of Human CD3E.

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
H_CD28 KO Jurkat Cell Line	
Anti-CD28 hIgG4 Antibody(FR104)	Anti-H_CD28 hIgG4 Antibody(Theralizumab)
Anti-mouse CD28 Syrian Hamster IgG2 Antibody(37.51)	Human CD28 Protein; His Tag
CD19	
H_CD19 KO Raji Cell Line	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	
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_CD3(TCR V2) CHO-K1 Cell Line
H_CD3(TCR V2) HEK-293 Cell Line	H_CD3(TCRαβ delta V) HEK-293 Cell Line
H_CD3D CD3E KO Jurkat Cell Line	H_CD3E KO Jurkat 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-CD3×CD20 hIgG1 Bispecific Antibody (Epcobio)
Anti-mouse CD3ε mIgG2a Antibody(145-2C11)	Anti-CD3E×BCMA hIgG4 Reference Antibody (Tecbio)
CD2	
H_CD2 KO Jurkat(CD3-) Cell Line	CD3-CD2-tsAb Reporter Jurkat(CD58 KO) Cell Line
Cynomolgus_CD2 CHO-K1 Cell Line	H_CD2 CHO-K1 Cell Line
Human CD2 Protein; His Tag	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。