

## 产品手册

H\_CD47 PDL1 MC38(mouse\_PDL1 KO) Cell Line

H\_CD47 PDL1 MC38(mouse\_PDL1 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：V2.9.240522

## 目录

|      |                             |   |
|------|-----------------------------|---|
| 一、   | 产品基本信息及组分.....              | 3 |
| 二、   | 包装、运输及储存.....               | 3 |
| 三、   | 材料准备.....                   | 3 |
| 1.   | 细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....         | 3 |
| 2.   | 试剂耗材准备.....                 | 3 |
| 四、   | 细胞复苏、传代、冻存.....             | 4 |
| 1.   | 细胞复苏.....                   | 4 |
| 2.   | 细胞传代（以 10 cm 皿为例）.....      | 4 |
| 3.   | 细胞冻存.....                   | 4 |
| 五、   | 验证结果.....                   | 5 |
| 1.   | 流式检测蛋白表达-CD47.....          | 5 |
| 2.   | 流式检测蛋白表达-PDL1.....          | 6 |
|      | 使用许可协议：.....                | 7 |
| 附录 1 | H_CD47 氨基酸序列（Q08722-1）..... | 8 |
| 附录 2 | H_PDL1 氨基酸序列（Q9NZQ7-1）..... | 8 |
| 附录 3 | Mouse_PDL1 KO 结果.....       | 9 |

## 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-C22137 | H_CD47 PDL1 MC38(mouse_PDL1 KO) Cell Line | 1 kit |

### 产品组成

| 产品编号      | 产品名称   | 规格           | 数量  | 储存     |
|-----------|--|--------------|-----|--------|
| GM-C24246 | H_CD47 PDL1 MC38(mouse_PDL1 KO) Cell Line #1 | 5E6 Cells/mL | 1 管 | -196°C |
| GM-C24247 | H_CD47 PDL1 MC38(mouse_PDL1 KO) Cell Line #2 | 5E6 Cells/mL | 1 管 | -196°C |
| GM-C24250 | H_CD47 PDL1 MC38(mouse_PDL1 KO) Cell Line #9 | 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。请收到产品后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. 本产品相关实验，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

## 三、材料准备

### 1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

|          |   |
|----------|---|
| 细胞复苏培养基: | DMEM+10% FBS+1% P.S   |
| 细胞生长培养基: | DMEM+10% FBS+1% P.S+2 µg/mL Blasticidin+200 µg/mL G418+200 µg/mL Hygromycin+2.5 µg/mL Puromycin |
| 细胞冻存液:   | 90% FBS+10% DMSO  |

### 2. 试剂耗材准备

#### 试剂准备

| Reagent   | Specification | Manufacturer/Catalogue No.  |
|---|---------------|-----------------------------|
| Puromycin                                       | 25 mg         | Genomeditech/GM-040401-1    |
| Hygromycin                                      | 1 g           | Genomeditech/GM-040403-1    |
| Blasticidin                                     | 10 mg         | Genomeditech/GM-040404-1    |
| G418 Sulfate                                    | 1 g           | Genomeditech/GM-040402-1    |
| Fetal Bovine Serum                              | 500 mL        | Cegrogen biotech/A0500-3010 |
| DMEM  | 500 mL        | Viva Cell/C3110-0500        |
| Anti-CD47 hIgG4 Antibody(5F9)                   | /             | Genomeditech/GM-27657AB     |
| Anti-H_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody(Atezolizumab) | /             | Genomeditech/GM-31740AB     |

#### 重要仪器

| Equipment | Manufacturer/Catalogue No.         |
|-----------|------------------------------------|
| 细胞计数仪     | ThermoFisher Scientific/Countess 3 |
| 流式细胞仪     | 常州必达科生物科技有限公司/BeamCyte-1026        |

## 四、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,活细胞 $\geq 3 \times 10^6$  cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式,调整活细胞密度到 2-3 × 10<sup>5</sup> cells/mL,根据细胞悬液总体积,将细胞接种到合适的培养皿中。

### 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<sup>6</sup> 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(以 10 cm 皿为例)

**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。**

- 细胞为上皮细胞,贴壁生长。培养箱中孵育 16-24 h 后,镜下观察细胞贴壁情况,当细胞密度大于 60%,即可进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:4-1:5, 2-3 天传代。
- 将皿或培养瓶中的培养液弃去,10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- 弃 PBS,加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液,37°C 消化 30-60 s,显微镜下观察。
- 待细胞变圆,细胞间隙明显,部分细胞刚开始脱离瓶壁时,加 2 mL 左右生长培养基混匀终止消化,将细胞小心吹打下来,176 × g 室温离心 3 min。
- 弃上清,细胞沉淀用生长培养基重悬,根据传代前细胞密度分盘(根据培养皿面积和细胞密度计算,传代后细胞密度为 20-30%)。

**注意事项:**

细胞状态稳定后,传代后死细胞会变少,细胞生长速度趋于稳定,细胞形态均匀,胞体健壮。

## 五、 验证结果

### 1. 流式检测蛋白表达-CD47

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐H\_CD47 PDL1 MC38(mouse\_PDL1 KO) Cell Line细胞量为 $2 \times 10^5$  cells/管。操作步骤如下：

- 实验前，需等待细胞生长速率稳定，约需要3-5 d。
- 实验当天，消化H\_CD47 PDL1 MC38(mouse\_PDL1 KO) cell line，取100  $\mu$ L细胞悬液（细胞计数后用PBS调整浓度为 $2 \times 10^6$  cells/mL），加入适量的表面抗体（Anti-CD47 hIgG4 Antibody(5F9)），4°C避光孵育1 h。
- 加入1-2 mL PBS冲洗，重复此步骤。
- 加入荧光标记的二抗，4°C避光孵育30 min。
- 1000 rpm离心5 min，去除上清，用300  $\mu$ L PBS重悬。
- 立即上机检测。
- 验证结果。

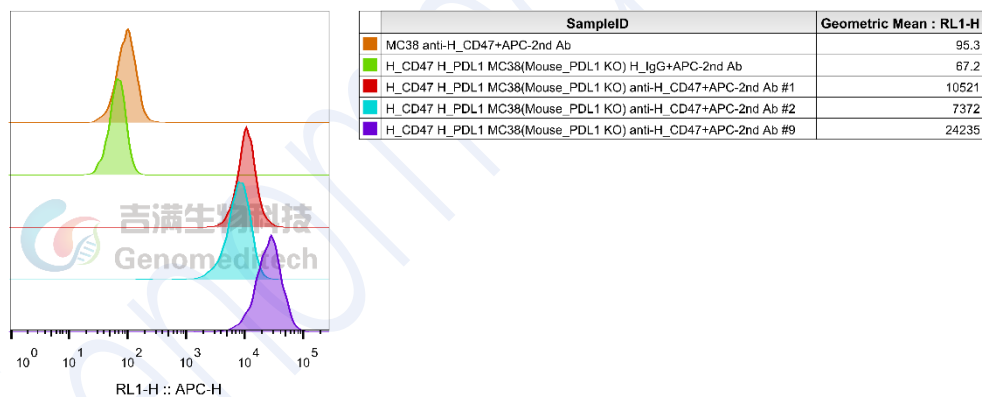


Fig 1.CD47 流式验证结果

## 2. 流式检测蛋白表达-PDL1

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐H\_CD47 PDL1 MC38(mouse\_PDL1 KO) Cell Line细胞量为 $2 \times 10^5$  cells/管。操作步骤如下：

- 实验前，需等待细胞生长速率稳定，约需要3-5 d。
- 实验当天，消化H\_CD47 PDL1 MC38(mouse\_PDL1 KO) cell line，取100  $\mu$ L细胞悬液（细胞计数后用PBS调整浓度为 $2 \times 10^6$  cells/mL），加入适量的表面抗体（Anti-H\_CD274(PDL1) hIgG1 Antibody(Atezolizumab)），4 $^{\circ}$ C避光孵育1 h。
- 加入1-2 mL PBS冲洗，重复此步骤。
- 加入荧光标记的二抗，4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。
- 1000 rpm离心5 min，去除上清，用300  $\mu$ L PBS重悬。
- 立即上机检测。
- 验证结果。

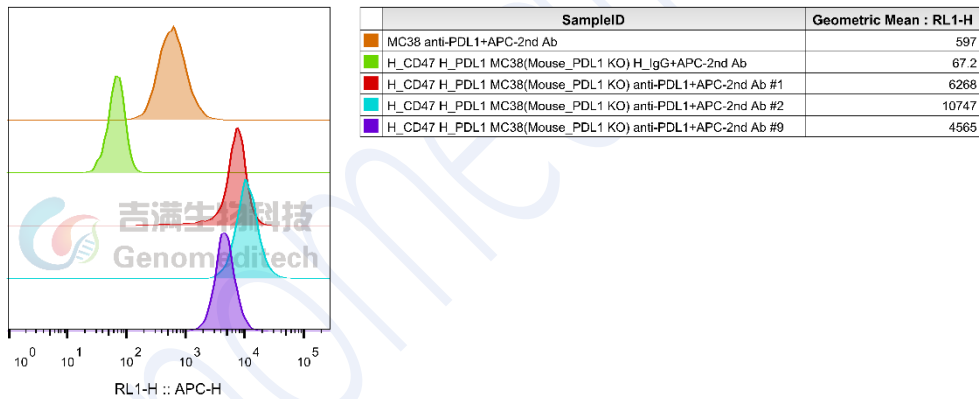


Fig 2.PDL1 流式验证结果

## 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

## 附录 1 H\_CD47 氨基酸序列 (Q08722-1)

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKW  
KFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE  
LTREGETIIEELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLV  
AGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQV  
IAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEE  
PLNAFKESKGMMNDE

## 附录 2 H\_PDL1 氨基酸序列 (Q9NZQ7-1)

MRIFAVFIFMTYWHELLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEM  
EDKNIIQFVHGEECLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY  
GGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGK  
TTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHL  
VILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET



### 附录3 Mouse\_PDL1 KO 结果

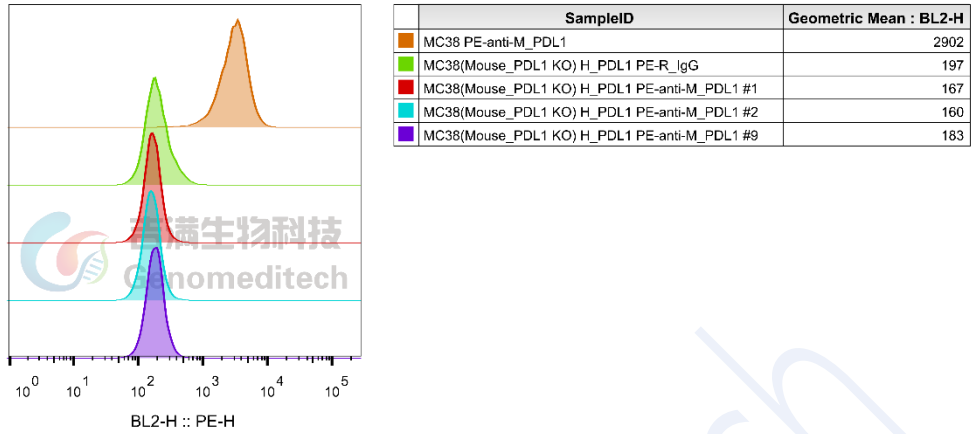


Fig 3.使用 PE anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) Antibody (BioLegend/124307)抗体流式验证, 证明

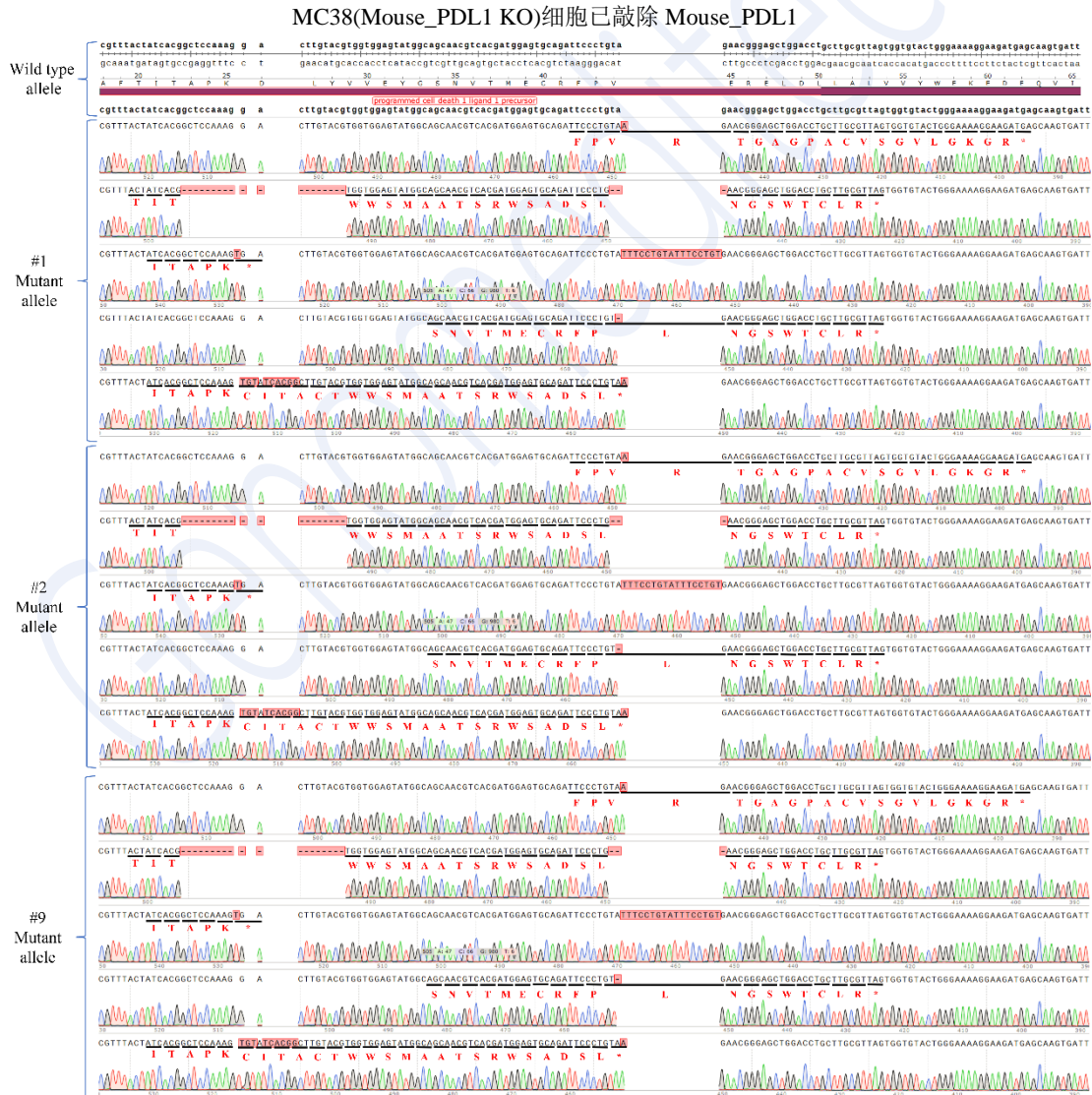


Fig 4.DNA 测序验证细胞已敲除 Mouse\_PDL1