

## 产品手册

### H\_TNFR2 Reporter Jurkat Cell Line

### H\_TNFR2 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.      | 功能验证实验.....                                 | 7  |
| 1)      | 加样步骤.....                                   | 7  |
| 2)      | 报告基因检测.....                                 | 8  |
| 3)      | 验证结果.....                                   | 9  |
| 附录      | H_TNFR2 Reporter Jurkat Cell Line 流式结果..... | 10 |
| 使用许可协议: | .....                                       | 11 |

## 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-C25209 | H_TNFR2 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-C25209 | H_TNFR2 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

肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 是一种 II 型跨膜蛋白。它以膜结合形式 (mTNF- $\alpha$ ) 存在。mTNF- $\alpha$  可以通过称为 TNF $\alpha$  转化酶的作用被加工成 17 kDa 可溶性 TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ )。

TNF- $\alpha$  通过两种 TNF 受体超家族成员 I 型跨膜受体 TNF 受体 1 (TNFR1) 和 TNF 受体 2 (TNFR2) 发挥作用。两种受体的细胞外结构域具有相似的富含半胱氨酸的基序, 重复两次到六次。其中 TNFR2 (Tumor Necrosis Factor Receptor 2) 主要由 mTNF- $\alpha$  激活, 其主要在胸腺 T 淋巴细胞, 内皮细胞, 小胶质细胞和少突胶质细胞中表达。

吉满生物 H\_TNFR2 Reporter Jurkat Cell Line 报告基因细胞系, 是基于 TNF 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 mTNF- $\alpha$  或抗体与 TNFR2 结合时, 导致下游通路激活, 进而荧光素酶 (Luciferase) 的表达变化。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果, 因此可用于 TNFR2 相关药物的体外效果评价。吉满还提供 H\_TNFR2 Reporter V2 Cell Line (Catalog # GM-C25776) 细胞, 通过敲除细胞本身表达的 TNFR1 基因, 可用于特异性靶向 TNFR2 抗体的验证实验。

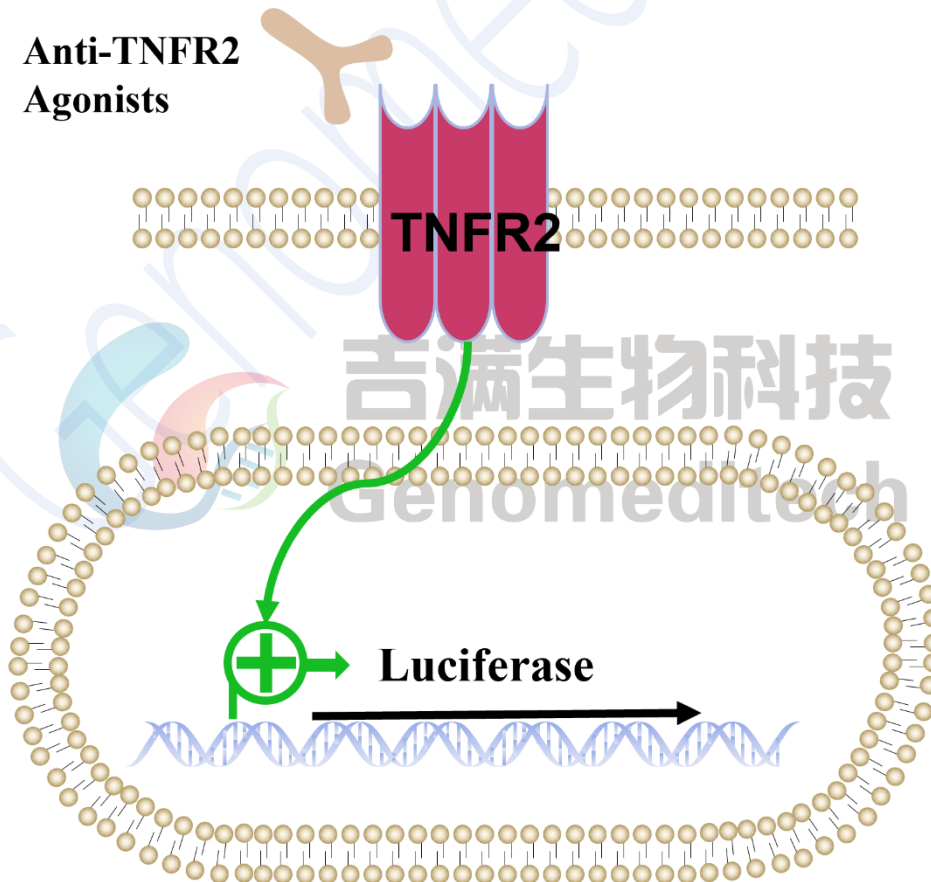


Fig 1.H\_TNFR2 信号通路图

## 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+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. |
|---------------------------------------|---------------|----------------------------|
| Puromycin                             | 25 mg         | Genomeditech/GM-040401-1   |
| Blasticidin                           | 10 mg         | Genomeditech /GM-040404-1  |
| Pen/Strep                             | 100 mL        | Thermo/15140-122           |
| Fetal Bovine Serum                    | 500 mL        | Thermo/10099141            |
| RPMI 1640                             | 500 mL        | BI/01-100-1ACS             |
| 96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture | 96-well       | Corning/3894               |
| 96 Well White Polystyrene Microplate  | 96-well       | Corning/3903               |
| Cell Culture Dish                     | 10 cm         | NEST/704001                |
| Passive Lysis 5X Buffer               | 30 mL         | Promega/E1941              |
| Firefly Luciferase Assay Reagent      | 100 mL        | Genomeditech/G0483M002     |
| H_TNFR2 Null Reporter Cell Line       | /             | Genomeditech/GM-C27615     |
| Anti-H_TNFRSF1B(TNFR2) hIgG1 Antibody | /             | Genomeditech/GM-49245AB    |

#### 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 × 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  $5 \times 10^6$  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,待细胞状态稳定后开始细胞维持和繁殖,再更换为含有抗生素的生长培养基。**

- 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  $2 \times 10^6$  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。
- 注意营养,不处理时务必隔天适当补加生长培养基。

## 六、使用方法

### 1. 功能验证实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐目的细胞 H\_TNFR2 Reporter Jurkat Cell Line 及对照细胞 H\_TNFR2 Null Reporter Cell Line (以下简称 H\_TNFR2 Null) 细胞量均为  $1 \times 10^5$  cells/孔。使用 Anti-H\_TNFRSF1B(TNFR2) hIgG1 Antibody (150 kDa) (以下简称为 Anti-H\_TNFR2) 作为阳性抗体。起始浓度(Conc.01)为  $4 \mu\text{g/mL}$ , 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.10 分别排布在 B2-B11, B12 为 0 浓度对照。周围为  $100 \mu\text{L}$  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-H_TNFR2 | PBS | 4<br>$\mu\text{g/mL}$ | 1<br>$\mu\text{g/mL}$ | 250<br>$\text{ng/mL}$ | 62.5<br>$\text{ng/mL}$ | 15.63<br>$\text{ng/mL}$ | 3.91<br>$\text{ng/mL}$ | 976.56<br>$\text{pg/mL}$ | 244.14<br>$\text{pg/mL}$ | 61.04<br>$\text{pg/mL}$ | 15.26<br>$\text{pg/mL}$ | 0 |
| C | Anti-H_TNFR2 | PBS | 4<br>$\mu\text{g/mL}$ | 1<br>$\mu\text{g/mL}$ | 250<br>$\text{ng/mL}$ | 62.5<br>$\text{ng/mL}$ | 15.63<br>$\text{ng/mL}$ | 3.91<br>$\text{ng/mL}$ | 976.56<br>$\text{pg/mL}$ | 244.14<br>$\text{pg/mL}$ | 61.04<br>$\text{pg/mL}$ | 15.26<br>$\text{pg/mL}$ | 0 |
| D |              | PBS | PBS                   | PBS                   | PBS                   | PBS                    | PBS                     | PBS                    | PBS                      | PBS                      | PBS                     | PBS                     |   |
| E |              |     |                       |                       |                       |                        |                         |                        |                          |                          |                         |                         |   |
| F |              |     |                       |                       |                       |                        |                         |                        |                          |                          |                         |                         |   |
| G |              |     |                       |                       |                       |                        |                         |                        |                          |                          |                         |                         |   |
| H |              |     |                       |                       |                       |                        |                         |                        |                          |                          |                         |                         |   |

#### 1) 加样步骤

- 实验前 1-2 h, 离心收集 H\_TNFR2 Reporter Jurkat Cell Line 和 H\_TNFR2 Null, 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, 调整两种细胞密度均为  $2 \times 10^6$  Cells/mL。以排枪加  $50 \mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔, 周围的孔加  $100 \mu\text{L}$  PBS, 盖上市盖, 于孵箱中孵育待用。
- 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-B11)。
- 准备母液

| 抗体名称         | 储液                   | 母液                    | 配置方法  |
|--------------|----------------------|-----------------------|---|
| Anti-H_TNFR2 | $1.62 \text{ mg/mL}$ | $0.162 \text{ mg/mL}$ | 使用 $2 \mu\text{L}$ 母液 + $18 \mu\text{L}$ Assay Buffer |

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入  $69.7 \mu\text{L}$  Assay Buffer, B2-B12 孔, 加入  $55 \mu\text{L}$  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 3.62  $\mu\text{L}$  Anti-H\_TNFR2），混匀。

|   | 母液吸取                            | 梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.3 $\mu\text{L}$ ，加入次孔 |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | 对照孔              |                  |                  |                  |
|---|---------------------------------|--|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|   |                                 | 1                                      | 2                  | 3                | 4                | 5                | 6                | 7                | 8                | 9                | 10               |                  | 11               | 12               |                  |
| A |                                 |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| B | 3.62 $\mu\text{L}$ Anti-H_TNFR2 | 加入                                     | 69.7 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ |
| C | 3.62 $\mu\text{L}$ Anti-H_TNFR2 | 加入                                     | 69.7 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ |
| D |                                 |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | 对照孔              |
| E |                                 |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| F |                                 |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| G |                                 |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| H |                                 |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.3  $\mu\text{L}$ ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 10 个梯度稀释孔（B11）。
- i) 将步骤 a 准备好的 H\_TNFR2 Reporter Jurkat Cell Line 和 H\_TNFR2 Null 孔板取出，每孔加 50  $\mu\text{L}$  梯度稀释的抗体，混匀后孵育 16 h。
- j) 使用报告基因试剂检测，检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

|                                   |                    |                    |                      |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| H_TNFR2 Reporter Jurkat Cell Line | 0 $\mu\text{g/mL}$ | 4 $\mu\text{g/mL}$ | 15.26 $\text{pg/mL}$ |
|                                   | 162762             | 1652019            | 165908               |
| H_TNFR2 Null                      | 0 $\mu\text{g/mL}$ | 4 $\mu\text{g/mL}$ | 15.26 $\text{pg/mL}$ |
|                                   | 58327              | 53908              | 64893                |



### 3) 验证结果

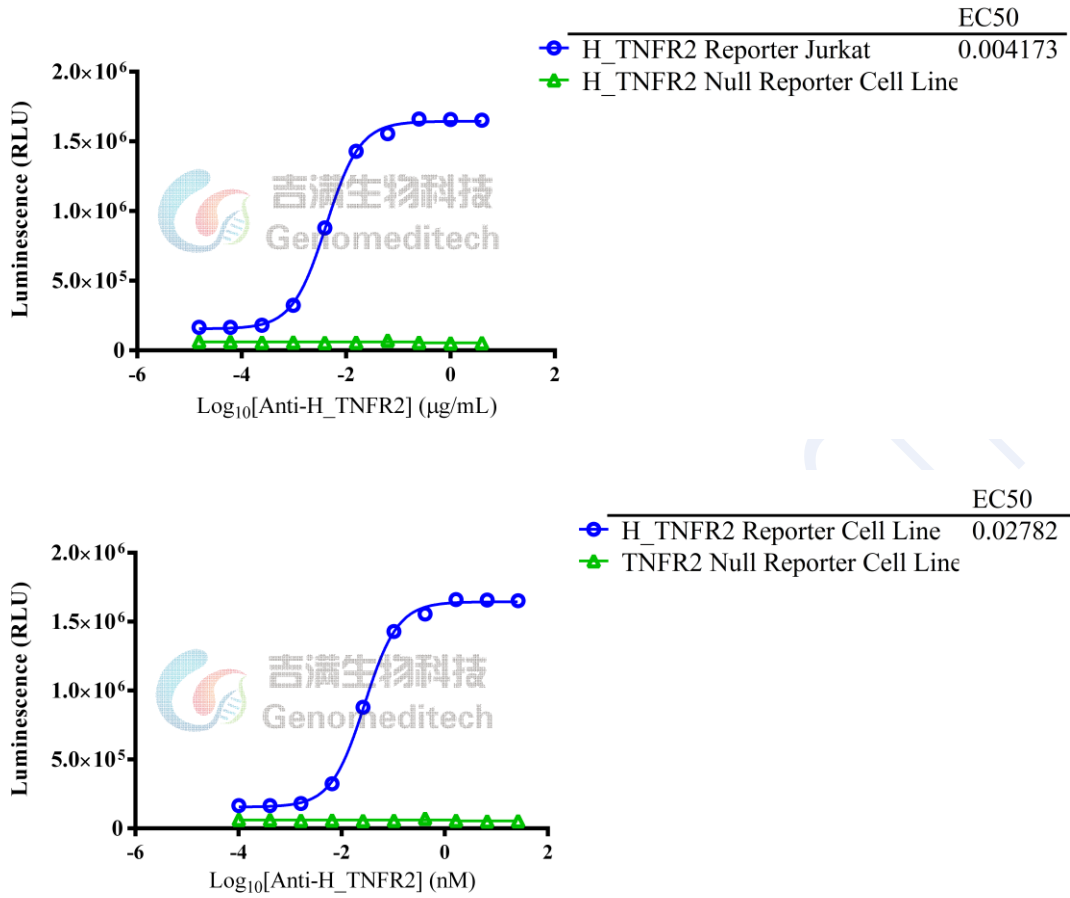


Fig 2. 验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 附录 H\_TNFR2 Reporter Jurkat Cell Line 流式结果

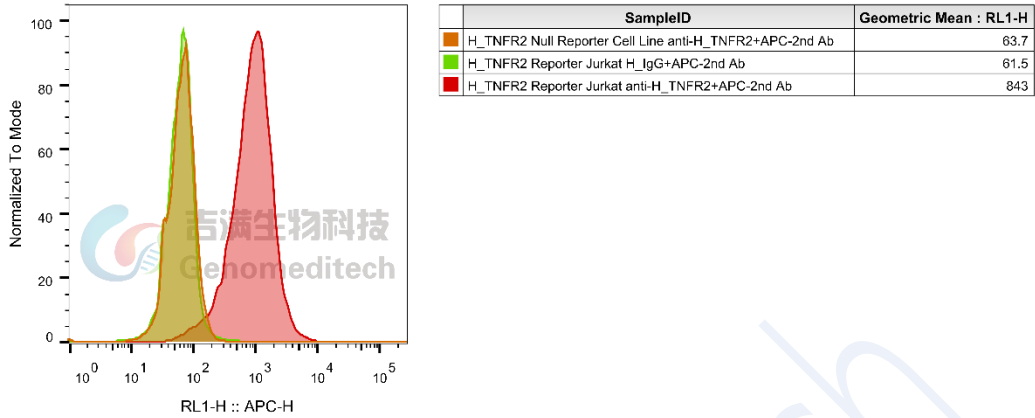


Fig 3.对照细胞 H\_TNFR2 Null Reporter Cell Line 与功能细胞 H\_TNFR2 Reporter Jurkat Cell Line 使用 Anti-H\_TNFRSF1B(TNFR2) hIgG1 Antibody(Genomeditech/GM-49245AB)流式验证结果

## 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