

产品手册

ADCP Fc γ RIIb Jurkat Effector Cell Line

ADCP Fc γ RIIb Jurkat Effector 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.240524

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.	Anti-H_MS4A1(CD20)抗体 Assay 验证.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
附录 1:	流式验证结果.....	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-C26215	ADCP FcγRIIb Jurkat Effector Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C26215	ADCP FcγRIIb Jurkat Effector 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

ADCP 即抗体依赖性细胞介导的细胞吞噬作用，是指表达 Fc 受体的免疫细胞通过识别抗体的 Fc 段吞噬与抗体特异性结合的靶细胞的作用。现如今，ADCP 作用机制被用来检测、评定抗体的功效。抗体 Fab 段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（主要为巨噬细胞）表面的 Fc γ RIIb 受体上，两种类型的细胞即发生多重交联，激活 ADCP 作用机制通路，导致靶细胞被吞噬，经典的 ADCP 生物活性检测中，利用供者的巨噬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 ADCP Fc γ RIIb Jurkat Effector Cell Line 报告基因细胞系采用工程改造的 Jurkat 细胞作为效应细胞。利用巧妙的载体设计和第三代慢病毒报告基因系统，稳定表达了人 Fc γ RIIb 受体和由转录因子驱动表达的萤火虫萤光素酶，抗体在 ADCP 作用机制中的生物活性通过 NFAT 通路活化产生的萤光素酶定量，而效应细胞中的萤光素酶活性通过生物发光读数定量。此方法检测的信号值高，且背景值低。并可接受 ADCP 细胞系定制和 ADCP 活性检测服务。

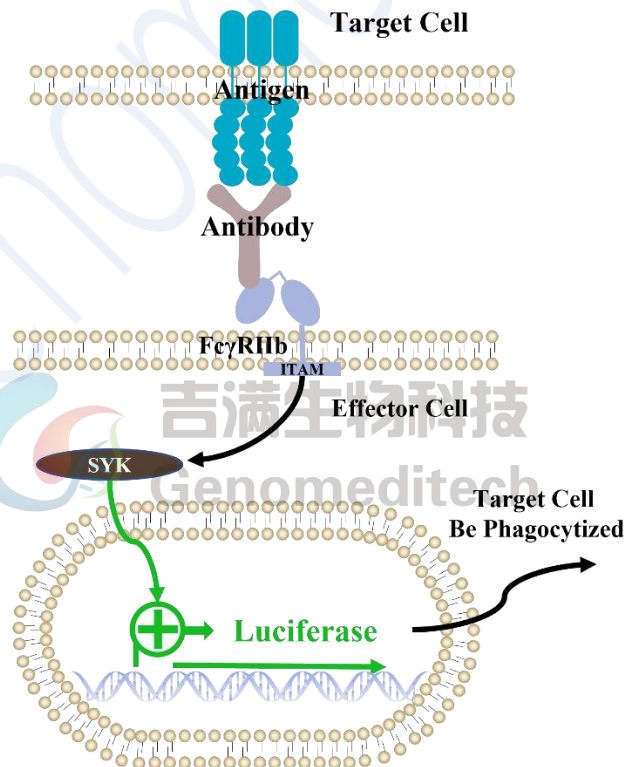


Fig 1. 信号通路图

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(P.S)	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell BIOSCIENCES/C3010-0500
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	96-well	Corning/3912
Microplate		
Anti-H_MS4A1(CD20) hIgG1 Antibody(Ocrelizumab)	/	Genomeditech/GM-27200AB
APC anti-human CD32B/C	100 tests	Biologend/398304
Raji Cell Line	/	Genomeditech/GM-C19100
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C

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 5×10^6 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。

六、 使用方法

1. Anti-H_MS4A1(CD20)抗体 Assay 验证

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 ADCP FcγRIIb Jurkat Effector Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。推荐 Raji cell line 细胞量为 2×10^4 cells/孔。

本次实验分别使用 Anti-H_MS4A1(CD20) hIgG1 Antibody(Ocrelizumab)（以下简称为 Anti-H_MS4A1(CD20)）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ ，3 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 $100 \mu\text{L}$ 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_MS4A1(CD20)	10 $\mu\text{g/mL}$	3.33 $\mu\text{g/mL}$	1.11 $\mu\text{g/mL}$	370.37 ng/mL	123.46 ng/mL	41.15 ng/mL	13.72 ng/mL	4.57 ng/mL	1.52 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

- 实验前 1-2 h，离心收集 Raji 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 6.05×10^5 cells/mL。以排枪加 $33.3 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育使用。
- 实验前 1-2 h，离心收集 ADCP FcγRIIb Jurkat Effector 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 3.05×10^6 cells/mL。
- 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。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-H_MS4A1(CD20) hIgG1 Antibody(Ocrelizumab)	2.84 mg/mL	/	直接使用储液

- f) 96 孔 V 孔板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 53.87 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 36.3 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 0.58 μL Anti-H_MS4A1(CD20)），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.15 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.58 μL Anti-H_MS4A1(CD20)	加入	53.87 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.15 μL ，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 孵育的 Raji cell line 孔板取出，先加入步骤 i 准备好的梯度稀释的药物，每孔 33 μL 。
- k) 然后在加入步骤 b 准备好的 ADCP Fc γ RIIb Jurkat Effector Cell Line，每孔 33 μL 。
- l) 盖上班盖，于 37°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 值。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

ADCP Fc γ RIIb Jurkat Effector Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.52 ng/mL
	2176	88271	2581

3) 验证结果

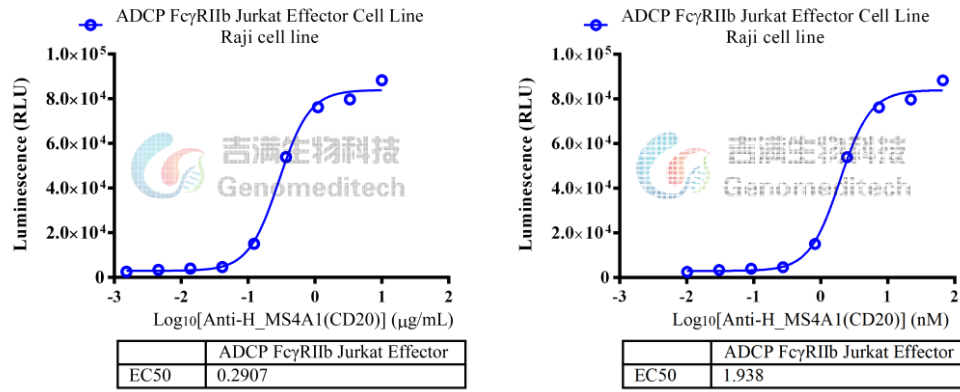


Fig 2. 使用 Anti-H_MS4A1(CD20)杀伤验证结果
 (右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)



附录 1：流式验证结果

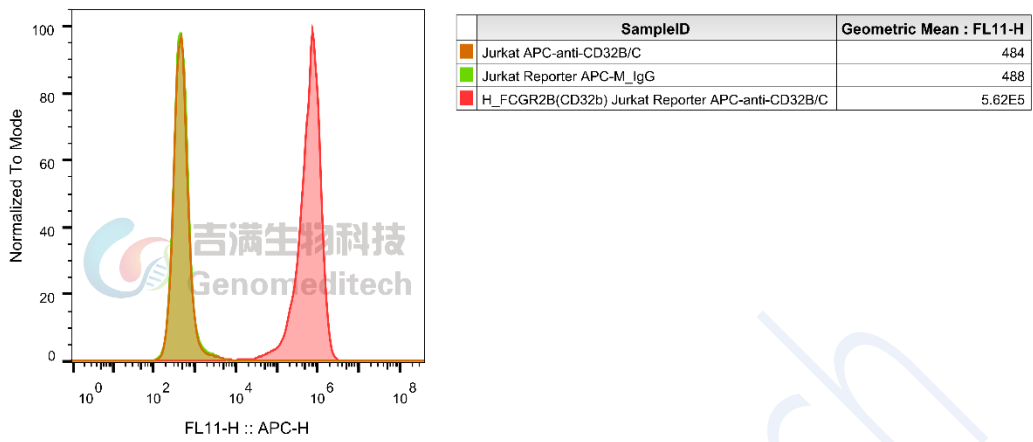


Fig 3. 使用 APC anti-human CD32B/C (Biolegend/398304) 流式验证结果

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