

产品手册

H_TNFR2 Null Reporter Cell Line

H_TNFR2 Null Reporter 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.	激活实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	TNF α 蛋白激活; Anti-TNF- α 抑制实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	11
3.	共培养激活; Anti-TNF- α 抑制实验.....	11
1)	加样步骤.....	11
2)	报告基因检测.....	13
3)	验证结果.....	13
附录 1:	流式验证结果.....	14
使用许可协议:	15

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-C27615	H_TNFR2 Null Reporter Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C27615	H_TNFR2 Null Reporter 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- α (TNF- α) 是一种 II 型跨膜蛋白。它以膜结合形式 (mTNF- α) 存在。mTNF- α 可以通过称为 TNF α 转化酶的作用被加工成 17 kDa 可溶性 TNF- α (sTNF- α)。

TNF- α 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, 重复两到六次, 作为同源三聚体时具有活性。其中 TNFR2 (Tumor Necrosis Factor Receptor 2) 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 Null Reporter Cell Line 细胞, 是基于 TNF 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。其只表达 TNFR1 受体, 不表达 TNFR2 受体。因此可用于 TNFR1 靶向药物的研发或作为 H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line (Genomeditech/# GM-C25776) 的对照细胞。

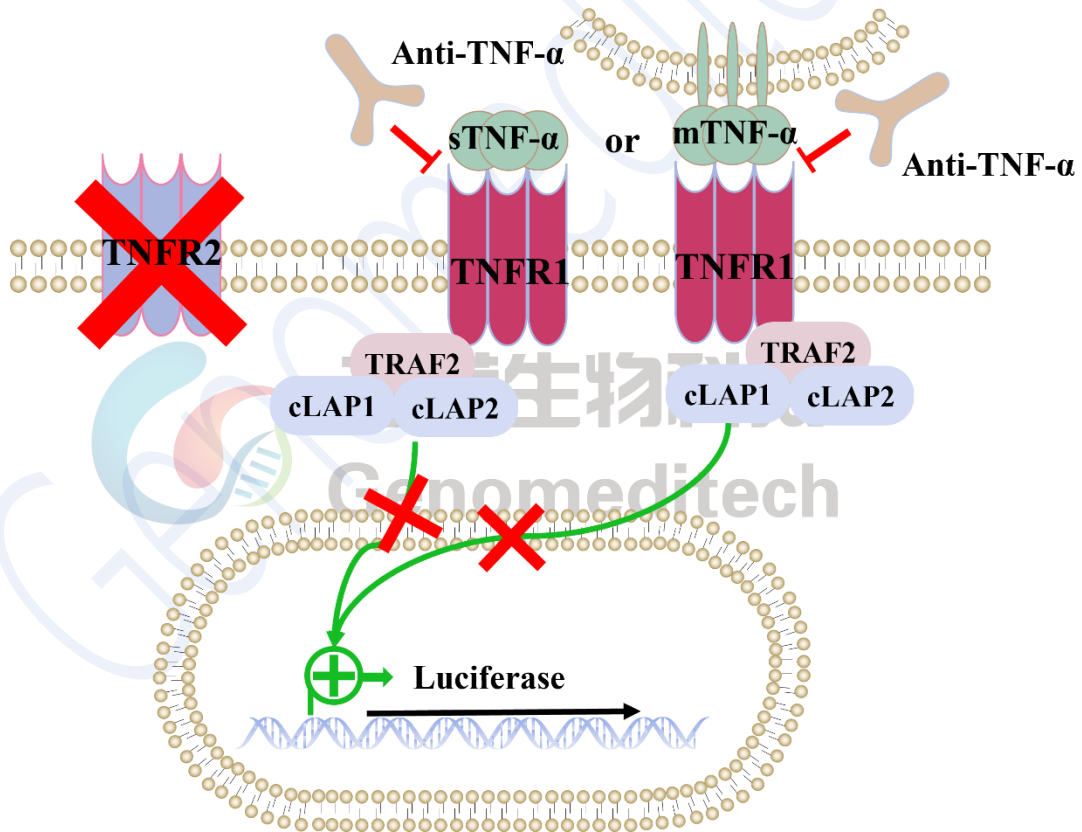


Fig 1. 原理示意图

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+1% FBS+1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell/C3010-0500
Anti-TNFR1 hIgG1 Antibody(Atrosab)	/	Genomeditech/GM-51152AB
Anti-TNF-α hIgG1 Antibody (CT-P17)	/	Genomeditech/GM-49267AB
Membrane Bound H_TNFα(cleavage-resistant) CHO-K1 Cell Line	1 管 (5E6 Cell/mL)	Genomeditech/GM-C33297
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C
Recombinant Human TNF-α	50 µg	Peptotech/300-01A

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,待细胞状态稳定后开始细胞维持和繁殖,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. 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TNFR2 Null Reporter Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human TNF- α (以下简称 human TNF- α ; 17.4 KDa) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$ ，5 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.10 分别排布在 B2-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入 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	human TNF- α	3 $\mu\text{g/mL}$	600 ng/mL	120 ng/mL	24 ng/mL	4.8 ng/mL	960 pg/mL	192 pg/mL	38.4 pg/mL	7.68 pg/mL	1.54 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

- 在实验前 1-2 h，将细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用适量 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 2×10^6 cells/mL。以排枪加 50 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖板上盖，于孵箱中孵育。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
human TNF- α	0.1 mg/mL	/	直接使用储液

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 64.63 μL 的 Assay buffer，B3-B12 加入 55 μL 的 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 4.13 μL human TNF- α ）。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 13.75 μL 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	4.13 μL human TNF- α	加入	64.63 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 13.75 μL 液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 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 孵育的细胞孔板取出。
- j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 50 μL 。
- k) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 7 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFR2 Null Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	1.54 $\mu\text{g/mL}$
	44812	1154033	42485

3) 验证结果

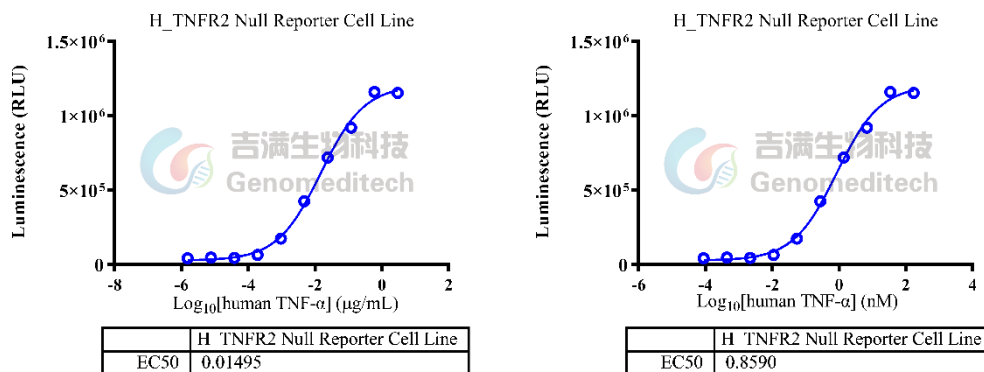


Fig.2 功能验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. TNF α 蛋白激活; Anti-TNF- α 抑制实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 H_TNFR2 Null Reporter Cell Line 细胞量为 1×10^5 Cells/孔。使用 Anti-TNF- α hIgG1 Antibody (CT-P17) (以下简称为 Anti-TNF- α ; 150 kDa) 作为阳性药物, Conc.01 终浓度为 42 $\mu\text{g/mL}$, 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.011 分别排布在 B1-B11, B12 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-TNF- α	42 $\mu\text{g/mL}$	10.5 $\mu\text{g/mL}$	2.63 $\mu\text{g/mL}$	656.25 ng/mL	164.06 ng/mL	41.02 ng/mL	10.25 ng/mL	2.56 ng/mL	640.87 pg/mL	160.22 pg/mL	40.05 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 H_TNFR2 Null Reporter 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, 再以 Assay Buffer 调整细胞浓度到 3.04×10^6 cells/mL。以排枪加 33 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL 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 B1-B11)。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-TNF- α	2.8 mg/mL	/	直接使用储液
TNF- α	100 $\mu\text{g/mL}$	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B1 孔加入 46.2 μL Assay Buffer, B2-B12 孔, 加入 36.3 μL Assay Buffer。
- 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 B1 中加入 2.2 μL Anti-TNF- α), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 12.1 μL , 加入次孔											对照孔
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	2.2 μL Anti-TNF- α	46.2 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	36.3 μL	36.3 μL
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 12.1 μL , 加入到第二个梯度稀释孔 B2, 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (B11)。
- i) 配置 3 \times 激活剂, 900 ng/mL TNF- α (取 4.4 μL 的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TNF- α 母液加入到 480 μL Assay Buffer 中, 混匀后使用)。
- j) 将配置好的激活剂加入梯度稀释的抗体中, 每孔加入 36.3 μL 混匀, 盖上盖板放入培养箱孵育 1 h。
- k) 1 h 后取出步骤 j 孵育好的混合溶液, 每孔取 66 μL 分别加入到步骤 a 的细胞孔板中, 盖上盖板, 继续孵育 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFR2 Null Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 300 ng/mL TNF- α	42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 300 ng/mL TNF- α	40.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 300 ng/mL TNF- α
	1159395	45501	1716122

3) 验证结果

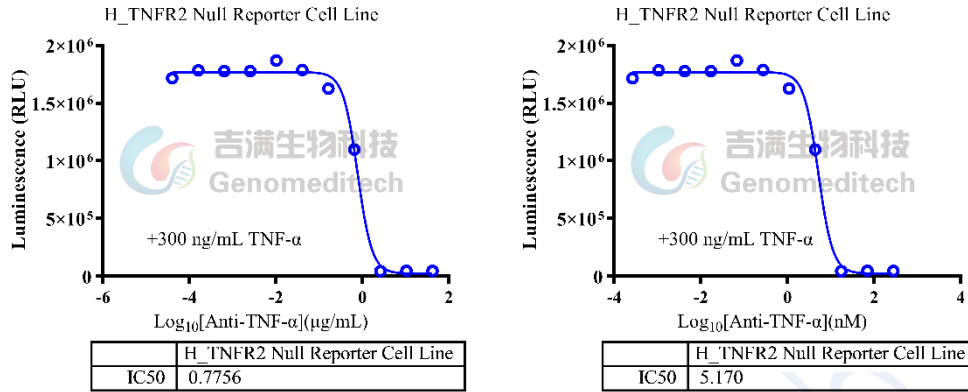


Fig 3. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

3. 共培养激活; Anti-TNF-α 抑制实验

本实验使用 1×10^5 cells/孔的 H_TNFR2 Null Reporter Cell Line 和 1.5×10^4 cells/孔的 Membrane Bound H_TNFα(cleavage-resistant) CHO-K1 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-TNF-α hIgG1 Antibody (CT-P17) (以下简称为 Anti-TNF-α; 150 kDa), 起始终浓度(Conc.01)为 30 μg/mL, 3 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.9 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-TNF-α	PBS	30 μg/mL	10 μg/mL	3.33 μg/mL	1.11 μg/mL	370.37 ng/mL	123.46 ng/mL	41.15 ng/mL	13.72 ng/mL	4.57 ng/mL	0	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS		
D													
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- a) 实验前 16–24 h, 消化离心收集 Membrane Bound H_TNFα(cleavage-resistant) CHO-K1 Cell Line, 以完全培养基重悬细胞, 计算细胞密度及活力, 通过补加完全培养

基的方式，调整细胞密度到 1.5×10^5 cells/mL，以排枪加 100 μ L 细胞/孔至中间孔，周围的孔加 100 μ L PBS，盖上市盖，于孵箱中孵育过夜。

- b) 实验前 1-2 h，离心收集 H_TNFR2 Null Reporter 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，调整细胞量到 2×10^6 cells/mL，放置于孵箱中待用。
- c) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- d) 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- e) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-TNF- α	2.8 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 B1 孔加入 80.7 μ L Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 55 μ L 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 1.77 μ L Anti-TNF- α ），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 27.5 μ L，加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.77 μ L Anti-TNF- α	加入	80.7 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5 μ L，加入到第二个稀释孔 B3，充分混匀。
- i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- j) 取出步骤 a 准备好的细胞孔板，吸弃上清 100 μ L。
- k) 然后加入步骤 i 准备好的溶液，每孔 50 μ L，孵育 1 h。
- l) 1 h 后取出，将取出步骤 k 孵育好的混合溶液孔板，加入步骤 b 准备好的 H_TNFR2 Null Reporter Cell Line，每孔 50 μ L。
- m) 盖上盖板，继续孵育 6 h。

n) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFR2 Null Reporter Cell Line + Membrane Bound H_TNF α (cleavage-resistant) CHO-K1 Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	4.57 ng/mL
	2223459	104019	2396502

3) 验证结果

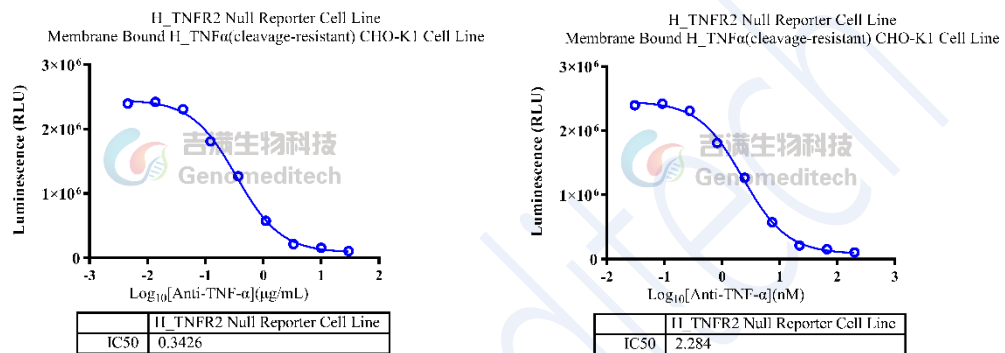


Fig 4. 功能验证结果

(右图对抗体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

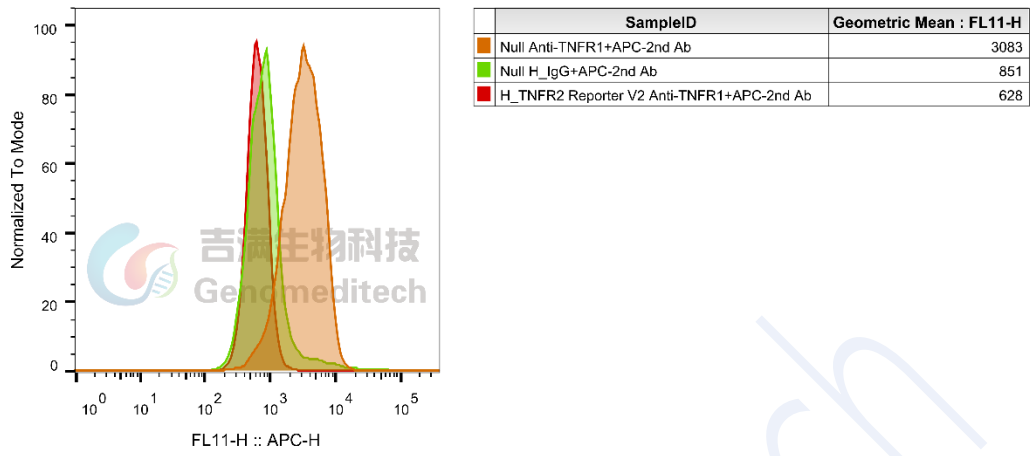


Fig 5. H_TNFR2 Null Reporter Cell Line 和 H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line (Genomeditech/GM-C25776) 使用 Anti-TNFR1 hIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-51152AB) 抗体流式验证 TNFR1 的敲除效果

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