

产品手册

TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+)

TCR Knockout Reporter 细胞系(CD4+)

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.1

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.....	6
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	6
2.	试剂耗材准备.....	6
五、	细胞复苏、传代、冻存.....	7
1.	细胞复苏.....	7
2.	细胞传代（以 10 cm 皿为例）.....	7
3.	细胞冻存.....	7
六、	使用方法.....	8
1.	Assay 实验.....	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	10
	使用许可协议：.....	11
	附录.....	12

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-C28018	TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+)	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C28018	TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+)	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

过继性 T 细胞免疫疗法 (TCR-T) 是一种癌症治疗策略, 通过引入抗原受体使基因修饰的 T 细胞能够特异性靶向肿瘤抗原, 提高其对肿瘤的认识和摧毁能力。TCR-T 通过同种异体或自体 T 细胞工程表达转基因 TCR。TCR 已经进化出对相对较低水平的抗原有效响应, 并且可以通过主要组织相容性复合物 (MHC) 系统识别几乎任何蛋白质, 使得 TCR 对改变的自身 (肿瘤相关) 或病原源性抗原非常敏感。

TCR 复合物由 TCR alpha (α) 和 beta (β) 链与辅助信号分子 (如 CD3) 结合而成。单个 T 细胞通常表达一个 α 链和一个 β 链, 这是由于发育过程中 TCR 基因重排所致。引入外源性的 TCR α 和 β 链会导致混合型的 TCR 复合物形成 (例如来自内源性 TCR 的 α 链, 来自外源性 TCR 的 β 链)。由于其特征, 混合型的 $\alpha\beta$ TCR 会改变抗原特异性。此外, 内源性和外源性 TCR 链之间的错配会降低“首选”外源性 TCR 的配对数量, 从而减少对相应抗原的识别能力。

CD4 和 CD8 是 T 细胞的共受体, 它们结合到 MHC 上的非多态区域, 从而增强对低亲和力和 TCR 或对低水平抗原反应的 TCR 的信号和敏感性。CD4 通常表达在辅助和调节性 T 细胞上, 与专业抗原递呈细胞 (APC) 表达的 MHCII 结合。相比之下, CD8 通常表达在细胞毒性 T 细胞上, 并与所有体细胞表达的 MHCI 结合。MHCII 通常呈现外源性 (例如病原体来源) 抗原, 而 MHCI 则呈现内源性 (例如自身 (肿瘤) 或病毒) 抗原。

由于依赖供体 T 细胞、复杂实验方案以及未经验证试剂盒等限制, TCR-T 的常规检测方法非常耗时且结果变异较大。此外, 原代 T 细胞内源表达的 TCR 也可能对结果造成干扰。

吉满生物 TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+) 报告基因细胞系, 通过敲除 Jurkat T 细胞内源性表达的 TCR α 和 β 链, 额外表达一个由 TCR 信号通路依赖启动子驱动的荧光素酶报告基因组成。研究者仅需将待测 TCR 复合物引入此细胞中形成转基因 TCR 细胞, 通过同源多肽和表达 MHC 的 APC 细胞激活转基因 TCR 细胞, 然后在一定时间后对荧光素酶进行定量即可。该细胞系克服了现有测定的局限性, 在不受内源性 TCR 表达的影响下, 高效、稳定、方便的评估转基因 TCR 复合物激活 T 细胞的效力。

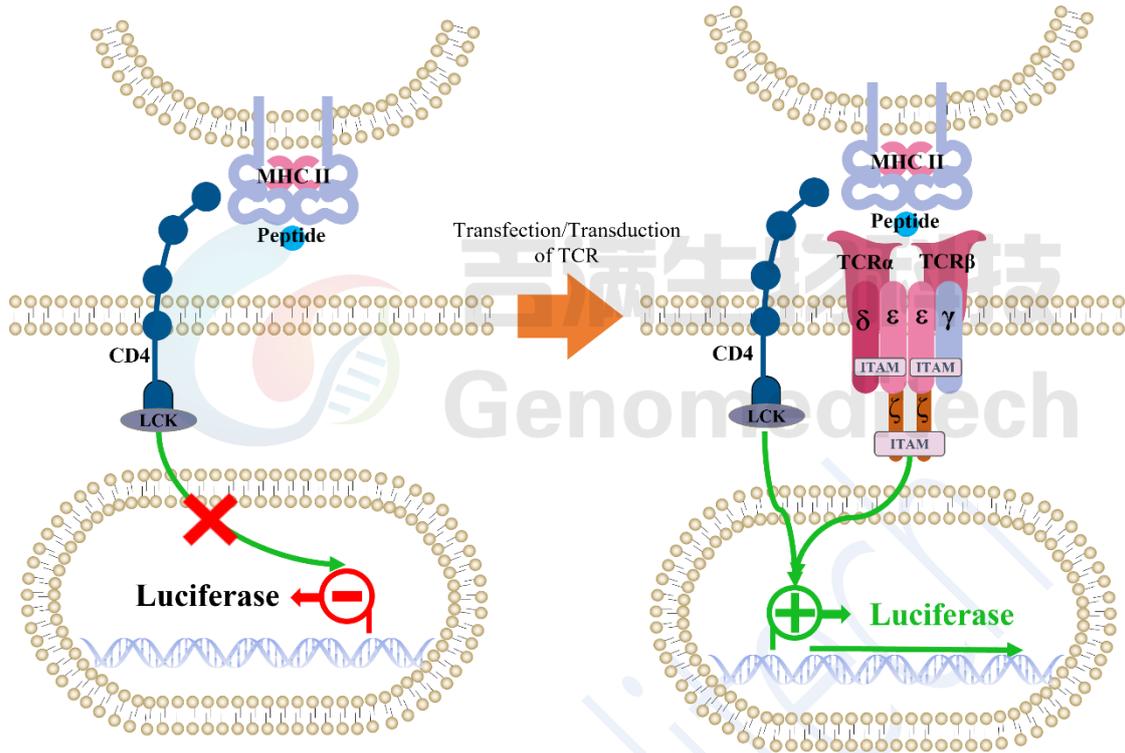


Fig 1. 原理示意图

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+400 µg/mL G418+200 µg/mL Hygromycin
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.
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
G418 Sulfate	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell/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 Microplate	96-well	Corning/3912
NY-ESO-1 Peptide (157-165)	/	GenScript
H_HLA-A*02:01 CHO-K1 Cell Line	/	Genomeditech
Endogenous TCR Reporter Cell Line(CD4+)		Genomeditech
NY-ESO-1- Specific TCR-Puro Lentivirus	/	Genomeditech
Anti-H_CD4 hIgG1 Antibody(Tregalizumab)	/	Genomeditech/ GM-28752AB
Anti-CD3 epsilon Antibody [OKT-3 (muromonab)]	/	Genomeditech/ GM-51478AB
PE anti-human CD8a Antibody	/	BioLegend/300907
PE/Cyanine7 anti-human TCR α/β Antibody	/	BioLegend/306719
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
流式细胞仪	贝克曼库尔特国际贸易（上海）有限公司/CytoFLEX

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 4-6 × 10⁵ 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 × 10⁶ 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。

- 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 × 10⁶ cells/mL, 1 传 3, 隔 2-3 天继续传代,不要让其密度超 2 × 10⁶ 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. Assay 实验

正式实验前 2 周, TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+)细胞感染 EF1 α -NY-ESO-1-Specific TCR Lentivirus, 待药筛稳定后获得 NY-ESO-1-Specific TCR Reporter Jurkat(TCR KO) Cell Line(CD4+)细胞。

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+)、NY-ESO-1-Specific TCR Reporter Jurkat(TCR KO) Cell Line(CD4+)和 Endogenous TCR Reporter Cell Line(CD4+)细胞量为 1×10^5 cells/孔, H_HLA-A*02:01 CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 NY-ESO-1 Peptide (157-165) (后续简称为 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅) 作为阳性药物, Conc.01 终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$, 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 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	NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅	30 $\mu\text{g/mL}$	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	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 16-24 h, 将 H_HLA-A*02:01 CHO-K1 Cell Line 从培养瓶中取出, 消化离心收集细胞沉淀, 使用适量完全培养基重悬细胞, 检测细胞活力并计数, 再以完全培养基调整细胞浓度为 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上班盖, 于孵箱中孵育过夜使用。
- 实验前 1-2 h, 离心收集 TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+)、NY-ESO-1-Specific TCR Reporter Jurkat(TCR KO) Cell Line(CD4+)和 Endogenous TCR Reporter Cell Line(CD4+), 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 2×10^6 cells/mL, 于孵箱中孵育待用。

- c) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- d) 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。
- e) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅	1 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 B2 孔加入 232.65 μ L Assay Buffer，B3-B10 孔，加入 165 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 14.85 μ L NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 82.5 μ L，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	14.85 μ L NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅	加入	232.65 μ L	165 μ L									
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 82.5 μ L，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 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 90 μ L 培养基。
- k) 加入步骤 b 准备好的细胞，每孔 50 μ L。再加入步骤 h 准备好的梯度稀释液，每孔 50 μ L。盖上班盖，于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中孵育 6 h。
- l) 使用 GMOne-step 报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+)	0 μ g/mL	30 μ g/mL	4.57 ng/mL
	5979	6938	5779
NY-ESO-1-Specific TCR Reporter Jurkat(TCR KO) Cell Line(CD4+)	0 μ g/mL	30 μ g/mL	4.57 ng/mL
	5319	208617	7338
Endogenous TCR Reporter Cell Line(CD4+)	0 μ g/mL	30 μ g/mL	4.57 ng/mL
	15129	12486	10658

3) 验证结果

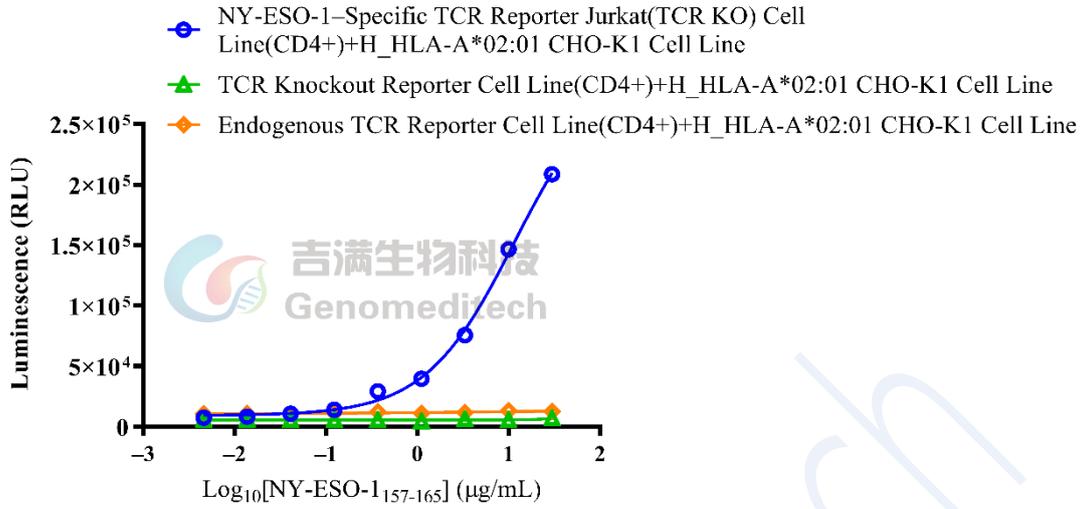


Fig 2. NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 激活验证结果

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

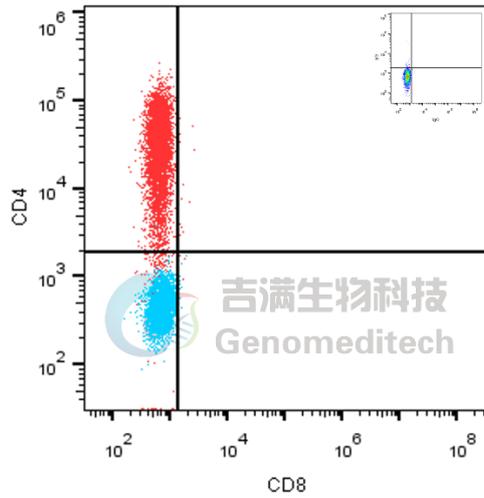


Fig 3. 使用 Anti-H_CD4 hIgG1 Antibody(Tregalizumab) (Genomeditech/ GM-28752AB)流式验证 CD4 表达, 使用 PE anti-human CD8a Antibody (BioLegend/300907)流式验证 CD8 不表达

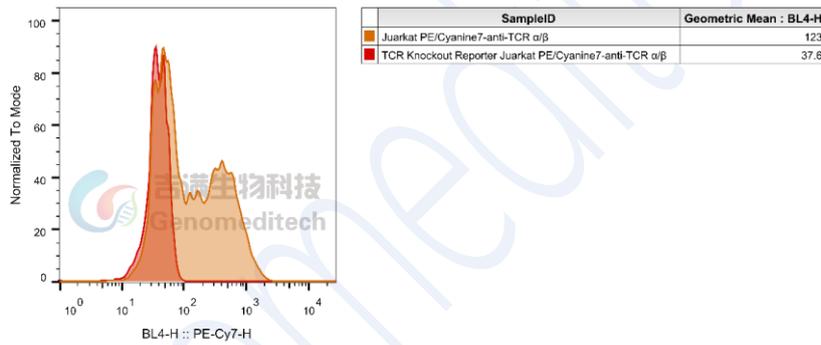


Fig 4. 使用 PE/Cyanine7 anti-human TCR α/β Antibody (BioLegend/306719)验证 TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+)已敲除内源性表达 TCR α/β 链

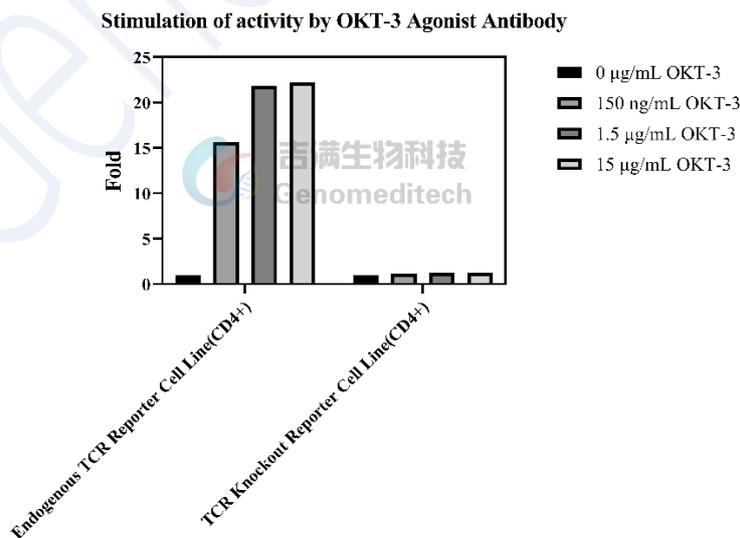


Fig 5. 使用 Anti-CD3 epsilon Antibody [OKT-3 (muromonab)] (Genomeditech/ GM-51478AB)验证 TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+)无法被 OKT-3 激活