

产品手册

Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat Cell Line

Mouse_TNFRSF25(DR3) 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：V2.9.3

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-DR3 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.	Mouse_TNFSF15(TL1A) HEK-293 激活, Anti-TL1A 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.	H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 激活, Anti-TL1A 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-C30291	Mouse_TNFRSF25(DR3) 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-C30291	Mouse_TNFRSF25(DR3) 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(TNF)样配体1A(TL1A)是细胞因子的TNF家族的成员，也称为TNFSF15。主要由内皮细胞表达。在T细胞中，TL1A充当共刺激剂，在体外和体内增加IL-2反应性和促炎细胞因子的分泌。TL1A是其受体“死亡受体3”(DR3，也称为TNFRSF25)的唯一已知配体。DR3是含有死亡结构域的肿瘤坏死因子家族受体，与TNFR1具有高度同源性，在T细胞活化过程中表达上调，并诱导细胞凋亡。DR3和TL1A之间的相互作用可以通过阻断TL1A和DR3的结合来实现。因此，TL1A/DR3可作为治疗慢性免疫疾病药物的重要潜在靶点。此外，也有研究发现，DR3激动型抗体可以在肿瘤抗原存在的情况下，在小鼠黑色素瘤模型中降低调节性T细胞的抑制活性并增强CD4+ T细胞的效应，因此DR3激动剂可作为治疗实体瘤的潜在药物。

吉满生物Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat Cell Line是一种Luciferase报告基因细胞系。其具有两种应用场景：第一，可通过加入DR3激动型药物，激活报告基因细胞下游信号通路，通过测定荧光信号确定荧光素酶（Luciferase）的表达，可用于筛选或验证靶向DR3的激动型药物；第二，可通过加入TL1A的拮抗型抗体，阻断由TL1A膜表达细胞激活的小鼠DR3下游信号，通过测定荧光信号确定荧光素酶（Luciferase）的表达，可用于筛选或验证靶向TL1A的拮抗型药物。

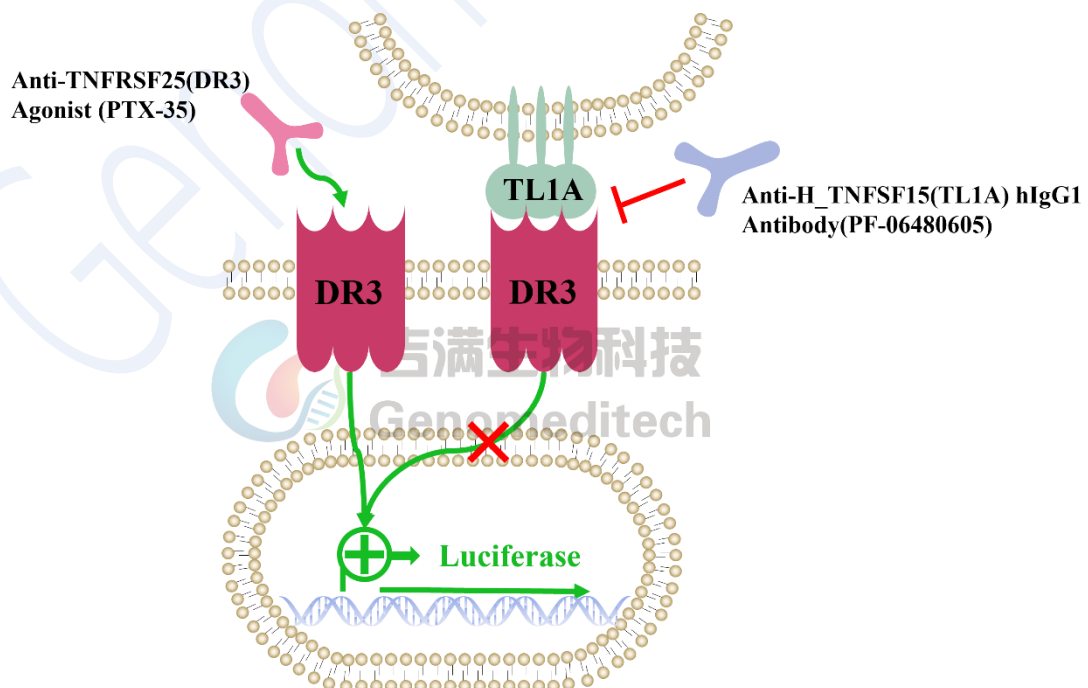


Fig 1. TL1A/DR3 作用原理

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.
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/ GM-040401-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell BIOSCIENCES/ C3010-0500
Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates	96-well	Thermo/442404
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Anti-H_TNFSF15(TL1A) hIgG1 Antibody(PF-06480605)	10 µg	Genomeditech/GM-59479AB-10
Anti-TNFRSF25(DR3) hIgG1 Antibody(PTX-35)	/	Genomeditech/GM-58913AB
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
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax Paradigm

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 × 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

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 × 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。
- 细胞刚复苏时,细胞状态会比较差,属于正常现象;经调整会有好转,状态稳定后,细胞生长速度趋于稳定。

六、使用方法

1. Anti-DR3 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Anti-TNFRSF25(DR3) hIgG1 Antibody(PTX-35) (以下简称 PTX-35; 150 KDa) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ ，4 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	PTX-35	PBS	50 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	3.13 $\mu\text{g/mL}$	781.25 ng/mL	195.31 ng/mL	48.83 ng/mL	12.21 ng/mL	3.05 ng/mL	762.94 pg/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

- 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 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。盖上市盖，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
PTX-35	4.09 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 71.54 μL 的 Assay buffer，B3-B11 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 1.79 μL PTX-35）。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.33 μL 加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.79 μL PTX-35	加入	71.54 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 18.33 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 9 个梯度稀释孔（B10）。
- i) 将步骤 a 孵育的孔板取出。
- 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) 收样使用 GMOne-Step 试剂盒检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat Cell	0 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	47.68 $\mu\text{g/mL}$
Line	2174	7496	2553

3) 验证结果

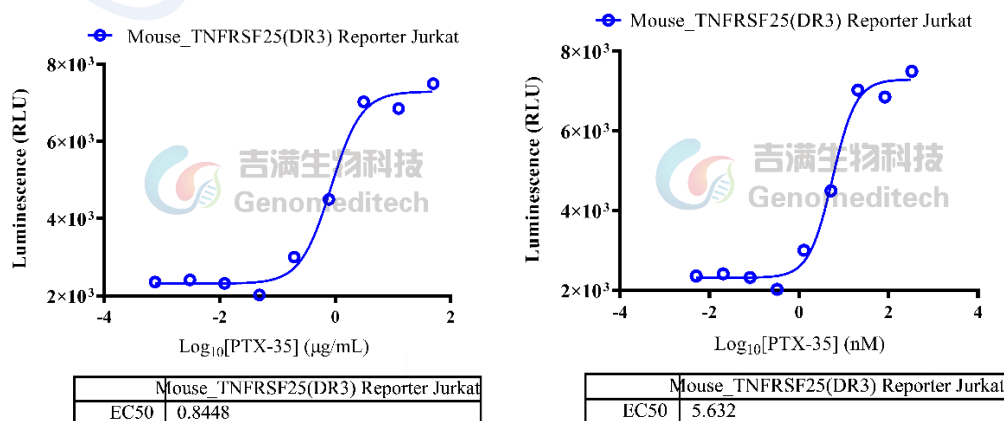


Fig.2 功能验证结果（使用 SpectraMax L 检测）（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. Mouse_TNFSF15(TL1A) HEK-293 激活, Anti-TL1A 抑制实验

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat Cell Line 和 1×10^4 cells/Well 的 Mouse_TNFSF15(TL1A) HEK-293 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-H_TNFSF15(TL1A) hIgG1 Antibody(PF-06480605) (以下简称 PF-06480605;150 kDa), 起始浓度(Conc.01)为 30 $\mu\text{g/mL}$, 4 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	PF-06480605	30 $\mu\text{g/mL}$	7.5 $\mu\text{g/mL}$	1.88 $\mu\text{g/mL}$	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.3 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 pg/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, 消化离心收集 Mouse_TNFSF15(TL1A) HEK-293 Cell Line 细胞, 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, 调整细胞密度到 1×10^5 cells/mL, 以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔, 周围的孔加 100 μL PBS, 盖板上盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2h, 离心收集 Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat 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 Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat Cell Line 到 2×10^6 cells/mL。
- 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-B10)。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
PF-06480605	2.766 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 71.74 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 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 1.59 μL PF-06480605），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.33 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.59 μL PF-06480605	加入	71.74 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													

- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.33 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) 取出步骤 a 准备好的 Mouse_TNFSF15(TL1A) HEK-293 Cell Line 细胞孔板，吸弃上清 100 μL ；然后将步骤 i 准备好的药物各取出 50 μL ，加入到步骤 a 的 Mouse_TNFSF15(TL1A) HEK-293 Cell Line 细胞孔板中，孵育 1 h。
- k) 1 h 后将步骤 b 准备好的 Mouse_TNFSF15(TL1A) Reporter Jurkat Cell Line 细胞取出，吸取 50 μL 分别加入步骤 j 孵育好的混合液中，盖上盖板，继续孵育 7 h。
- l) 收样使用 GMOne-Step 试剂盒检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	457.76 pg/mL
Jurkat Cell Line	251054	1458	227607

3) 验证结果

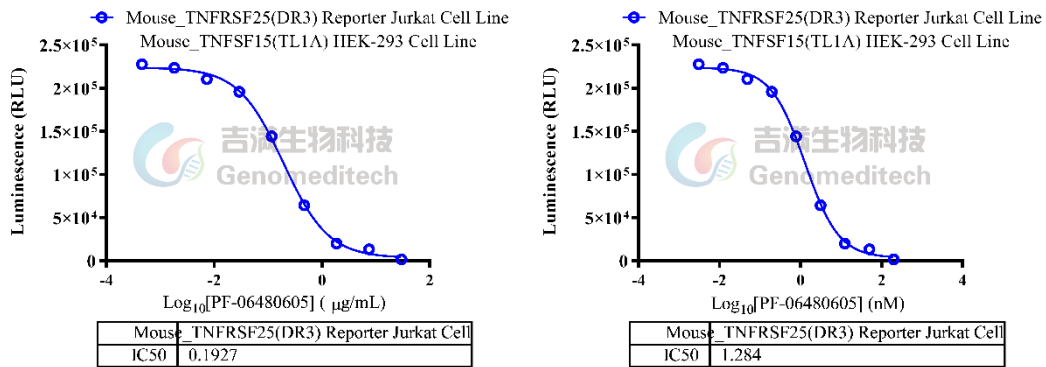


Fig 3. 功能验证结果（使用 SpectraMax L 检测）
（右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

3. H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 激活，Anti-TL1A 抑制实验

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat Cell Line 和 2×10^3 cells/Well 的 H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-H_TNFSF15(TL1A) hIgG1 Antibody(PF-06480605)（以下简称 PF-06480605;150 kDa），起始浓度(Conc.01)为 100 µg/mL，3 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	PF-06480605 100 µg/mL	33.33 µg/mL	11.11 µg/mL	3.7 µg/mL	1.23 µg/mL	411.52 ng/mL	137.17 ng/mL	45.72 ng/mL	15.24 ng/mL	5.08 ng/mL	1.69 ng/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

- a) 实验前 16 -24 h，消化离心收集 H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 Cell Line 细胞，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，调整细胞密度到 2×10^4 cells/mL，以排枪加 100 µL 细胞/孔至中间孔，周围的孔加 100 µL PBS，盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。

- b) 实验前 1-2 h, 离心收集 Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat 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 Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat Cell Line 到 2×10^6 cells/mL。
- 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 B1-B11)。
- e) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
PF-06480605	3.04 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 77.07 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 B1 中加入 5.43 μ L PF-06480605), 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	5.43 μ L PF-06480605 加入	77.07 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	55 μ L
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- h) 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 27.5 μ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B2, 充分混匀。
- i) 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (B11)。
- j) 取出步骤 a 准备好的 H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 Cell Line 细胞孔板, 吸弃上清 100 μ L; 然后将步骤 i 准备好的药物各取出 50 μ L, 加入到步骤 a 的 H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 Cell Line 细胞孔板中, 孵育 1 h。
- k) 1 h 后将步骤 b 准备好的 Mouse_TNFSF15(TL1A) Reporter Jurkat Cell Line 细胞取出, 吸取 50 μ L 分别加入步骤 j 孵育好的混合液中, 盖上盖板, 继续孵育 6 h。
- l) 收样使用 GMOne-Step 试剂盒检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	1.69 ng/mL
	5436	209	5007

3) 验证结果

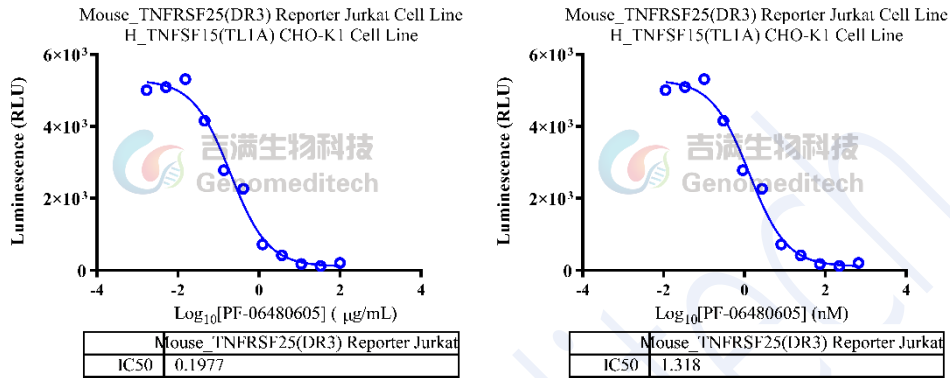


Fig 4. 功能验证结果（使用 SpectraMax Paradigm 检测）
 （右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

附录 1：流式验证结果

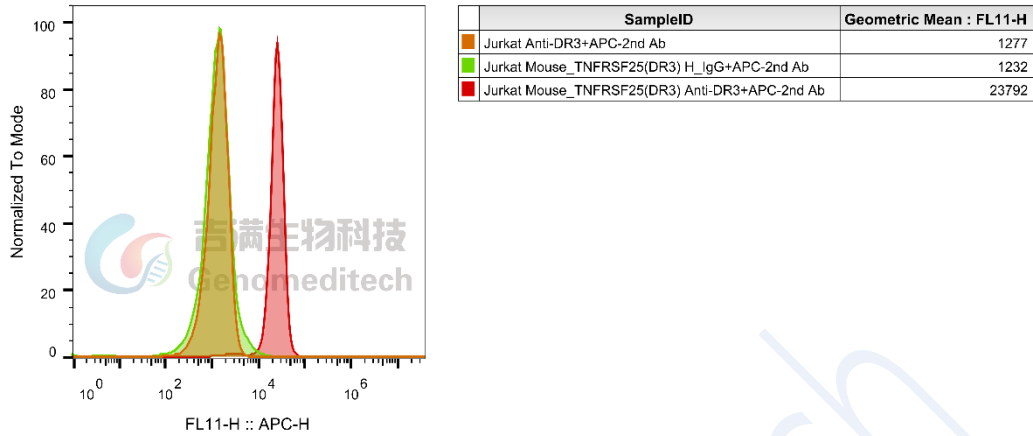


Fig 5. Mouse_TNFRSF25(DR3) Reporter Jurkat Cell Line 细胞使用 Anti-TNFRSF25(DR3) hIgG1
 Antibody(PTX-35) (Genomeditech/GM-58913AB) 流式验证结果

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