

产品手册

H_TREM1 Blockade Reporter Jurkat Cell Line

H_TREM1 Blockade 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：V2.12.3

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.	PGLYRP1 激活验证实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	9
附录 1	功能稳定性验证	10
附录 2	流式稳定性验证	10
附录 3	抗体激活验证	11
附录 4	抗体 block 验证	11
相关产品		12
使用许可协议:		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-C15720	H_TREM1 Blockade 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-C15720	H_TREM1 Blockade 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

在骨髓细胞上表达的触发受体 1 (TREM-1) 是一种由 TREM1 基因编码的蛋白质。单核细胞/巨噬细胞和中性粒细胞介导的炎症反应可被多种受体刺激产生，包括 G 蛋白偶联受体（例如，FPR1）、Fc 受体、CD14、Toll 样受体（TLR；例如，TLR4）和细胞因子受体。TREM-1 通过进一步增加促炎细胞因子的产生来放大 toll 样受体诱导的炎症。

TREM-1 与同型二聚体 DAP12 结合，导致其上的免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM) 被酪氨酸激酶磷酸化。从而募集脾酪氨酸激酶 SYK 和 ZAP70，从而激活 PLC 通路，提高细胞内 Ca^{2+} 浓度，诱导抗炎细胞因子反应，导致转录因子被激活。

吉满生物 H_TREM1 Blockade Reporter Jurkat Cell Line 报告基因细胞系，是基于 PLC 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。通过转录因子的激活，从而激活荧光素酶（Luciferase）的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 TREM1 相关药物的体外效果评价。

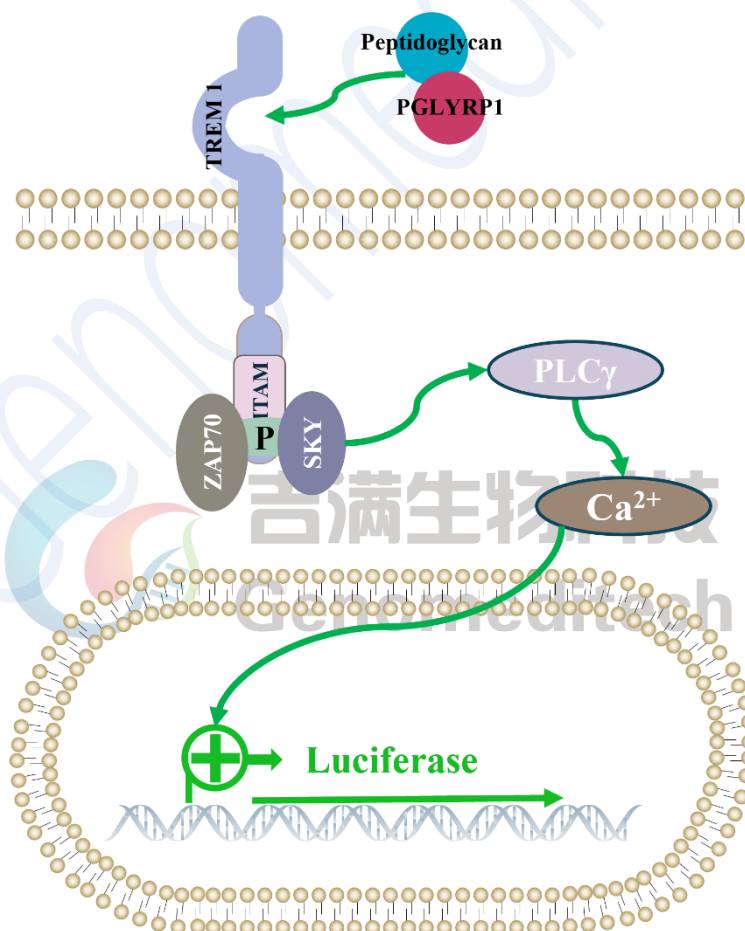


Fig1.TREM1 原理图

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+0.75 µg/mL Puromycin+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.
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	ExCell/FSP500
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates	96-well	Thermo/442404
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Anti-H_TREM1 hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-26835AB
Human PGLYRP1 Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-87969RP
Peptidoglycan		ABMole/M21611
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C

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， $176 \times g$ ，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 $176 \times g$ ，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。
- FBS 血清需 56°C 加热 30 分钟，可灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

六、 使用方法

1. PGLYRP1 激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TREM1 Blockade Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Human PGLYRP1 Protein; His Tag（以下简称 PGLYRP1，分子量：20 kDa）作为阳性药物，Peptidoglycan 定浓为 $1 \mu\text{g/mL}$ 。PGLYRP1 的 Conc.01 浓度为 $40 \mu\text{g/mL}$ ，2 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 $100 \mu\text{L}$ 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	
B	PGLYRP1	PBS	40 μg/mL	20 μg/mL	10 μg/mL	5 μg/mL	2.5 μg/mL	1.25 μg/mL	625 ng/mL	312.5 ng/mL	156.25 ng/mL	78.13 ng/mL	0
C		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 H_TREM1 Blockade Reporter Jurkat Cell Line，使用适量的 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，调整细胞浓度为 3.03×10^6 cells/mL。以排枪加 $33 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育备用。
- 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
PGLYRP1	1.4 mg/mL	/	直接使用储液
Peptidoglycan	1.19 mg/mL	/	直接使用储液

e) 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 66.97 μL 的 Assay buffer, B3-B10 加入 36.6 μL 的 Assay Buffer。

f) 吸取 6.29 μL 待测样品母液, 加入到第一个梯度稀释孔中 (如 B2), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 36.6 μL , 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	6.29 μL PGLYRP1	加入	66.97 μL	36.6 μL	36.6 μL	36.6 μL	36.6 μL	36.6 μL	36.6 μL	36.6 μL	36.6 μL	0	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

g) 从第一个梯度稀释孔 (如 B2 孔) 中吸取 36.6 μL 液体, 加入到第二个稀释孔中 (如 B3), 充分混匀。

h) 以此类推, 直至 B10 孔。B11 为不加药物的对照。

i) 配置 Peptidoglycan 激活药物 (激活浓度 $\times 3$): 取 3.7 μL 母液加入 1428.23 μL Assay Buffer 混匀。

j) 取出步骤 a 准备好的细胞孔板, 然后加入步骤 h 准备好的 PGLYRP1 激活剂, 每孔 33.3 μL 。再加入步骤 i 准备好的 Peptidoglycan, 每孔 33.3 μL 。

k) 盖上检测板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱继续孵育 6 h。

l) 使用报告基因检测试剂盒, 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TREM1 Blockade Reporter Jurkat Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{g/mL}$	78.13 ng/mL
	6845	298812	6039

3) 验证结果

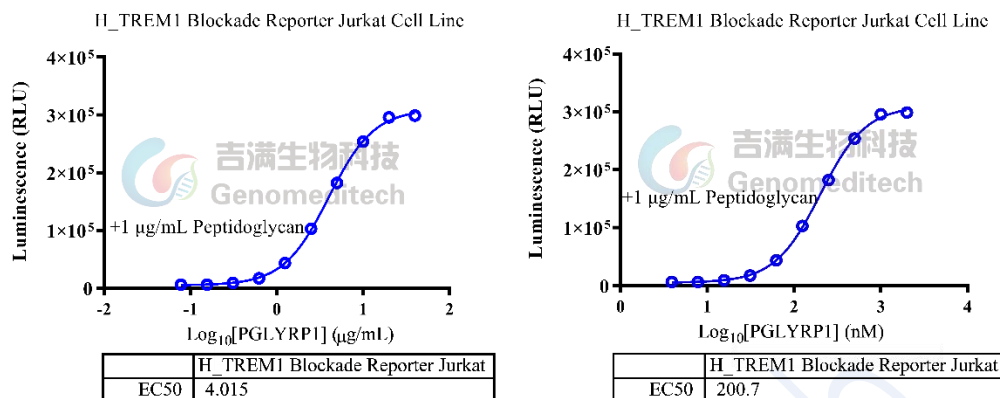


Fig 2.功能验证结果

(右图对药物或抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1 功能稳定性验证

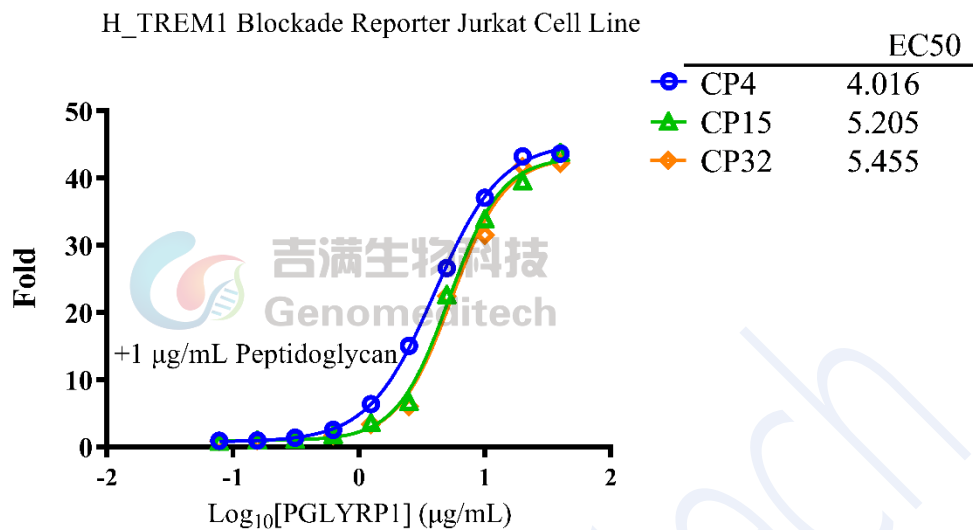


Fig 3.使用 PGLYRP1 (Genomeditech/GM-87969RP) 和 Peptidoglycan (ABMole/M21611) 稳定性验证结果

附录 2 流式稳定性验证

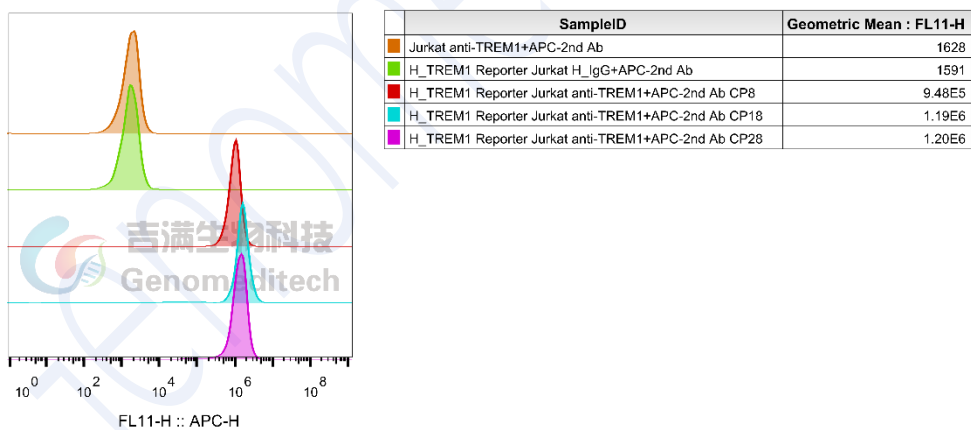


Fig 4.使用 Genomeditech/GM-26835AB: Anti-H_TREM1 hIgG1 Antibody 抗体稳定性验证结果

附录 3 抗体激活验证

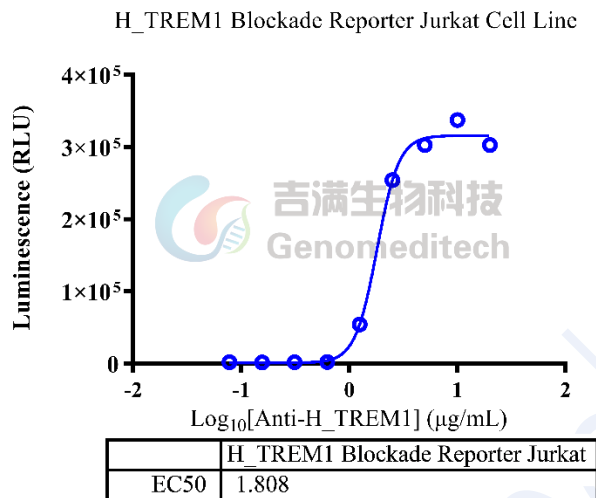


Fig 5.使用使用 Anti-TREM1 hIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-26835AB) 包被激活验证结果。

附录 4 抗体 block 验证

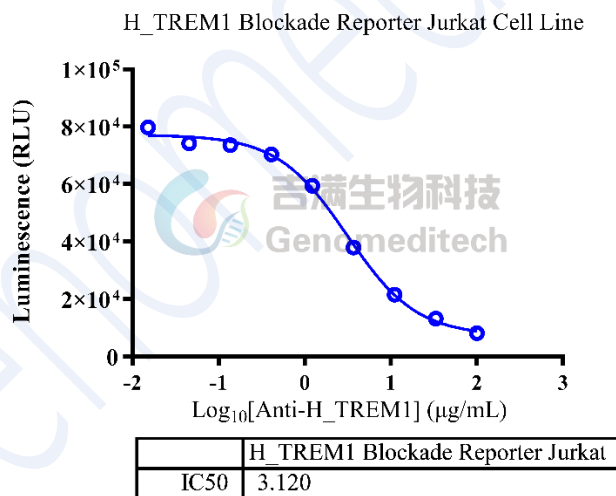


Fig 6. 使用包被固定过夜的 Anti-TREM1 hIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-26835AB) 抗体作为激活剂，然后使用游离 Anti-TREM1 hIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-26835AB) 抗体作为竞争性阻断剂验证。

相关产品

TREM1	
Cynomolgus_TREM1 CHO-K1 Cell Line	Cynomolgus_TREM1 HEK-293 Cell Line
H_TREM1 CHO-K1 Cell Line	H_TREM1 HEK-293 Cell Line
Mouse_TREM1 CHO-K1 Cell Line	
Anti-TREM1 hIgG1 Antibody	
Human PGLYRP1 Protein; His Tag	
TREM2	
H_TREM2 Reporter Jurkat Cell Line	Cynomolgus_TREM2 CHO-K1 Cell Line
Cynomolgus_TREM2 HEK-293 Cell Line	H_TREM2 CHO-K1 Cell Line
H_TREM2 HEK-293 Cell Line	Mouse_TREM2 HEK-293 Cell Line
Anti-H_TREM2 hIgG4 Antibody	Anti-H_TREM2 Rat_IgG2b Antibody
Anti-TREM2 hIgG1 Antibody	

使用许可协议:

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策：

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。