

产品手册

ADCC M_FcγRIV Jurkat Effector Cell Line

ADCC M_FcγRIV Jurkat 效应细胞

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.4

Genomeditech

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.	Assay 试剂耗材准备.....	6
五、	细胞培养、复苏、冻存.....	7
1.	细胞复苏.....	7
2.	细胞传代.....	7
3.	细胞冻存.....	7
六、	使用方法.....	8
	以靶细胞为贴壁细胞举例说明.....	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

Genomeditech

一、 产品基本信息及组分

基本信息

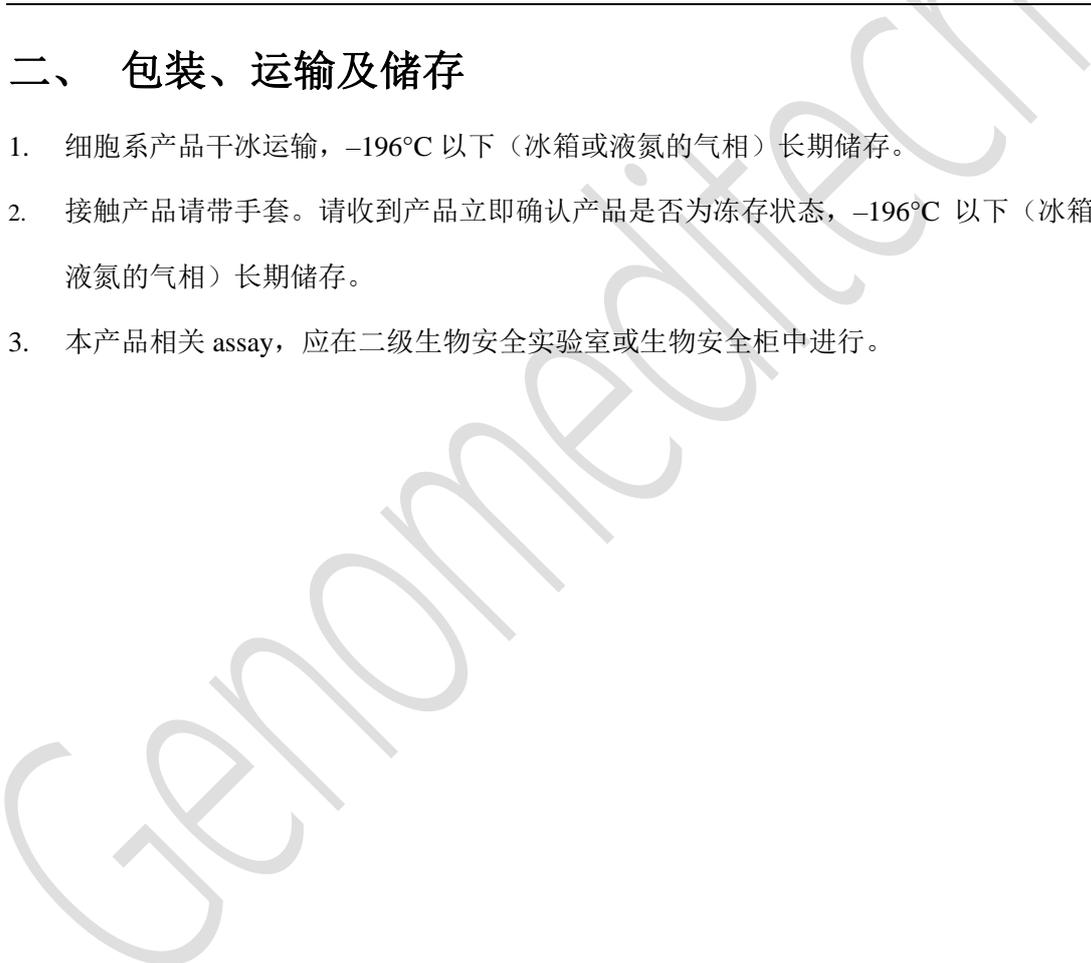
产品编号	产品名称	规格
GM-C09105	ADCC M_FcγRIV Jurkat Effector Cell Line	5E6 Cell/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C09105	ADCC M_FcγRIV Jurkat Effector Cell Line	5E6 Cell/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

ADCC 即抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 是指表达 Fc 受体的免疫细胞通过识别抗体的 Fc 段直接杀伤与抗体特异性结合的靶细胞的作用。现如今, ADCC 作用机制被用来检测、评定抗体或靶细胞的功效。抗体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 (主要为自然杀伤细胞, natural killer cells) 表面的 Fc γ RIV 受体上 (小鼠 Fc γ RIV 是参与小鼠 ADCC 的主要受体, 与人 Fc γ RIIIa 更为接近), 两种类型的细胞即发生多重交联, 导致 ADCC 作用机制通路的激活。靶细胞的杀伤是此活化途径的终点, 这一指标被用在经典的 ADCC 生物活性检测中, 这些经典的检测方法利用供者的外周血单核细胞 (PBMC) 或自然杀伤 (NK) 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。

ADCC Reporter 细胞系选择了 ADCC 作用机制通路激活过程中较早的事件作为检测的读出指标: 即效应细胞中由 NFAT (活化 T 细胞核因子) 通路介导的基因转录的激活。此外, ADCC 报告基因检测试剂盒使用工程改造的 Jurkat 细胞作为效应细胞, 该细胞稳定表达了小鼠 Fc γ RIV 受体和由 NFAT 应答元件驱动表达的萤火虫萤光素酶。抗体在 ADCC 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。检测的信号值高, 且背景很低。

吉满生物依靠多年研究经验, 利用巧妙的载体设计和第三代慢病毒报告基因系统, 推出 ADCC 相关细胞系和 ADCC 活性检测服务, 并可接受 ADCC 细胞系定制服务。

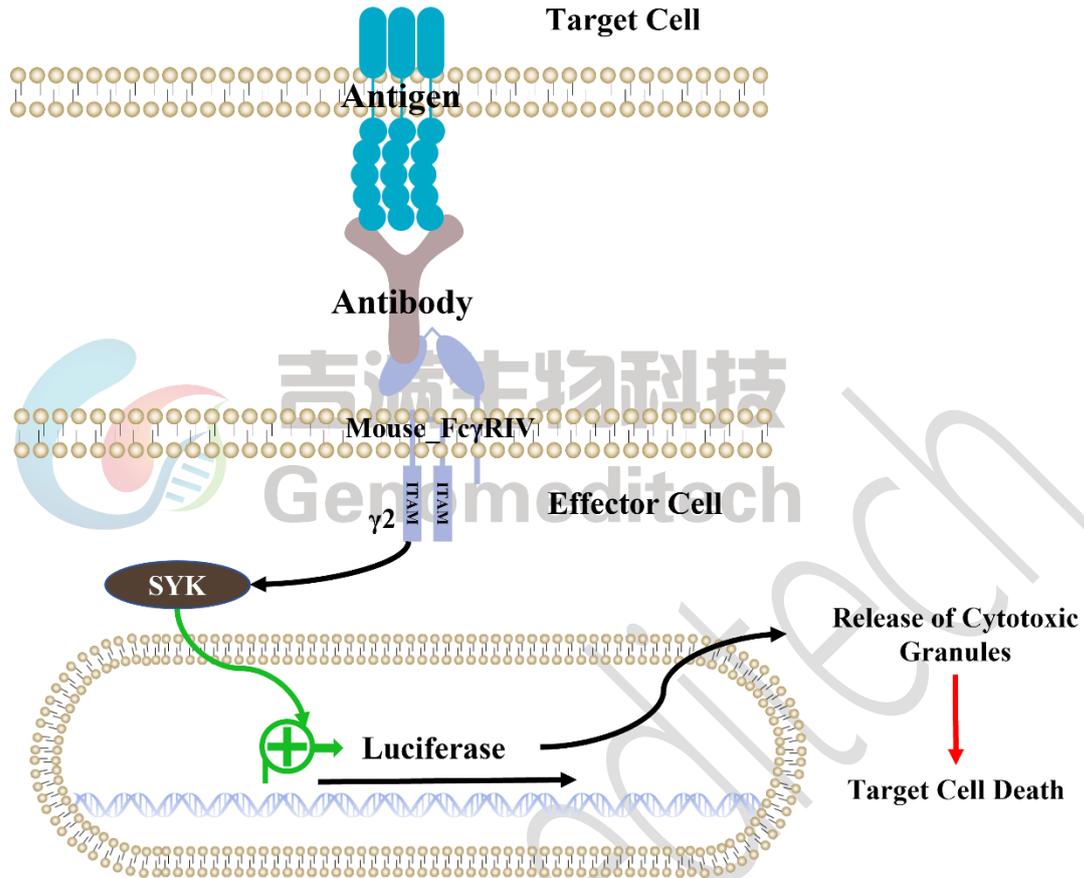


Fig 1.原理示意图

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+0.75 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640+1% FBS+1% P.S

2. Assay 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/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
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C
H_ALPPL2(ALPG) HEK-293 Cell Line	1 管 (5E6 Cell/mL)	Genomeditech/GM-C26399
Anti-ALPPL2 mIgG2a antibody(SGN-ALPV)	/	Genomeditech/GM-58773AB

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

五、 细胞培养、复苏、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

以靶细胞为贴壁细胞举例说明

本实验使用 1.5×10^5 cells/孔的 ADCC M_Fc γ RIV Jurkat Effector Cell Line 和 1.5×10^4 cells/Well 的 H_ALPPL2(ALPG) HEK-293 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-ALPPL2 mIgG2a antibody(SGN-ALPV) (以下简称为 Anti-ALPPL2;150 kDa), 起始终浓度(Conc.01)为 10 μ g/mL, 5 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 μ L 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-ALPPL2	PBS	10 μ g/mL	2 μ g/mL	400 ng/mL	80 ng/mL	16 ng/mL	3.2 ng/mL	640 pg/mL	128 pg/mL	25.6 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 H_ALPPL2(ALPG) HEK-293 Cell Line 细胞, 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, 盖板上板盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h, 离心收集 ADCC M_Fc γ RIV Jurkat Effector 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 ADCC M_Fc γ RIV Jurkat Effector Cell Line 到 3×10^6 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
Anti-ALPPL2	4.59 mg/mL	0.459 mg/mL	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer

- f) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 70.14 μ L Assay Buffer，B3-B11 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 3.2 μ L Anti-ALPPL2），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 13.75 μ L，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	3.2 μ L Anti-ALPPL2	加入	70.14 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 13.75 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 H_ALPPL2(ALPG) HEK-293 Cell Line 细胞孔板，吸弃上清 100 μ L。
- k) 每孔各加入步骤 b 准备好的 ADCC M_Fc γ RIV Jurkat Effector Cell Line 细胞 50 μ L，然后再加入步骤 i 准备好的溶液，每孔各 50 μ L，盖上盖板，
- l) 孵育 6 h。
- m) 收样检测 Luciferase。

2. 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

ADCC M_Fc γ RIV Jurkat Effector Cell Line + H_ALPPL2(ALPG) HEK-293 Cell Line	0 μ g/mL	10 μ g/mL	25.6 pg/mL
	12503	5532736	11076

3. 验证结果

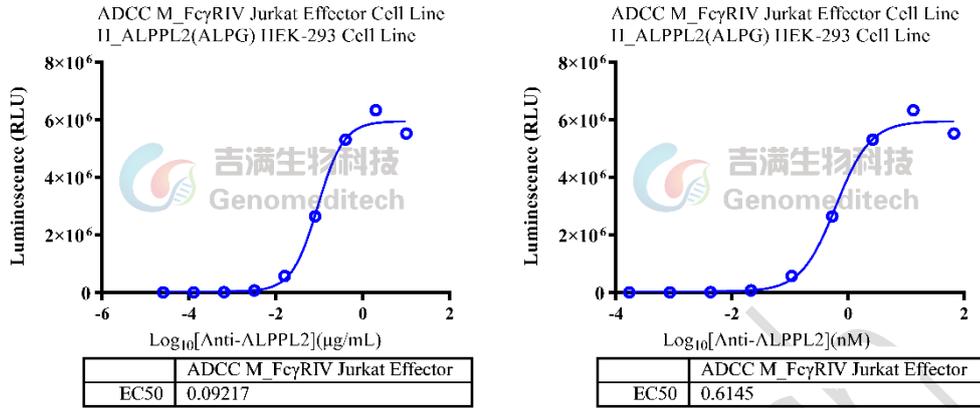


Fig 3. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)



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