

产品手册

Membrane Bound H₂TNF α (cleavage-resistant) CHO-K1

Cell Line

Membrane Bound H₂TNF α (cleavage-resistant) CHO-K1

细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.4

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.....	3
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（以 10 cm 皿为例）.....	6
3.	细胞冻存.....	6
六、	验证结果.....	7
1.	流式检测蛋白表达.....	7
附录 1:	ADCC 验证结果.....	8
附录 2:	稳定性验证.....	8
附录 3:	氨基酸序列（P01375（Ala 76 Leu, Val 77 Leu））.....	8
使用许可协议:	9
参考文献:	9

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-C33297	Membrane Bound H ₂ TNF α (cleavage-resistant) CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C33297	Membrane Bound H ₂ TNF α (cleavage-resistant) CHO-K1 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. 本产品相关实验，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。

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 RIIIa 受体上，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。

吉满生物 Membrane Bound H₂TNF α (cleavage-resistant) CHO-K1 Cell Line, 通过在 CHO-K1 细胞中过表达抗 TNF α 转化酶切割的 TNF- α 蛋白^[1], 从而获得可以在细胞表面稳定表达 TNF α 的稳转细胞系。其可作为靶细胞, 用于 TNF α 阻断型抗体的 ADCC 效应功能研究, 也可用来 TNF α 抗体的亲和力测定。

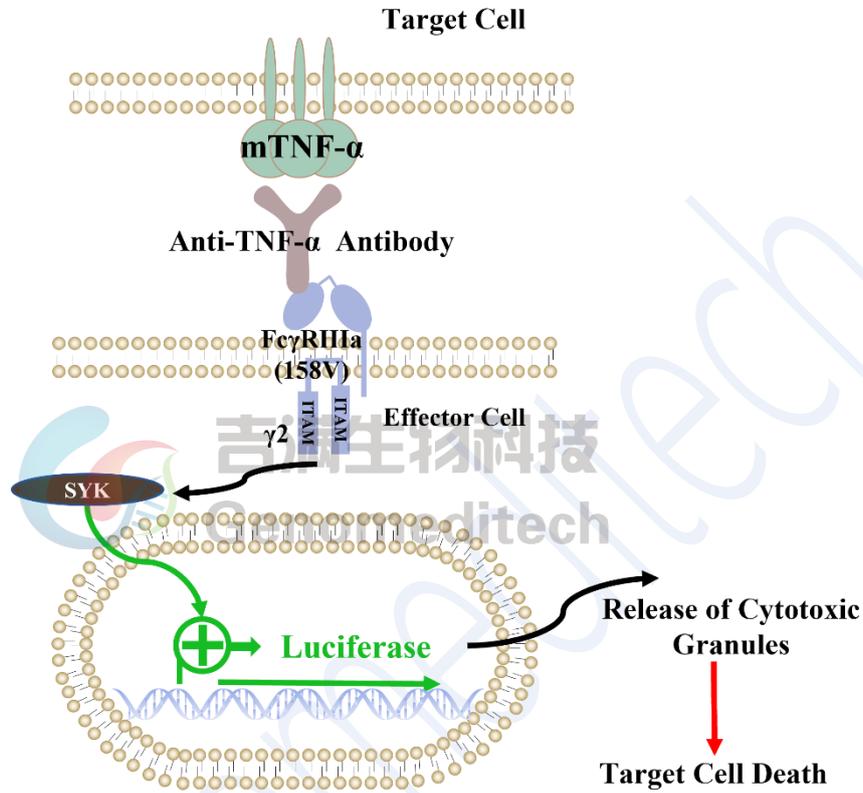


Fig 1. 原理图

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:	F12K+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	F12K+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
Anti-TNF- α hIgG1 Antibody (CT-P17)	/	Genomeditech/GM-49267AB

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
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 2-3 × 10⁵ cells/mL,根据细胞悬液总体积,将细胞接种到合适的培养皿中。

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。

- 此细胞呈梭状,贴壁生长。培养箱中孵育 16-24 h 后,镜下观察细胞贴壁情况。当细胞密度大于 60%,即可进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:4-1:5, 2-3 天传代。
- 将皿或培养瓶中的培养液弃去,10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- 弃 PBS,加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液,37°C 消化 2-3 min,显微镜下观察。
- 待细胞变圆,细胞间隙明显,部分细胞刚开始脱离瓶壁时,加 2 mL 左右生长培养基混匀终止消化,将细胞小心吹打下来,176 × g 室温离心 3 min。
- 弃上清,细胞沉淀用生长培养基重悬,根据传代前细胞密度分盘(根据培养皿面积和细胞密度计算,传代后细胞密度为 20-30%)。

注意事项:

细胞状态稳定后,传代后死细胞会变少,细胞生长速度趋于稳定,细胞形态均匀,胞体健壮。

六、 验证结果

1. 流式检测蛋白表达

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐Membrane Bound H_TNF α (cleavage-resistant) CHO-K1 Cell Line细胞量为 2×10^5 cells/管。操作步骤如下：

- a) 实验前，需等待细胞生长速率稳定，约需要3-5 d。
- b) 实验当天，消化Membrane Bound H_TNF α (cleavage-resistant) CHO-K1 cell line，取100 μ L细胞悬液（细胞计数后用PBS调整浓度为 2×10^6 cells/mL），加入适量的表面抗体（Anti-TNF- α hIgG1 Antibody），4 $^{\circ}$ C避光孵育1 h。
- c) 加入1-2 mL PBS冲洗，重复此步骤。
- d) 加入荧光标记的二抗，4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。
- e) 1000 rpm离心5 min，去除上清，用300 μ L PBS重悬。
- f) 立即上机检测。
- g) 验证结果。

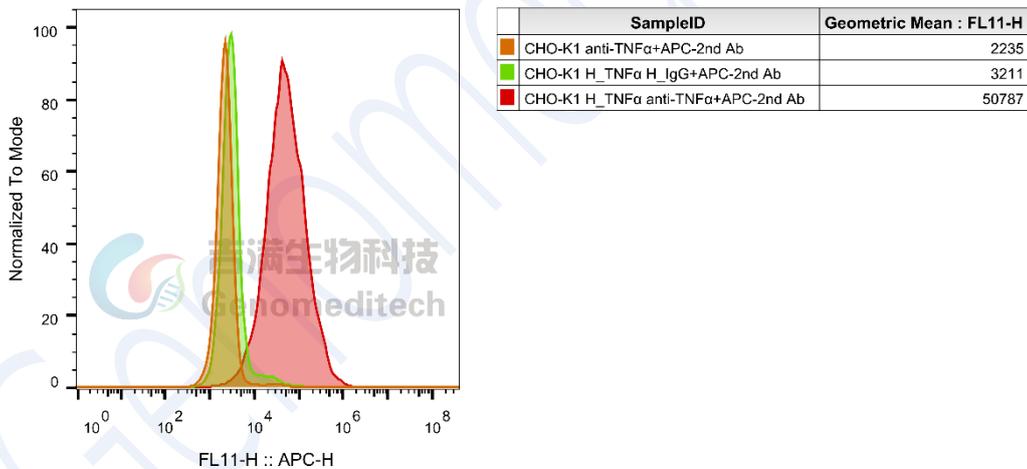


Fig 2.流式验证结果

附录 1: ADCC 验证结果

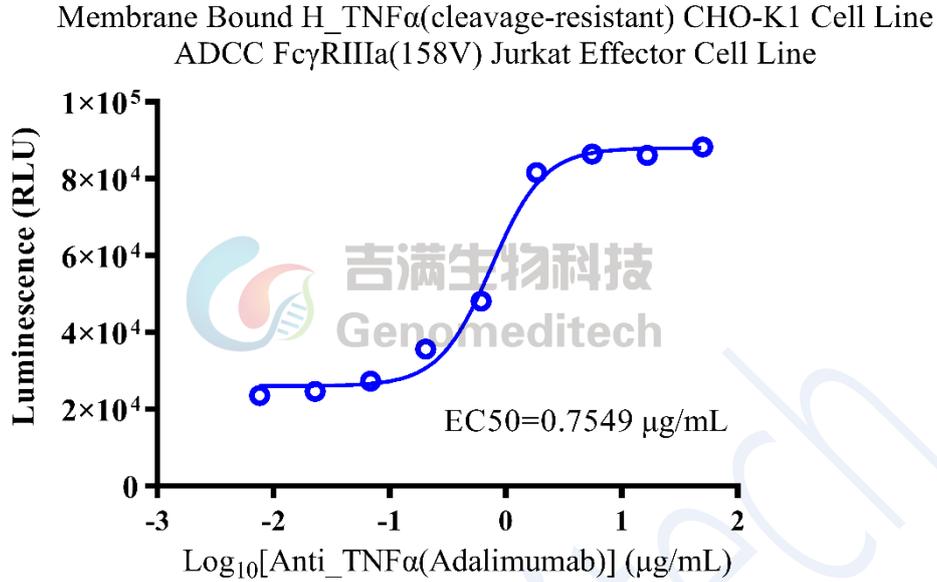
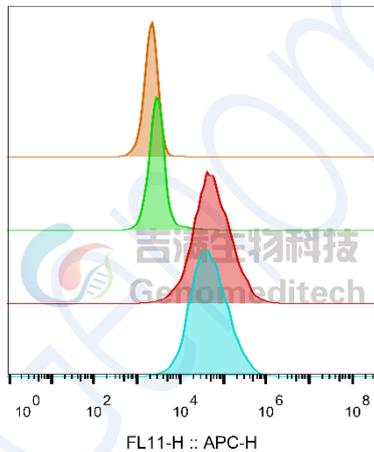


Fig 3.ADCC 验证结果

附录 2: 稳定性验证



SampleID	Geometric Mean : FL11-H
CHO-K1 anti-H ₂ TNF α +APC-2nd Ab	2081
CHO-K1 H ₂ TNF α H ₂ IgG+APC-2nd Ab	3005
CHO-K1 H ₂ TNF α anti-TNF α +APC-2nd Ab CP9	54341
CHO-K1H ₂ TNF α anti-TNF α +APC-2nd Ab CP19	47090

Fig 4.稳定性验证结果

附录 3: 氨基酸序列 (P01375 Ala 76 Leu, Val 77 Leu)

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREE
FPRDLSLISPLAQLLRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDN
QLVVPSEGLYLIYSQVLFGKGQCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEG
AEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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。

参考文献:

[1] Lallemand, Christophe, Feifei Liang, Flore Staub, Maud Simansour, Benoit Vallette, Lue Huang, Rosa Ferrando-Miguel, and Michael G. Tovey. "A Novel System for the Quantification of the ADCC Activity of Therapeutic Antibodies." *Journal of Immunology Research*, vol. 2017, Article ID 3908289.