

## 技术手册

# H\_GARP Latent TGF $\beta$ - $\alpha$ v $\beta$ 6 Blockade Assay

## Genomeditech

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.1

## Table of Contents

一、	产品描述.....	3
二、	产品基本信息及组分.....	4
三、	包装、运输及储存.....	4
四、	细胞信息.....	4
五、	实验仪器及试剂.....	5
1.	试剂和耗材.....	5
2.	重要仪器.....	5
六、	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
七、	使用方法.....	7
1.	共培养抗体抑制实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
1)	验证结果.....	9
	使用许可协议: .....	10

## 一、 产品描述

调节性 T 淋巴细胞 (Tregs) 通过产生转化生长因子- $\beta$  来发挥抑制免疫过度反应, 预防自身免疫性疾病的作用。转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 编码的二聚体前蛋白 (proTGF- $\beta$ ), 可被 furin 酶切割出 TGF- $\beta$  前肽, 也称为 latency-associated peptide (LAP)。紧接着, 可通过与潜在 TGF- $\beta$  结合蛋白 (latent TGF-beta binding proteins (LTBPs)) 结合形成复合物。此外也可同 Tregs 表面高度表达的 GARP (glycoprotein A repetitions predominant, 又称为 LRRC32) 形成复合物, 将无活性的 TGF- $\beta$  释放到细胞外基质 (ECM) 中或积累在细胞表面, 后者的结合能力强于前者。随后, 通过整合素激活 GARP-proTGF $\beta$  复合物, 形成具有活性的 TGF- $\beta$ 。整合素  $\alpha\beta 6$ , 是由  $\alpha$ 、 $\beta$  亚单位以非共价键组合组成的跨膜异二聚体, 其通过其蛋白结构上的高亲和力和结合位点 RGD LXXL 结合 LAP, 然后激活 latent TGF- $\beta$ 。

H\_GARP Latent TGF $\beta$ - $\alpha\beta 6$  Blockade Assay 是一种生物相关的、以 MOA (mechanism of action) 为基础的检测方法, 可用于测定阻断 H\_GARP Latent TGF $\beta$ / $\alpha\beta 6$  相互作用的抗体及其他生物制剂的效能和稳定性。该实验使用两种基因工程细胞系: H\_GARP Latent TGF $\beta$ 1 Reporter HEK-293 Cell Line, 即稳定表达人 GARP 基因、Latent TGF $\beta$  和 TGF- $\beta$  诱导的荧光素酶报告基因的 HEK-293 细胞; H\_ $\alpha\beta 6$  HEK-293 Cell Line, 是一种稳定表达人  $\alpha\beta 6$  的 HEK-293 细胞。当两种细胞共培养时, TGF- $\beta$  被  $\alpha\beta 6$  切割到培养基中, 结合 T $\beta$ RI 和 T $\beta$ RII 受体, 激活转录因子介导的荧光素酶基因 (Luciferase) 的表达。而加入 GARP/ $\alpha\beta 6$  的阻断抗体后, 阻断了 TGF- $\beta$  的活化及其激活的下游信号通路。阻断抗体对信号通路的影响程度可以通过测定荧光信号评估。

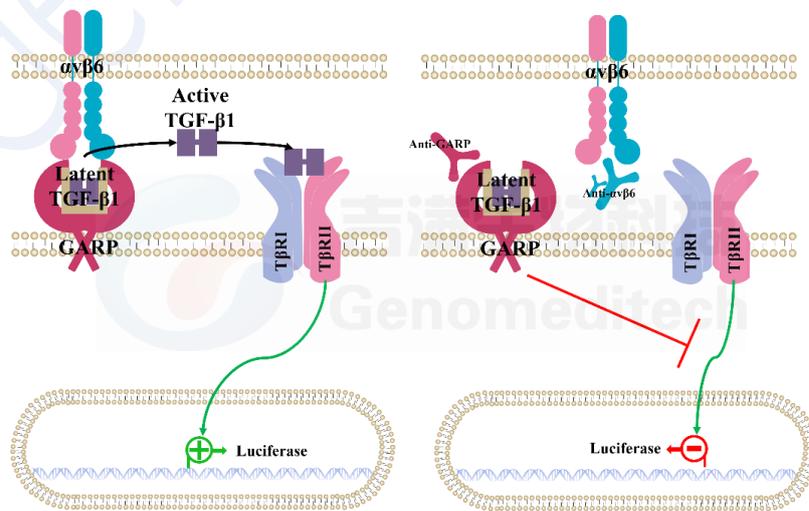


Fig 1. 原理示意图

## 二、 产品基本信息及组分

### 基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-032AS008	H_GARP Latent TGFβ-αβ6 Blockade Assay	1 kit

### 组成成分

名称	Cat.	数量
H_GARP Latent TGFβ1 Reporter HEK-293 Cell Line	GM-C13361	1 管 (5E6 Cell/mL)
H_αβ6 HEK-293 Cell Line	GM-C19431	1 管 (5E6 Cell/mL)

## 三、 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。

## 四、 细胞信息

### H\_GARP Latent TGFβ1 Reporter HEK-293 Cell Line

细胞复苏培养基: DMEM+10% FBS+1% P.S

细胞生长培养基: DMEM+10% FBS+1% P.S+4 μg/mL Blasticidin+150 μg/mL Bleomycin+400 μg/mL G418+125 μg/mL Hygromycin+0.75 μg/mL Puromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

### H\_αβ6 HEK-293 Cell Line

细胞复苏培养基: DMEM+10% FBS+1% P.S

细胞生长培养基: DMEM+10% FBS+1% P.S+150 μg/mL Bleomycin+125 μg/mL Hygromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

### Assay Buffer

DMEM+1% FBS+1% P.S

## 五、 实验仪器及试剂

### 1. 试剂和耗材

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech /GM-040404-1
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Zeocin	100 mg	Genomeditech/GM-040407-100MG
DMEM	500 mL	Vivacell/C3110-0500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
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
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	50 mL	Promega/E6120
Anti-GARP-TGF-β1 hIgG4 Antibody	/	Genomeditech/GM-30474AB

### 2. 重要仪器

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

## 六、 细胞复苏、传代、冻存

### 1. 细胞复苏

注：为确保最高存活率，应在收到冻存细胞后立即解冻并复苏培养。如果在收到细胞后需要继续储存，将其置于液氮罐中，严禁储存在 $-70^{\circ}\text{C}$ ，因为在 $-70^{\circ}\text{C}$ 下储存会导致活性丧失。

- 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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，活细胞  $\geq 3 \times 10^6$  cells/mL。
- 通过补充复苏培养基的形式，调整活细胞密度到  $2-3 \times 10^5$  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  $\times$  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  $5 \times 10^6$  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， $-80^{\circ}\text{C}$ 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。

- 细胞为上皮细胞，贴壁生长。培养箱中孵育 16-24 h 后，镜下观察细胞贴壁情况，当细胞密度达到 80%，需要进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 天传代。注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- 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 $^{\circ}\text{C}$  消化 30-60 s，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  $\times$  g 室温离心 3 min。

注意事项：

- 细胞刚复苏，死细胞较多，属于正常现象，经调整会有明显好转，状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定。
- 注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- FBS 血清需 56 $^{\circ}\text{C}$  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。

## 七、使用方法

### 1. 共培养抗体抑制实验

操作步骤可调整优化。本次实验使用 Anti-GARP-TGF- $\beta$ 1 hIgG4 Antibody(150 kDa) (后续简称 Anti-GARP-TGF- $\beta$ 1)作为阳性药物。Anti-GARP-TGF- $\beta$ 1: Conc.01 终浓度为 15  $\mu$ g/mL, 4 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  $\mu$ 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	PBS
B	Anti-GARP-TGF- $\beta$ 1	15 $\mu$ g/mL	3.75 $\mu$ g/mL	937.5 ng/mL	234.38 ng/mL	58.59 ng/mL	14.65 ng/mL	3.66 ng/mL	915.53 pg/mL	228.88 pg/mL	57.22 pg/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

- 在实验前 16-24 h, 将 H\_GARP Latent TGFB1 Reporter HEK-293 细胞从培养箱中取出, 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  $2 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加 100  $\mu$ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu$ L PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜使用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B11)。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-GARP-TGF- $\beta$ 1	1.35 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 71.7  $\mu$ L Assay Buffer, B3-B12 孔, 加入 55  $\mu$ L Assay Buffer。
- 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 1.63  $\mu$ L Anti-GARP-TGF- $\beta$ 1), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.3 $\mu\text{L}$ , 加入次孔										对照组
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.63 $\mu\text{L}$ Anti-GARP-TGF- $\beta$ 1	加入	71.7 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$								
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.3  $\mu\text{L}$ , 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 10 个梯度稀释孔 (B11)。
- i) 将 H <sub>$\alpha$</sub> v $\beta$ 6 HEK-293 细胞从培养箱中取出, 消化离心收集细胞沉淀, 适量 Assay Buffer 重悬后计数, 再通过补加 Assay Buffer 调整细胞密度为  $2 \times 10^5$  cells/mL。
- j) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出, 每孔吸弃 100  $\mu\text{L}$  培养基。
- k) 加入之前准备好的梯度稀释液, 50  $\mu\text{L}$  每孔, 孵育 1 h。
- l) 1h 后, 再加入步骤 i 准备好的细胞悬液, 50  $\mu\text{L}$  每孔。
- m) 盖上班盖, 于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h。
- n) 使用 ONE-Glo™ 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。

H <sub><math>\alpha</math></sub> GARP Latent TGF $\beta$ - $\alpha$ v $\beta$ 6 Blockade Assay+Anti-GARP-TGF- $\beta$ 1	0 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$	57.22 pg/mL
	91924	10923	84631

## 1) 验证结果

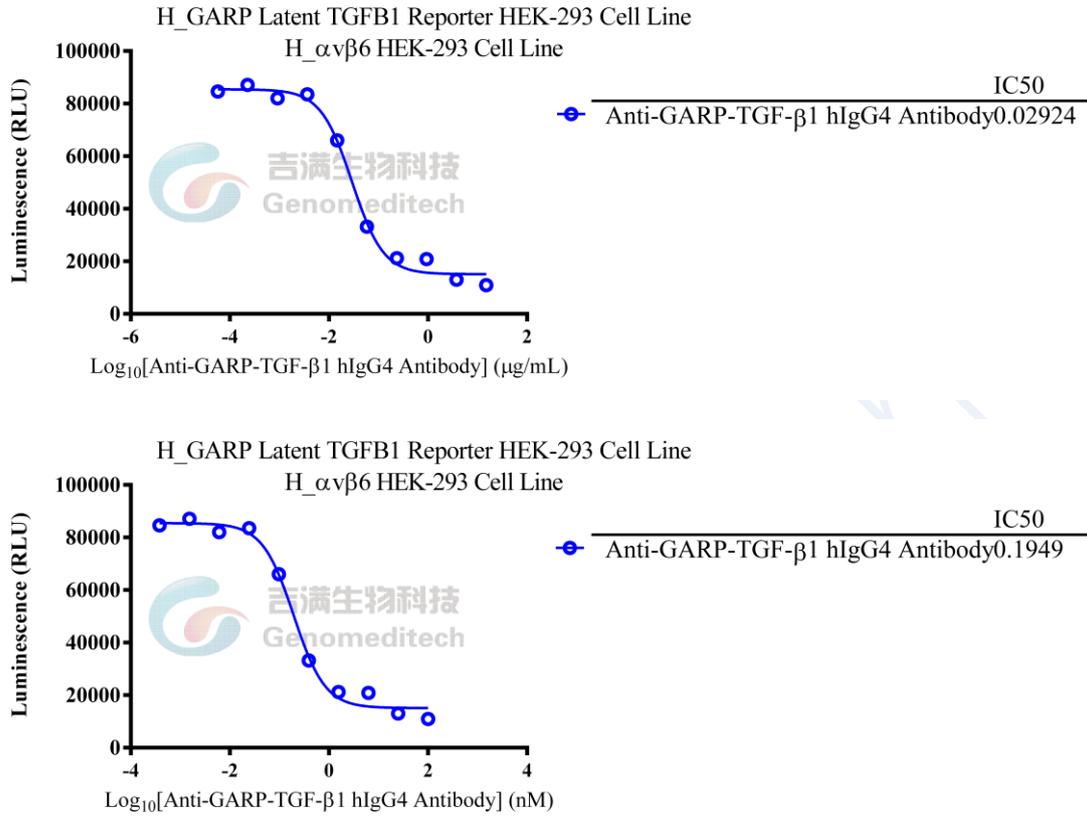


Fig 2.功能验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制；分子量为 150 kDa)

## 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