

技术手册

H_GARP Latent TGF β - α v β 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：V2.8.4

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 |
| 3. | 细胞复苏、传代、冻存..... | 5 |
| 1) | HEK-293 Cell Line 细胞复苏 | 5 |
| 2) | HEK-293 Cell Line 细胞传代 | 6 |
| 3) | HEK-293 Cell Line 细胞冻存 | 6 |
| 六、 | 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- β 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- β (TGF- β) 编码的二聚体前蛋白 (proTGF- β), 可被 furin 酶切割出 TGF- β 前肽, 也称为 latency-associated peptide (LAP)。紧接着, 可通过与潜在 TGF- β 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- β 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 β 复合物, 形成具有的活性的 TGF- β 。整合素 $\alpha\beta 6$, 是由 α 、 β 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- β 。

H_GARP Latent TGF β - $\alpha\beta 6$ 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 β / $\alpha\beta 6$ 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 β 和 TGF- β 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- β 被 $\alpha\beta 6$ 切割到培养基中, 结合 T β RI 和 T β 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- β 的活化及由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。

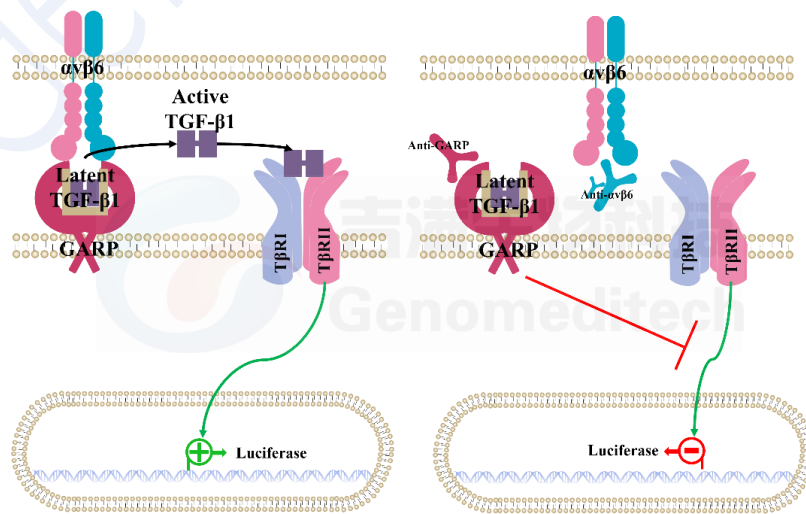


Fig 1. 原理示意图

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+125 μg/mL Hygromycin+0.75 μg/mL Puromycin+400 μg/mL G418+150 μg/mL Zeocin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

HEK-293 来自中国科学院细胞库，贴壁细胞

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+125 μg/mL Hygromycin+150 μg/mL Zeocin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

HEK-293 来自中国科学院细胞库，贴壁细胞

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 |

3. 细胞复苏、传代、冻存

1) HEK-293 Cell Line 细胞复苏

- 细胞冻存密度为 5×10^6 cells/mL，冻存管分装 1 mL。
- 在 37°C 水浴锅预热培养基，加入预热完全培养基 5 mL 到 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存的细胞并迅速放入 37°C 恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。
- 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预先加有预热好的 15 mL 离心管中，轻轻混匀，800 rpm，离心 5 min 使细胞沉淀，弃上清。
- 冻存细胞离心后收集沉淀，使用 1 mL 完全培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞。

- g) 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, 参考体系: 10 cm 皿 (8-10 mL 悬液); 6 cm 皿/T25 瓶 (5 mL 悬液)。后续细胞传代可根据培养皿中细胞聚合度调整。

2) HEK-293 Cell Line 细胞传代

- a) 放入 37°C 恒温培养箱中孵育 24 h, 镜下观察细胞贴壁情况。若贴壁率小于 50%, 延长观察时间, 当细胞密度大于 80%, 即可进行细胞传代; 若贴壁率大于 80%, 可直接进行细胞传代。两次传代后细胞培养基可调整为添加抗生素的完全培养基。
- b) 细胞消化液: 0.25% Trypsin-EDTA, 消化时间为: 30-60 s。
- c) 将皿或培养瓶中的培养液用移液管或吸管弃去, 10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- d) 弃 PBS, 加 1 mL 消化液, 37°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。
- e) 加 2 mL 左右完全培养液混匀终止消化, 将细胞小心吹打下来, 800 rpm 室温离心 5 min。
- f) 弃上清, 细胞沉淀用完全培养液重悬, 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 30-40%)。

| | 培养基 | 面积 | 接种细胞量 | 汇合度 100% | 传代细胞量 |
|-------------|-------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 35mm Dish | 2 mL | 9.6 cm ² | 0.3×10^6 | 7×10^5 | 6×10^5 |
| 60 mm Dish | 5 mL | 28 cm ² | 0.8×10^6 | 2×10^6 | 1.7×10^6 |
| 100 mm Dish | 10 mL | 78 cm ² | 2.2×10^6 | 5.6×10^6 | 4.8×10^6 |
| T-25 Flask | 5 mL | 25 cm ² | 0.7×10^6 | 1.8×10^6 | 1.5×10^6 |
| T-75 Flask | 10 mL | 75 cm ² | 2.1×10^6 | 5.4×10^6 | 4.6×10^6 |

3) HEK-293 Cell Line 细胞冻存

- a) 细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO。
- b) 使用 1000 rpm, 3 min 离心收集细胞。
- c) 使用预冷细胞冻存液重悬细胞, 细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL。
- d) 每管 1 mL 分装到细胞冻存管中, 冻存体积为 1 mL, 冻存密度为 5×10^6 cells/mL。拧紧盖子, 适当标记后, 将细胞冻存管置于梯度降温盒中, 在 -80°C 下保存至少 1 天, 尽快转移至液氮中。

六、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- β 1 hIgG4 Antibody(150 kDa) (后续简称 Anti-GARP-TGF- β 1)作为阳性药物。Anti-GARP-TGF- β 1: Conc.01 终浓度为 15 μ 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 μ 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- β 1 | 15 μ g/mL | 3.75 μ 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 2×10^5 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- β 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 μ L Assay Buffer, B3-B12 孔, 加入 55 μ 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 μ L Anti-GARP-TGF- β 1), 混匀。

| 母液吸取 | | 梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.3 μL , 加入次孔 | | | | | | | | | | 对照组 |
|------|---|--|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | 1.63 μL Anti-GARP-TGF- β 1 | 加入 | 71.7 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 B2 中吸取 18.3 μL , 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 $_{\alpha\text{v}\beta 6}$ 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 2×10^5 cells/mL。
- j) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出, 每孔吸弃 100 μL 培养基。
- k) 加入之前准备好的梯度稀释液, 50 μL 每孔, 孵育 1 h。
- l) 1h 后, 再加入步骤 i 准备好的细胞悬液, 50 μL 每孔。
- m) 盖上班盖, 于 37°C CO₂ 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 $_{\alpha\text{v}\beta 6}$ GARP Latent TGF β - $\alpha\text{v}\beta 6$ Blockade Assay+Anti-GARP-TGF- β 1 | 0 $\mu\text{g/mL}$ | 15 $\mu\text{g/mL}$ | 57.22 pg/mL |
| | 91924 | 10923 | 84631 |

1) 验证结果

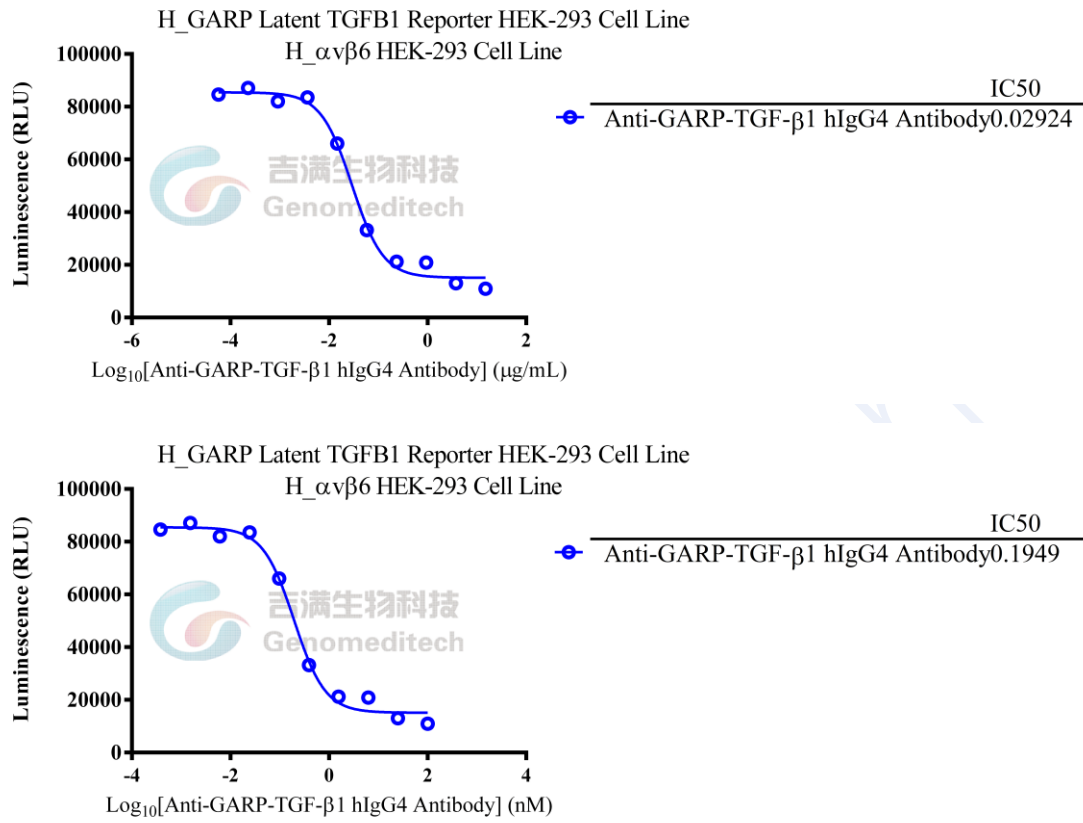


Fig 2.功能验证结果

(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