

产品手册

ADCC M_FcγRIV Jurkat Effector Cell Line

ADCC M_FcγRIV Jurkat 效应细胞

For research use only!

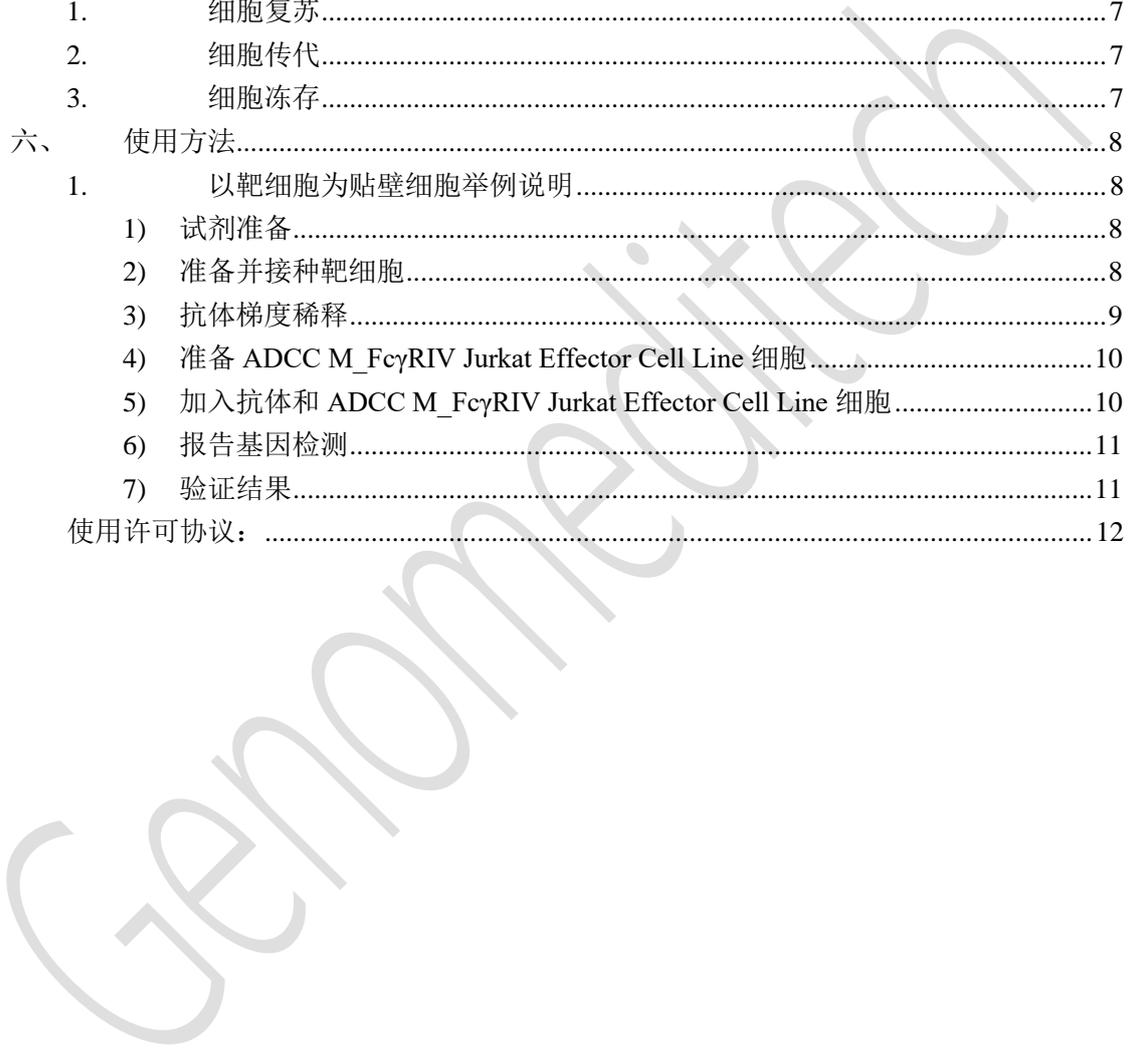
本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.240521

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
1.	以靶细胞为贴壁细胞举例说明.....	8
1)	试剂准备.....	8
2)	准备并接种靶细胞.....	8
3)	抗体梯度稀释.....	9
4)	准备 ADCC M_FcγRIV Jurkat Effector Cell Line 细胞.....	10
5)	加入抗体和 ADCC M_FcγRIV Jurkat Effector Cell Line 细胞.....	10
6)	报告基因检测.....	11
7)	验证结果.....	11
	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-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。

Genomeditech

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。

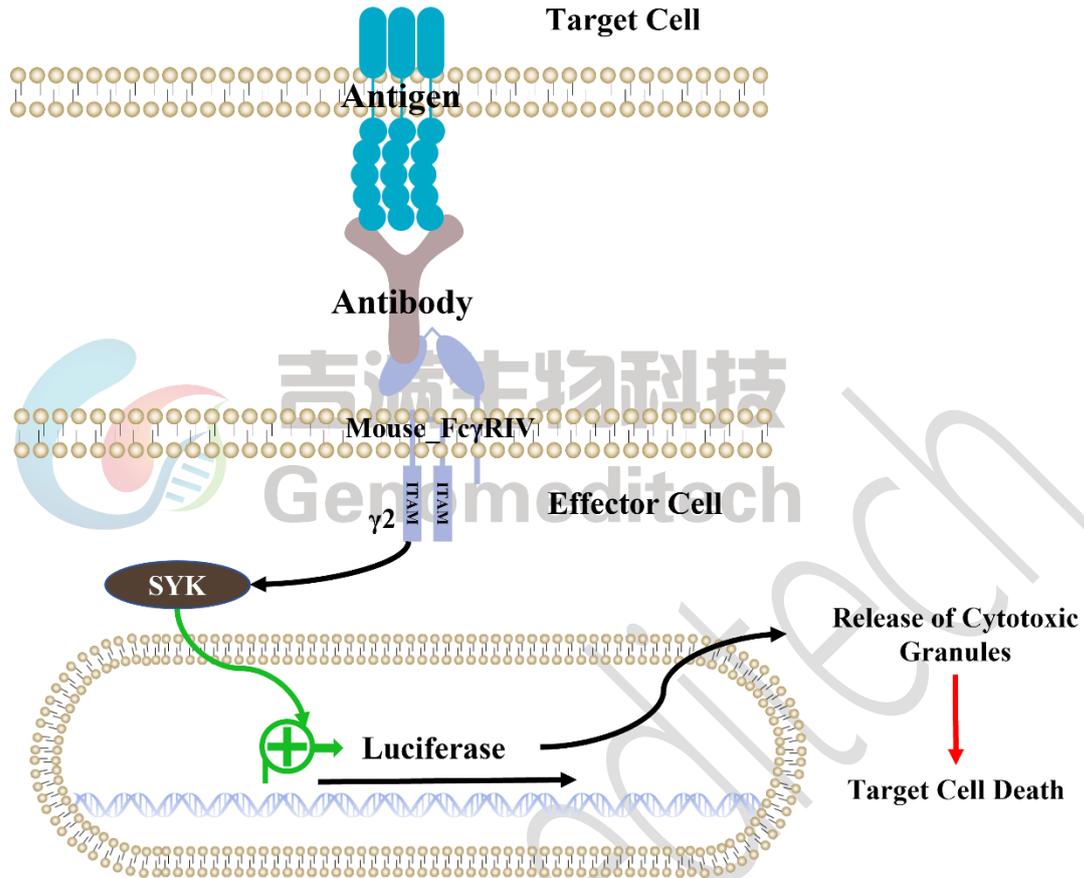


Fig 1.原理示意图

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
ADCC 检测缓冲液:	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	50 mL	Genomeditech/GM-040503
175D10 MK/MlgG2	/	Expression

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 $\times 10^6$ 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°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 $\times 10^6$ 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

1. 以靶细胞为贴壁细胞举例说明

概要:

- a) 本实验以 H_CLDN18(isoform2) CHO-K1 Cell Line 细胞为靶细胞, 进行举例说明。针对不同抗体样品, 操作步骤可调整优化。如果是针对固定的抗体和靶细胞进行检测, 建议先优化 E:T(效应细胞:靶细胞)比例, 固定 ADCC 效应细胞数目 150000/每孔(96 孔板), 调整靶细胞数。对于贴壁靶细胞推荐的 E:T 为 15: 1(1.5E5 效应细胞: 1E4 靶细胞)。
- b) 针对不同抗体, 诱导时间可在 6-24h 调整获得最佳诱导时间。

1) 试剂准备

ADCC 检测缓冲液:

检测当天制备适量 ADCC 检测缓冲液, 使用前预温至 37°C。

注: 方针对大部分靶细胞, 推荐 ADCC 检测缓冲液含有 0.5% low IgG FBS。如果使用中发现细胞活力或检测问题, 可在 0.5-10% 范围内优化血清浓度。

梯度稀释阳性抗体和待测抗体:

可以根据以前 ADCC 细胞的测试结果, 确定阳性抗体和待测抗体样品的起始浓度 (1×)。如果测试抗体的工作浓度是未知的, 可先用 300 ng/ml 的起始浓度, 之后根据实验数据再调整。

2) 准备并接种靶细胞

尝试在 2.5:1 到 25:1 的范围内优化 ADCC 效应细胞和靶细胞比例(E:T ratios)。保持 ADCC M_FcγRIV Jurkat Cell Line 效应细胞密度不变, 调整靶细胞浓度。作为参考, 我们使用 1.5E5 Cells/well 的 ADCC Bioassay 效应细胞和 1E4 Cells/Well 的靶细胞(接种密度)。最终孔板排布见下图。

	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	175D10 MK/MiG2	PBS	300 ng/ml	75 ng/ml	18.75 ng/ml	4.69 ng/ml	1.17 ng/ml	292.97 pg/ml	73.24 pg/ml	18.31 pg/ml	4.58 pg/ml	0	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D													
E													
F													
G													
H													

若检测抗体数量较多，可参考以下孔板排布：

	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	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
C	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
D	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
E	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
F	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
G	PBS	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	No Ab	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

在实验前 20-24h，将靶细胞 H_CLDN18(isoform2) CHO-K1 Cell Line 从培养瓶中消化下来，以新鲜培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数。离心 130–200 ×g (根据不同细胞可调整转速)收集细胞，再以新鲜培养基调整细胞浓度为 1E5 Cells/ml。以排枪加 100μl 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 100μl PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。

3) 抗体梯度稀释

阳性抗体和待测抗体的起始浓度、稀释比例可优化调整。下面以 175D10 MK/MiG2 (0.035 mg/ml)，起始浓度为 300 ng/ml，单重复，4 倍梯度稀释为例。

- a) 如下表，使用无菌低吸附 96 孔 V 底板准备实验。每个待测样品，使用一行（如 B2-B10 行，单重复可以检测 6 个抗体）。如在 B2 孔中加入 72.1 μl 的 Assay buffer，B3-B11 加入 55 μl 的 Assay buffer。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.3 μl ，加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	175D10 MK/MiG2 加入	72.1 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												

- b) 在 B2 孔中加入 1.26 μl 175D10 MK/MiG2 抗体，混匀。此时 B2 孔的抗体浓度为 600 ng/ml (2X 浓度)。对于不同浓度的抗体，首孔加入抗体量不同，首孔后的梯度稀释操作是相同的，可以使用排枪进行实验。
- c) 从 B2 孔吸取 18.3 μl 液体，加入到 B3，充分混匀。
- d) 从 B3 孔吸取 18.3 μl 液体，加入到 B4，充分混匀。
- e) 以此类推，直至 B10 孔，B11 为不加抗体的对照。
- f) 将装有稀释好的抗体的多孔板盖上盖，之后准备效应细胞。

4) 准备 ADCC M_Fc γ RIV Jurkat Effector Cell Line 细胞

- a) 从细胞培养瓶中转移 ADCC M_Fc γ RIV Jurkat Effector Cell Line 细胞至 50 ml 离心管中，计算细胞密度及活力。以 Assay Buffer 重悬细胞，调整至 3E6 cells/ml，细胞活力>95%。对于一块 96 孔板的 60 个孔，约需要 1E7 细胞量的 ADCC 效应细胞。
- b) 室温 130 \times g 离心 10 min，以 10 ml 1X DPBS 洗细胞，再离心 130 \times g 10 min。以 ADCC 检测缓冲液中重悬细胞，调整至 3E6 cells/ml。

5) 加入抗体和 ADCC M_Fc γ RIV Jurkat Effector Cell Line 细胞

- a) 步骤 2 接种过夜的靶细胞，每孔吸弃 100 μl 培养基。

- b) 以排枪加入准备好的 ADCC M_FcγRIV Jurkat Effector 细胞 50 μl, 150,000 细胞/孔(1.5E5 Cells/well)。
- c) 将之前准备好的抗体梯度稀释液以排枪每孔加入 50 μl。
- d) 盖上检测板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6H。

6) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

ADCC M_FcγRIV Jurkat Effector Cell Line	0 ng/mL	300 ng/mL	4.58 pg/mL
	4934	1515631	4861

7) 验证结果

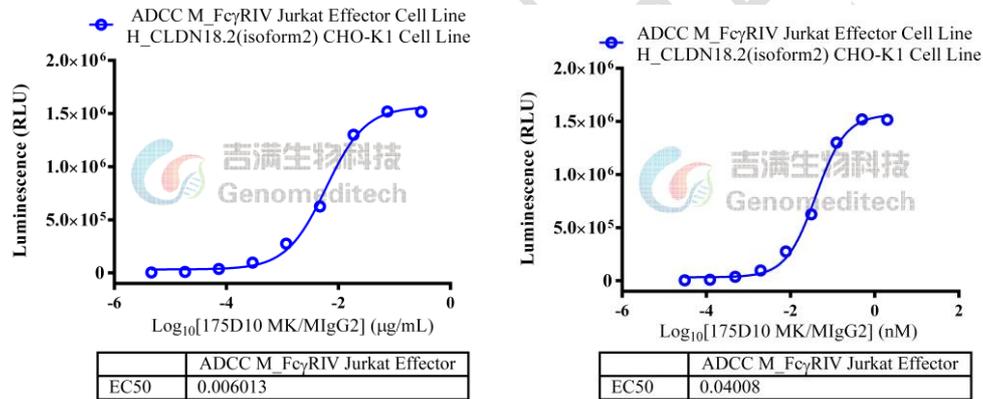


Fig2. 验证结果

(右图对药物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