

## 产品手册

### Tango-H\_CCR8 CHO-K1 Cell Line

### Tango-H\_CCR8 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：V2.8.240522

## 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.	试剂耗材准备 .....	6
五、	细胞复苏、传代、冻存 .....	7
1.	Tango-H_CCR8 CHO-K1 Cell Line 细胞复苏 .....	7
2.	Tango-H_CCR8 CHO-K1 Cell Line 细胞传代 .....	7
3.	Tango-H_CCR8 CHO-K1 Cell Line 细胞冻存 .....	7
六、	使用方法 .....	8
1.	配体激活实验 .....	8
1)	加样步骤 .....	8
2)	报告基因检测 .....	9
3)	验证结果 .....	9
2.	抗体抑制实验 .....	10
1)	加样步骤 .....	10
2)	报告基因检测 .....	11
3)	验证结果 .....	11
附录	传代稳定性 .....	12
使用许可协议:	.....	13

## 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-C13190	Tango-H_CCR8 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-C13190	Tango-H_CCR8 CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C
GM-041519	Switch-On Reagent(1000X)	1 mL	1 管	-80°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

G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 家族是人类中最庞大的膜蛋白家族, 也是很多药物的重要靶点, GPCR 家族中有 800 多个成员, 其中近 400 个可以考虑作为药物靶标。靶向 GPCR 的药物占有 FDA 批准药物的 34%, 主要适应症为高血压、糖尿病、肥胖、过敏和阿尔茨海默病, 以及几种中枢神经系统疾病。

GPCR 激活包括两类信号通路, G 蛋白依赖的信号通路和非 G 蛋白依赖的信号通路。G 蛋白依赖的信号通路中, GPCR 与胞内 G 蛋白 (Gi/Go、Gs、Gq 和 G12/G13) 偶联, 其信号的激活和抑制, 可以通过检测 GPCR 介导的第二信使如钙流、环腺苷酸(cAMP)等。非 G 蛋白依赖的信号通路, 核心为 GPCR 诱导  $\beta$ -arrestin 易位, 这一过程独立于 G 蛋白受体信号, 也可用于孤儿受体, 可以通过  $\beta$ -arrestin 检测非 G 蛋白依赖的信号通路激活。

CCR8 是唯一已知的 CCL1 受体。CCL1 通过肿瘤干细胞 CAF 和 TAM 分泌到癌症微环境中, 通过激活癌细胞上的 CCR8 受体, 引起癌细胞的增殖、迁移和凋亡抵抗。它还通过激活内皮细胞上的 CCR8 受体导致血管生成。CCL1 的另一个重要功能是募集 Treg 到肿瘤生态位, 并导致 CD4+T 细胞转化为 Treg。CCR8 在肿瘤浸润的调节性 T 细胞 (Treg) 上特异性表达, 而在外周血 Treg 或正常组织上基本不表达, 是一个极具潜力的肿瘤治疗靶点。

Tango-H\_CCR8-CHO-K1 Cell Line 细胞系以 CHO-K1 为工具细胞, 采用慢病毒感染的方式, 依靠 Tango 技术构建 Tango CCR8 报告基因的细胞系, 当配体激活 CCR8 Arrestin 通路时, Arrestin 携带蛋白酶切下转录激活元件, 转录激活元件移位到细胞核中, 激活荧光素酶报告基因, Luciferase 报告基因读值即代表信号通路的激活效果, 因此可用于靶向 CCR8 功能性抗体的活性检测。

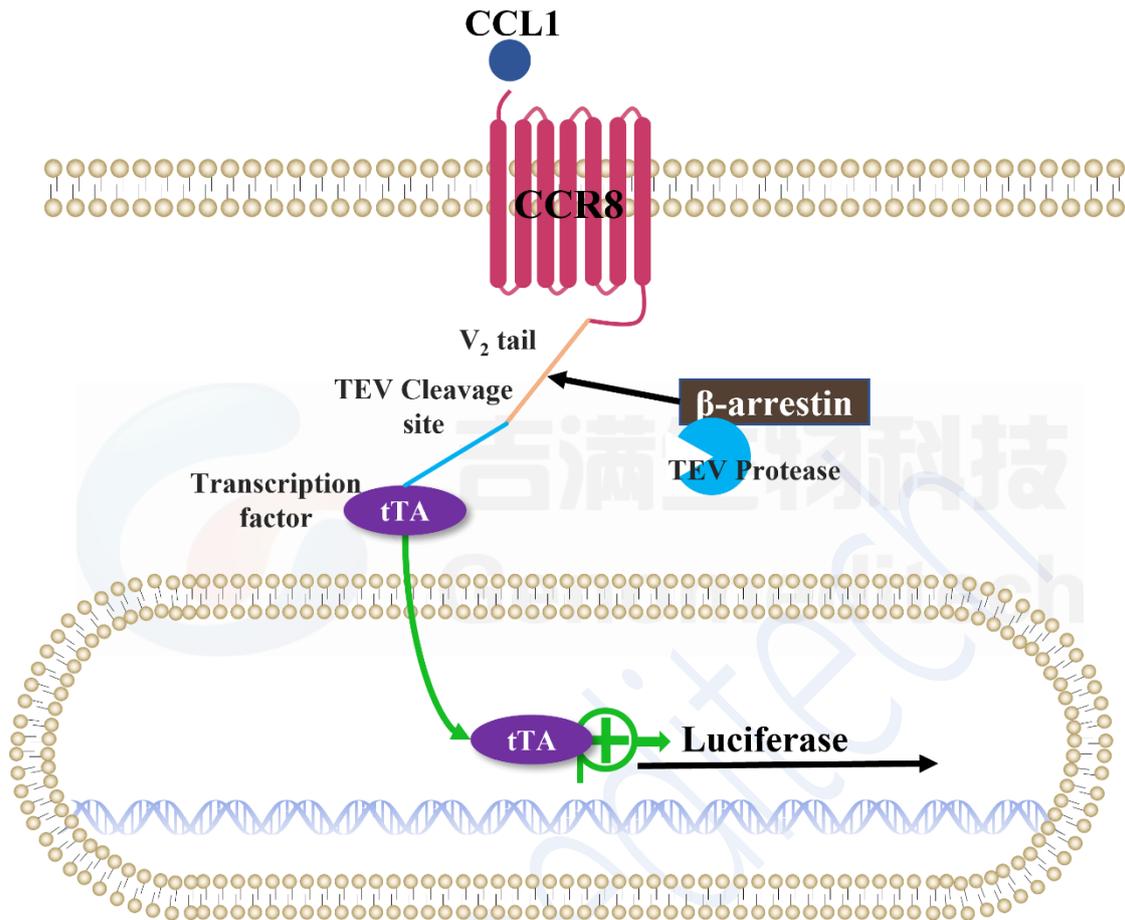


Fig 1. 原理示意图

## 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:	F12K+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	F12K+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin+4 µg/mL Puromycin+100 µg/mL Hygromycin+200 µg/mL G418
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	F12K+1% FBS+1% P.S

### 2. 试剂耗材准备

#### 试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/ GM-040401-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech / GM-040404-1
G418	1 g	Genomeditech /GM-040402-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
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
Luciferase Assay Kit	100 tests	Genomeditech/GM-040501A
Switch-On Reagent(1000X)	1 mL	Genomeditech/GM-041519
Human CCL1	10 µg	Biolegend/582702
Anti-H_CCR8 hIgG1 Antibody	/	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、 细胞复苏、传代、冻存

### 1. Tango-H\_CCR8 CHO-K1 Cell Line 细胞复苏

- a) 37°C水浴锅预热培养基，加入预热后的完全培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- b) 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不断摇动至融化。
- c) 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，1000 rpm，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- d) 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，活细胞 $\geq 3 \times 10^6$  cells/mL。
- e) 通过补加完全培养基的形式，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。

### 2. Tango-H\_CCR8 CHO-K1 Cell Line 细胞传代

- a) 当细胞密度大于 60%时，即可进行传代。推荐细胞传代比例为 1:4 - 1:5，2-3 天传代传代。
- b) 将皿或培养瓶中的培养基弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- c) 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液润洗一遍，吸弃，再次吸取 1 mL 消化液，37°C 消化 2 - 3 min，显微镜下观察。
- d) 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 左右完全培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，1000 rpm 室温离心 3 min。
- e) 弃上清，细胞沉淀用完全培养基重悬，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%）。

### 3. Tango-H\_CCR8 CHO-K1 Cell Line 细胞冻存

- a) 使用 1000 rpm，3 min 离心收集细胞。
- b) 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。
- c) 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。

## 六、使用方法

### 1. 配体激活实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 Tango-H\_CCR8 CHO-K1 Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  cells/孔, 使用 Human CCL1 (8.6 kDa) 作为阳性配体。以 Human CCL1 为例, Conc.01 浓度为  $1 \mu\text{g/mL}$ , 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照。周围孔加入  $100 \mu\text{L}$  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	Human CCL1	1 $\mu\text{g/mL}$	250 $\text{ng/mL}$	62.5 $\text{ng/mL}$	15.63 $\text{ng/mL}$	3.91 $\text{ng/mL}$	976.56 $\text{pg/mL}$	244.14 $\text{pg/mL}$	61.04 $\text{pg/mL}$	15.26 $\text{pg/mL}$	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

- 在实验前 16-24 h, 将诱导 48 h 的细胞从培养箱中取出, 消化离心收集细胞沉淀, 使用适量含有  $1 \times$  诱导剂的完全培养基重悬细胞, 检测细胞活力并计数, 再用含有  $1 \times$  诱导剂的完全培养基调整细胞浓度为  $1.5 \times 10^5$  cells/mL。排枪  $100 \mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔, 周围的孔加  $100 \mu\text{L}$  PBS。盖上市盖, 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。
- 每个待测药物, 使用一行 (如 B2-B11)。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Human CCL1	1.15 mg/mL	0.115 mg/mL	取 $2 \mu\text{L}$ 储液+ $18 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入  $145.4 \mu\text{L}$  Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入  $110 \mu\text{L}$  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  $1.28 \mu\text{L}$  human CCL1), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 36.7 $\mu$ L, 加入次孔									对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.28 $\mu$ L Human CCL1	加入	145.4 $\mu$ L	110 $\mu$ L								
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 36.7  $\mu$ 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 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出, 每孔吸弃 100  $\mu$ L 培养基。
- j) 加入之前准备好的梯度稀释液, 每孔 100  $\mu$ L。
- k) 盖上班盖, 于 37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 7 h。
- l) 使用单荧光素酶检测试剂盒, 检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

Tango-H_CCR8 CHO-K1 Cell Line	0 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL	15.26 pg/mL
	106762	8089963	133199

## 3) 验证结果

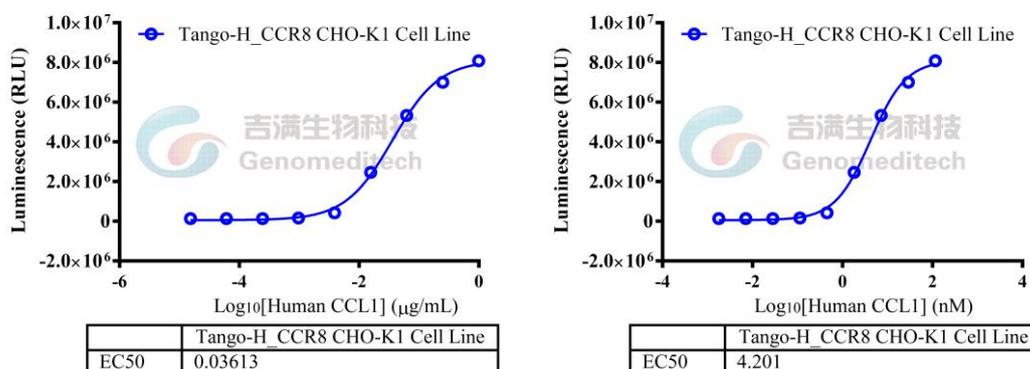


Fig 2.Human CCL1 激活验证结果

(右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 2. 抗体抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 Tango-H\_CCR8 CHO-K1 Cell Line 细胞量为  $2 \times 10^4$  cells/孔，Human CCL1 蛋白（8.6 kDa）激活浓度使用 40 ng/mL。本次实验使用 Anti-H\_CCR8 hIgG1 Antibody（以下简称为 Anti-CCR8; 150 kDa）作为阳性抗体，Conc.01 终浓度为 45  $\mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入 100  $\mu\text{L}$  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-CCR8 45 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	1.67 $\mu\text{g/mL}$	555.56 ng/mL	185.19 ng/mL	61.73 ng/mL	20.58 ng/mL	6.86 ng/mL	2.29 ng/mL	762.08 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，将诱导 48 h 的细胞从培养箱中取出，消化离心收集细胞沉淀，使用适量含有 1X 诱导剂的完全培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再用含有 1X 诱导剂的完全培养基调整细胞浓度为  $2 \times 10^5$  cells/mL。排枪 100  $\mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔，周围的孔加 100  $\mu\text{L}$  PBS。盖板上盖，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 B1-B12）。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-CCR8	1.1 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1 孔加入 75.8  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 55  $\mu\text{L}$  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 B1 中加入 6.75  $\mu\text{L}$  Anti-CCR8），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 27.5 $\mu$ L, 加入次孔											对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	6.75 $\mu$ L Anti-CCR8	75.8 $\mu$ L	55 $\mu$ L									
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 27.5  $\mu$ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B2, 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (B11)。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出, 每孔吸弃 90  $\mu$ L 培养基。
- j) 将步骤 h 准备好的抗体梯度稀释液每孔加入 50  $\mu$ L, 盖上检测板盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 1 h。
- k) 1 h 后取出, 每孔中加入 50  $\mu$ L 的稀释到 80 ng/mL 的 Human CCL1 蛋白。
- l) 盖板上盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 15 h。
- m) 使用 One-Glo 试剂, 检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

Tango-H_CCR8 CHO-K1 Cell Line	Human CCL1+ No Ab Control	Human CCL1+ 45 $\mu$ g/mL Anti-CCR8	Human CCL1+ 762.08 pg/mL Anti-CCR8
	3535206	443536	3229331

## 3) 验证结果

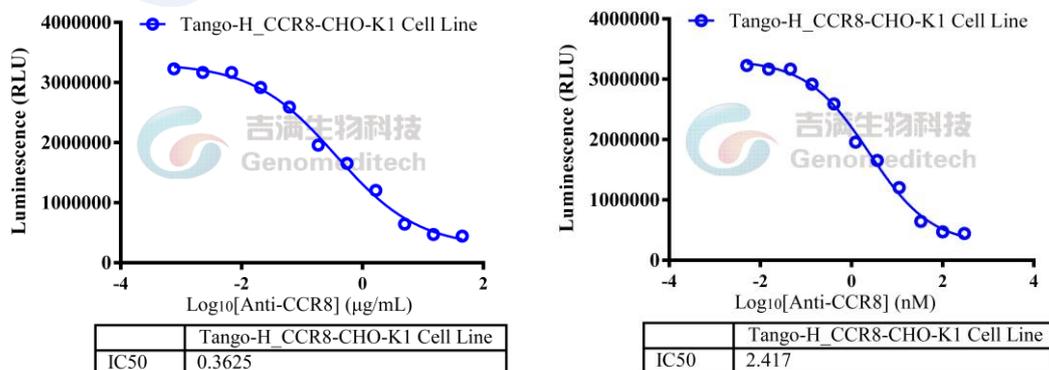


Fig 3. Anti-CCR8 抑制验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 附录 传代稳定性

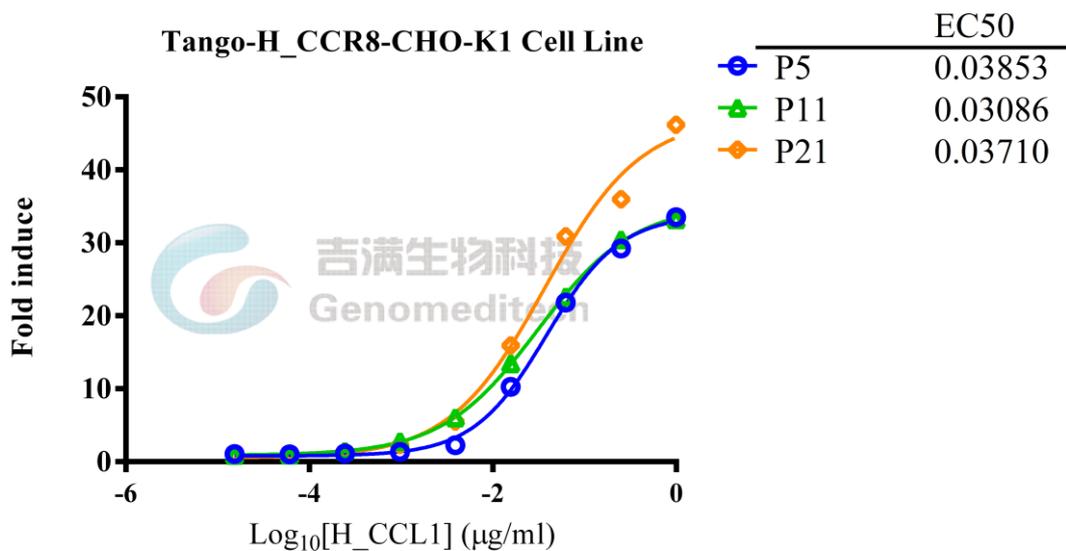


Fig 4.功能验证结果（上图所示数据分为两组实验。其中实验一为 P5 代量效曲线，实验二为 P11 和 P21 代量效曲线。将 Luciferase 数据换算为倍率。）

## 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