

产品手册

CHO-K1 OKT3(CD3 ScFv) Cell Line Clone

CHO-K1 OKT3(CD3 ScFv)细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.1

Genomeditech

目录

一、	产品基本信息及组分.....	3
二、	包装、运输及储存.....	3
三、	材料准备.....	4
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	4
2.	试剂耗材准备.....	4
四、	细胞复苏、传代、冻存.....	5
细胞复苏	5	
细胞传代（以 10 cm 皿为例）	5	
细胞冻存	5	
五、	验证结果.....	6
1.	流式检测蛋白表达.....	6
2.	CD3 激活验证实验	6
附录 1:	稳定性验证结果.....	8
附录 2	H_OKT3(CD3 ScFv)氨基酸序列	8
使用许可协议:	9

Genomeditech

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-C19403	OKT3(CD3 ScFv) CHO-K1 Cell Line	5E6 Cell/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C19403	OKT3(CD3 ScFv) CHO-K1 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. 本产品相关实验，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

三、 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
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.
Blasticidin	10mg	Genomeditech/ GM-040404-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
96 Well Clear V-Bottom Tissue C µLture	96-well	Corning/3894
96 well round well c µLture plate	96-well	NEST/701001
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Human CD3 epsilon&CD3 delta / Heterodimer Protein, Fc,His Tag&Fc,Flag Tag	/	Acro/CDD-H52W8
Goat Anti--Human IgG Fc Secondary / Antibody, PE, eBioscience	/	Invitrogen/12-4998-82
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C

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

四、 细胞复苏、传代、冻存

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 $\times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中。

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 5×10^6 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。

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。

- 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。

五、 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OKT3(CD3 ScFv) CHO-K1 Cell Line 细胞量为 2×10^5 cells/管。操作步骤如下：

1. 实验前，需等待细胞生长速率稳定，约需要3-5天。
2. 实验当天，消化 OKT3(CD3 ScFv) 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Human CD3 epsilon&CD3 delta Heterodimer Protein, Fc,His Tag&Fc,Flag Tag，室温孵育30 mins。
3. 加入1-2 ml PBS冲洗，重复两次此步骤。
4. 加入荧光标记的二抗（Goat anti-Human IgG Fc Secondary Antibody, PE, eBioscience），避光孵育30 mins。
5. 1000 rpm/min 离心5 mins，去除上清，加入1-2 ml PBS冲洗，重复两次此步骤。
6. 用100 μ L PBS重悬，立即上机检测。
7. 验证结果。

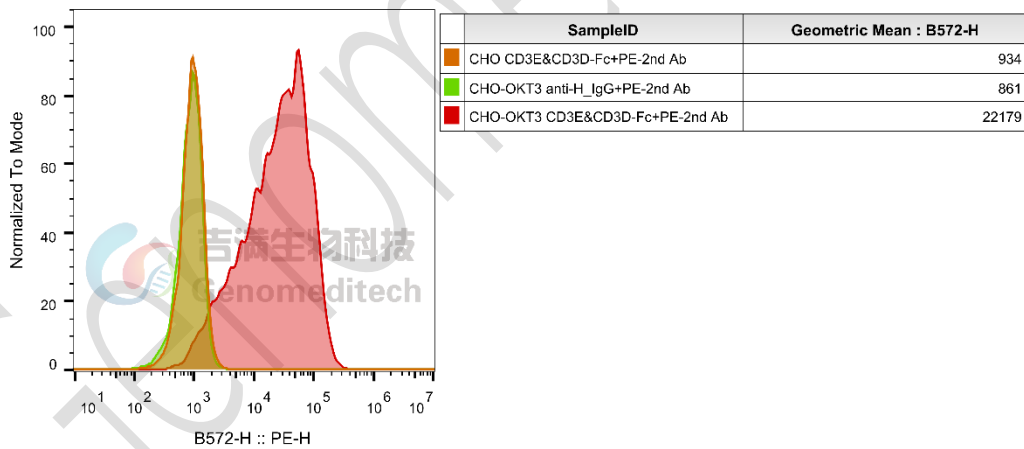


Fig.流式验证结果

2. CD3 激活验证实验

本实验使用 1×10^4 cells/Well 的 OKT3(CD3 ScFv) CHO-K1 Cell Line 和 1×10^5 cells/Well 的 NFAT-Luc Reporter Jurkat Cell Line 进行实验。

1. 在实验前20-24h，将OKT3(CD3 ScFv) CHO-K1 Cell Line细胞从培养瓶中取出，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 1×10^5 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。
2. 实验前 1-2 h，离心收集 NFAT-Luc Reporter Jurkat Cell Line，以 Assay Buffer 重悬细胞，计算细胞密度及活力，通过补加 Assay Buffer 的方式，调整 NFAT-Luc Reporter Jurkat Cell Line到 1×10^6 cells/mL。
 3. 将步骤1接种过夜的靶细胞，每孔吸弃100 μ L培养基。
 4. 然后加入准备好的NFAT-Luc Reporter Jurkat Cell Line 100 μ L。
 5. 盖上检测板盖，于37°C CO₂ 培养箱中培养6H。
 6. 收样检测Luciferase。

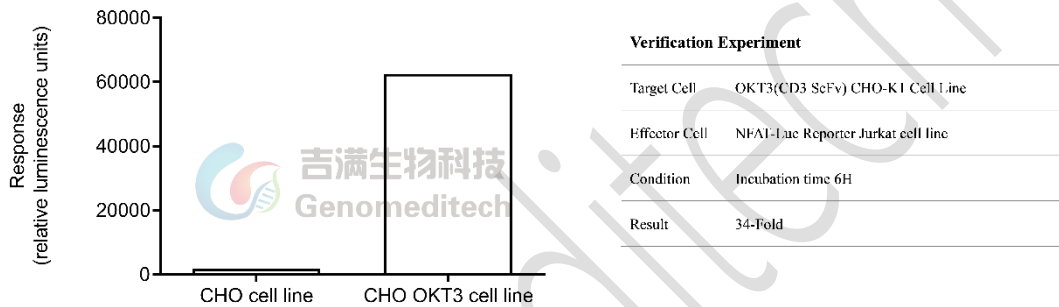


Fig.CD3 激活验证实验结果 (ONE-Glo™ Luciferase Assay System/Promega/E6120 检测)

附录 1: 稳定性验证结果

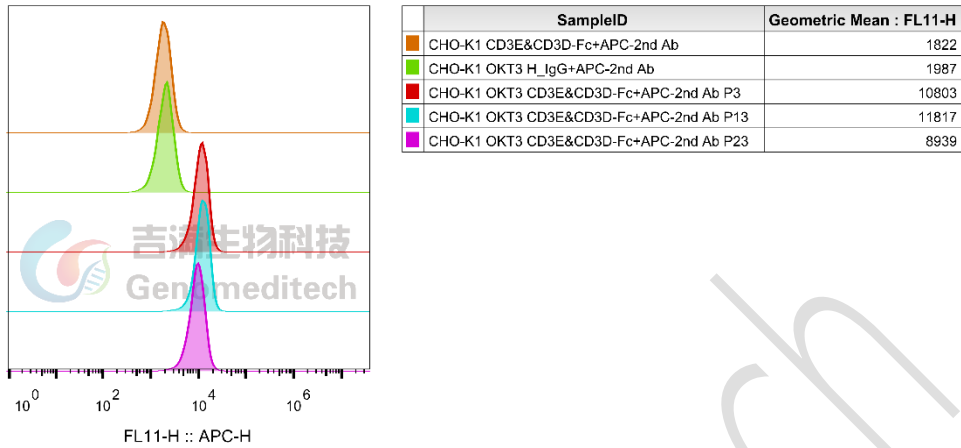


Fig.CD3 激活验证实验结果

附录 2 H_OKT3(CD3 ScFv)氨基酸序列

MPMGSLQPLATLYLLGMLVASVLAQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTM
 HWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV
 YYCARYYDDHYCLDYWGQTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGSSQIVLTQSPAIMSASPGE
 KVTMTCSASSVSVMNHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKSLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISG
 MEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGDPPSPLFPGPSKPFWLVVVGGVLA
 CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

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