

产品手册

H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line

H_TNFR2 Reporter V2 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.5

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.....	5
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	5
2.	试剂耗材准备.....	5
五、	细胞复苏、传代、冻存.....	6
1.	细胞复苏.....	6
2.	细胞传代.....	6
3.	细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	7
1.	Anti-H_TNFR2 激活实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	阻断实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	11
附录 1:	测序结果.....	12
附录 2:	流式验证结果.....	12
附录 3:	稳定性验证结果.....	13
附录 4:	TNF- α 蛋白激活验证结果.....	13
使用许可协议:	14

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-C25776	H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C25776	H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line	5E6 Cells/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。

三、 产品描述

肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是一种 II 型跨膜蛋白。它以膜结合形式 (mTNF- α) 存在。mTNF- α 可以通过称为 TNF α 转化酶的作用被加工成 17 kDa 可溶性 TNF- α (sTNF- α)。

TNF- α 通过两种 TNF 受体超家族成员 I 型跨膜受体 TNF 受体 1 (TNFR1) 和 TNF 受体 2 (TNFR2) 发挥作用。两种受体的细胞外结构域具有相似的富含半胱氨酸的基序, 重复两到六次。其中 TNFR2 (Tumor Necrosis Factor Receptor 2) 主要由 mTNF- α 激活, 其主要在胸腺 T 淋巴细胞, 内皮细胞, 小胶质细胞和少突胶质细胞中表达。

当 TNF- α 与 TNFR2 结合时, 细胞内结构域招募现有的细胞质 TRAF2-cLAP1-cLAP2 复合物, 激活下游信号通路。有研究发现, TNFR2 抑制剂能够特异性抑制在肿瘤微环境中高表达 TNFR2 的 Treg 细胞增殖, 同时特异性杀伤肿瘤细胞。

吉满生物 H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line 是一株敲除了 H_TNFR1 的 Luciferase 报告基因细胞系。当 mTNF- α 或者 TNFR2 激动剂与 TNFR2 结合时, 导致下游通路激活; 加入拮抗剂后, 阻断下游信号通路, 进而导致荧光素酶 (Luciferase) 的表达变化。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果, 因此可用于 TNFR2 拮抗剂的体外效果评价。

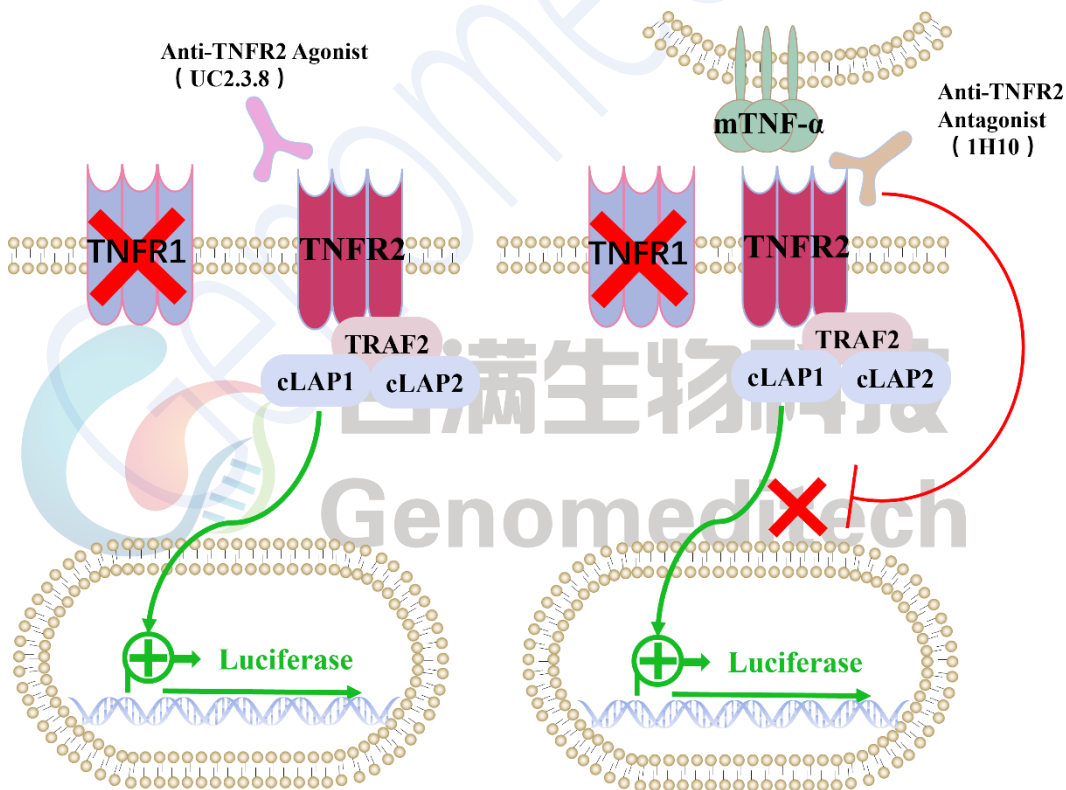


Fig.1 TNFR2 通路示意图

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+400 µg/mL Zeocin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640+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
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Zeocin	100 mg	Genomeditech/GM-040407-100MG
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell BIOSCIENCES/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	1000T	Genomeditech/GM-040503C
Membrane Bound H_TNFα CHO-K1 Cell Line	/	Genomeditech/GM-C25239
Anti-H_TNFR2 hIgG1 Antibody(1H10)	/	Genomeditech/GM-59476AB
Anti-H_TNFRSF1B(TNFR2) Antibody(UC2.3.8)	hIgG1 /	Genomeditech/GM-49245AB
Anti-TNFR1 hIgG1 Antibody (Atrosab)	/	Genomeditech/GM-51152AB

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. 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 × 10⁵ 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 × 10⁶ 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,待细胞状态稳定后开始细胞维持和繁殖,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 × 10⁶ cells/mL, 1 传 3, 隔 2-3 天继续传代,不要让其密度超 2 × 10⁶ 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. Anti-H_TNFR2 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Anti-H_TNFRSF1B(TNFR2) hIgG1 Antibody(UC2.3.8) (以下简称 UC2.3.8; 150 KDa) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 $4 \mu\text{g/mL}$ ，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	UC2.3.8	PBS	4 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	250 ng/mL	62.5 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 pg/mL	0 pg/mL	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 1-2 h，将细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用适量 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 2×10^6 cells/mL。以排枪加 $50 \mu\text{L}$ 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。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
UC2.3.8	1.62 mg/mL	0.162 mg/mL	取 $2 \mu\text{L}$ 储液+ $18 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 $69.71 \mu\text{L}$ 的 Assay buffer，B3-B11 加入 $55 \mu\text{L}$ 的 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 $3.62 \mu\text{L}$ UC2.3.8）

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.33 μL 加入次孔										对照孔
1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	3.62 μL UC2.3.8	加入	69.71 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 (如 B2) 中吸取 18.33 μL 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 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 孵育的孔板取出。
- j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 50 μL 。
- k) 盖上检测板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 7 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	61.04 pg/mL
	45989	458888	46168

3) 验证结果

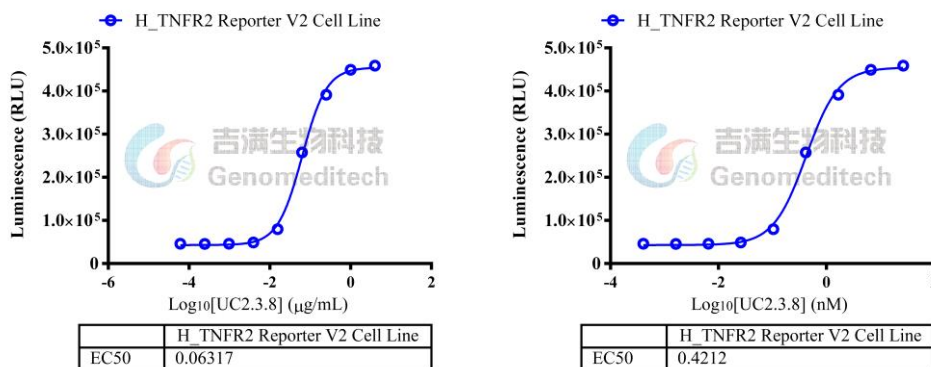


Fig.3 功能验证结果 (右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

2. 阻断实验

操作步骤可调整优化，本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line 和 1×10^4 cells/Well 的 Membrane Bound H_TNF α CHO-K1 Cell Line 进行实验。

本次实验使用 Anti-H_TNFR2 hIgG1 Antibody(1H10) (以下简称 Anti-H_TNFR2; 分子量: 150 kDa) 作为抑制药物, Conc.01 终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 4 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 μL 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-H_TNFR2 100 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{g/mL}$	1.56 $\mu\text{g/mL}$	390.63 ng/mL	97.66 ng/mL	24.41 ng/mL	6.1 ng/mL	1.53 ng/mL	381.47 pg/mL	95.37 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

- 实验前 16-24 h, 消化离心收集 Membrane Bound H_TNF α CHO-K1 Cell Line 细胞, 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密度到 1×10^5 cells/mL, 以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔, 周围的孔加 100 μL PBS, 盖板上盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h, 离心收集 H_TNFR2 Reporter V2 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 H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line 到 2×10^6 cells/mL。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- 对于待测样品, 使用一行 (如 B 行)。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-H_TNFR2	5.16 mg/mL	/	直接使用储液

- f) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1 孔加入 70.49 μL Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 55 μL Assay Buffer。
- g) 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 2.84 μL Anti-H_TNFR2），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.33 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	2.84 μL Anti-H_TNFR2	70.49 μL	55 μL	55 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													

- h) 从第一个梯度稀释孔（如 B1 孔）中吸取 18.33 μL 液体，加入到第二个稀释孔中（如 B2），充分混匀。
- i) 以此类推，直至 B11 孔。B12 为不加药物的对照。
- j) 取出步骤 b 准备好的 H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line 细胞，加入到步骤 i 准备好的药物孔板中，每孔各加 50 μL ；然后孵育 1 h。
- k) 1 h 后将步骤 a 准备好的 Membrane Bound H_TNF α CHO-K1 Cell Line 孔板取出，吸弃 100 μL 培养基；然后加入步骤 j 孵育好的混合液 100 μL ，盖上盖板，继续孵育 6 h。
- l) 使用 GMOne-Step 报告基因检测试剂盒，收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anti-H_TNFR2 + H_TNF α CHO-K1	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anti-H_TNFR2 + H_TNF α CHO-K1	95.37 pg/mL Anti-H_TNFR2 + H_TNF α CHO-K1
	96671	8097	83141

3) 验证结果

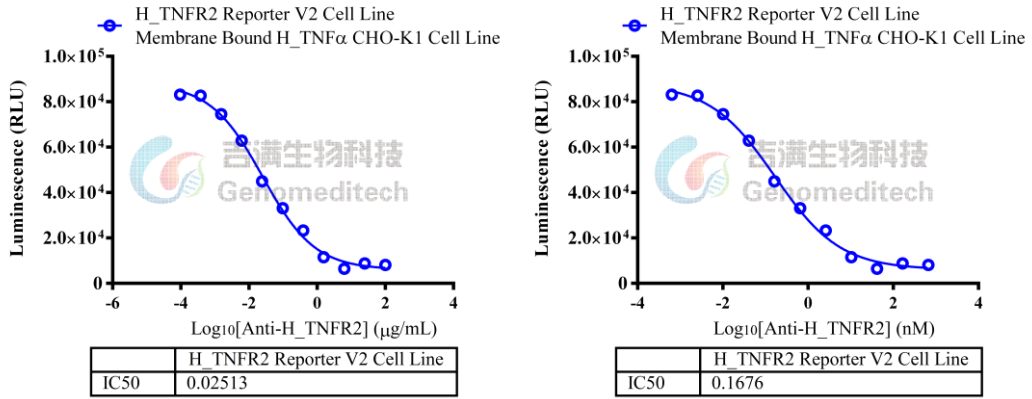


Fig.4 功能验证结果

(右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)



附录 1：测序结果



Fig.5 Sanger 测序结果显示，移码突变导致 H_TNFR1 蛋白翻译提前终止

附录 2：流式验证结果

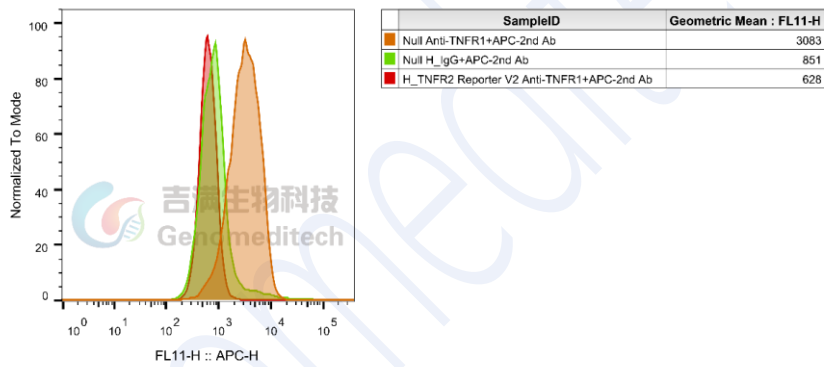


Fig.6 H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line (Genomeditech/GM-C25776) 和未敲除 TNFR1 的母细胞 (Null) 使用 Anti-TNFR1 hIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-51152AB) 抗体流式验证 TNFR1 的敲除效果

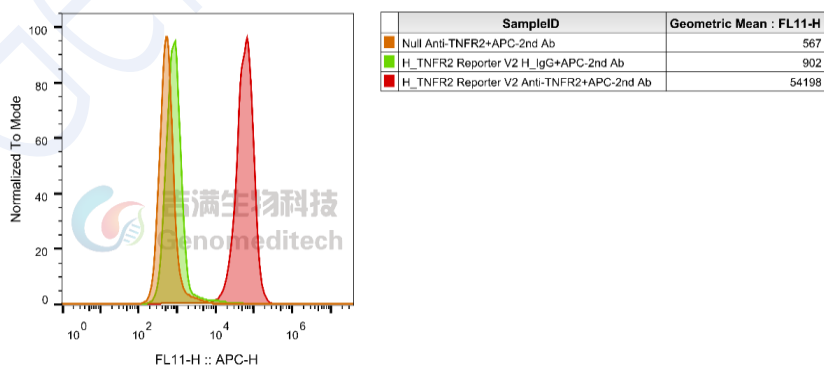


Fig.7 H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line (Genomeditech/GM-C25776) 和未敲除 TNFR1 的母细胞 (Null) 使用 Anti-H_TNFR2 hIgG1 Antibody(1H10) (Genomeditech/GM-59476AB) 抗体流式验证 TNFR2 表达

附录 3：稳定性验证结果

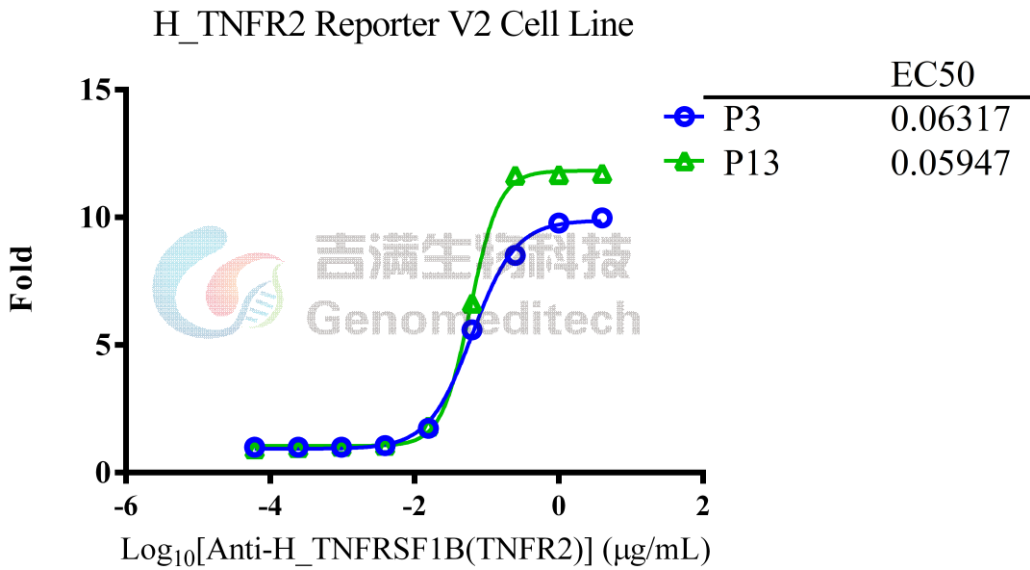


Fig.8 H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line (Genomeditech/GM-C25776) 使用 Anti-H_TNFRSF1B(TNFR2) hIgG1 Antibody(UC2.3.8) (Genomeditech/GM-49245AB) 稳定性验证结果

附录 4：TNF- α 蛋白激活验证结果

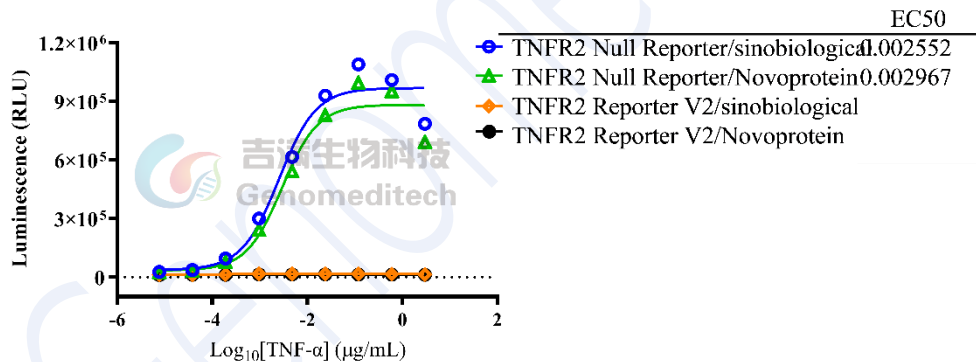


Fig.9 H_TNFR2 Null Reporter Cell Line (Genomeditech/GM-C27615) 和 H_TNFR2 Reporter V2 Cell Line (Genomeditech/GM-C25776) 分别使用 Recombinant Human TNF alpha (Novoprotein/C008)、Recombinant Human TNF-alpha Protein (Sinobiological/10602-HNAE) 药物验证结果

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