

产品手册

H_V γ 9V δ 2(MOP) Reporter Jurkat(TCR $\alpha\beta$ KO) Cell Line

H_V γ 9V δ 2(MOP) Reporter Jurkat(TCR $\alpha\beta$ KO) 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.3

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-BTN3A1 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.	Anti-V γ 9V δ 2 TCR 激活实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	10
附录 1	对照验证结果.....	11
附录 2	OKT3 激活验证结果.....	11
附录 3	流式验证结果.....	12
附录 4	测序结果.....	13
附录 5	稳定性验证结果.....	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-C28020	H_V γ 9V δ 2(MOP) Reporter Jurkat(TCR $\alpha\beta$ KO) Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C28020	H_V γ 9V δ 2(MOP) Reporter Jurkat(TCR $\alpha\beta$ KO) 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

$\alpha\beta$ T 细胞通过其表面受体 TCR 特异性识别靶细胞表面 MHC 分子呈递的“非我”或肿瘤新生多肽抗原，占 T 细胞群体的 65%-70%。相比之下， $\gamma\delta$ T 细胞占有所有 T 淋巴细胞的 0.5%-5%，其 TCRs 由 γ 链和 δ 链组成，主要存在于上皮和粘膜组织，比如皮肤、肠道等。 $\gamma\delta$ T 细胞能识别其目标抗原而不受 MHC 限制，能有效地杀灭肿瘤和病原体，通过识别非肽磷酸抗原 (PAgs) 激活。PAgs 是肿瘤细胞或微生物病原体代谢物。其中肿瘤细胞中胆固醇代谢通路异常会使其累积大量的内源性 DMAPP、IPP；病原体包括革兰氏阴性菌和疟原虫则产生另外一种异戊二烯焦磷酸 HMBPP。DMAPP、IPP 和 HMBPP 均能激活 $\gamma\delta$ T 细胞。外源性的 HMBPP 从化学结构上比肿瘤产生的内源性的 DMAPP、IPP 多一个羟基。使 HMBPP 激活 $\gamma\delta$ T 细胞的活性比 DMAPP、IPP 高近千倍，其 EC50 在 pM 级别。HMBPP 结合在 BTN3A1 的胞内段，与 BTN3A1 胞内段氨基酸 H351、Y352 形成了 2 个氢键。这种氢键结合使 BTN3A1 胞外段的构象变化，从而使 BTN3A1 胞外段与 $\gamma\delta$ T 细胞受体结合能力增强，从而促进了对 $\gamma\delta$ T 细胞的激活。人外周血中主要的 $\gamma\delta$ T 细胞亚群是 V γ 9V δ 2 T 细胞。已有研究开发出抗嗜丁醇亚家族 3 成员 A1 (BTN3A1) 的单抗，可以不依赖 PAgs 而特异性的激活 $\gamma\delta$ T 细胞。

吉满生物 H_V γ 9V δ 2(MOP) Reporter Jurkat(TCR $\alpha\beta$ KO) Cell Line 报告基因细胞系，是基于 TCR α/β 链 Knockout Jurkat 细胞构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 BTN3A 抗体结合 Jurkat 本底表达的 BTN3A 或 V γ 9V δ 2 TCR 抗体结合 V γ 9V δ 2 后，激活下游信号通路，从而激活荧光素酶 (Luciferase) 的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 V γ 9V δ 2 相关药物的体外效果评价。

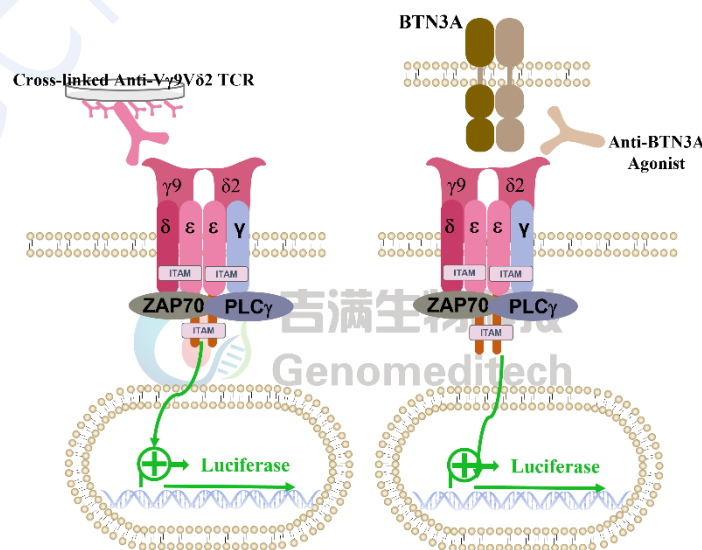


Fig.1 V γ 9V δ 2 通路示意图

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+400 µg/mL G418+200 µg/mL Hygromycin+0.75 µg/mL Puromycin
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
Hygromycin	1 g	Genomeditech/ GM-040403-1
G418	1 g	Genomeditech/ GM-040402-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
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
Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates	96-well	Thermo/442404
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C
Anti-BTN3A1 hIgG1 Antibody (mAb1)	/	Genomeditech/GM-52838AB
Anti-Vγ9Vδ2 TCR hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-75325AB
Human IgG1 Isotype Antibody	/	Genomeditech/GM-47471AB
Anti-CD3 epsilon Antibody [OKT-3 (muromonab)]	/	Genomeditech/GM-51478AB

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-BTN3A1 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_V γ 9V δ 2(MOP) Reporter Jurkat(TCR $\alpha\beta$ KO) Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Anti-BTN3A1 hIgG1 Antibody (mAb1) (以下简称 BTN3A1 Ab; 150 KDa) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 1 μ 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 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	BTN3A1 Ab	1 μ 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	15.26 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 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 2×10^6 cells/mL。以排枪加 50 μ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ 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
BTN3A1 Ab	1.38 mg/mL	0.138 mg/mL	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 72.27 μ L 的 Assay buffer，B3-B11 加入 55 μ L 的 Assay Buffer。

- f) 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 1.06 μL BTN3A1 Ab）。

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	1.06 μL BTN3A1 Ab	加入	72.27 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 24 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_V γ 9V δ 2(MOP) Reporter Jurkat(TCR $\alpha\beta$ KO) Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	15.26 $\mu\text{g/mL}$
	1623	20572	1427

3) 验证结果

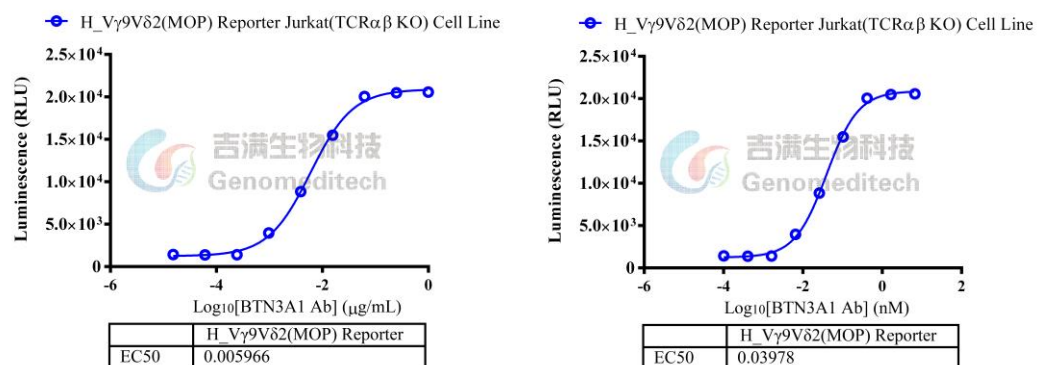


Fig.2 激活功能验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. Anti-V γ 9V δ 2 TCR 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_V γ 9V δ 2(MOP) Reporter Jurkat(TCR $\alpha\beta$ KO) Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Anti-V γ 9V δ 2 TCR hIgG1 Antibody（以下简称 Anti-V γ 9V δ 2 TCR；79 KDa）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 1.11 $\mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.08 分别排布在 B2-B9，B10 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	
B	Anti-V γ 9V δ 2 TCR	1.11 $\mu\text{g/mL}$	370.37 ng/mL	123.33 ng/mL	41.11 ng/mL	13.7 ng/mL	4.57 ng/mL	1.52 ng/mL	507.54 pg/mL	0	PBS	
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D												
E												
F												
G												
H												

1) 加样步骤

- 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
Anti-V γ 9V δ 2 TCR	4.590 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中，加入包被液（15 mM Na_2CO_3 ，35 mM NaHCO_3 ，pH 9.6），各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 164.96 μL 的包被液，B3-B10 加入 110 μL 的包被液。
- 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 0.04 μL Anti-V γ 9V δ 2 TCR）。
- 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 55 μL 液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 B3），充分混匀。
- 以此类推，直至第 8 个梯度稀释孔（B9）。

母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 55 μ L 加入次孔									对照孔		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	0.04 μ L Anti-V γ 9V δ 2 TCR 加入	164.96 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L		
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- h) 准备一个 96 孔高结合板, 紫外灭菌 15 min。将梯度稀释液加入到高结合板中, 100 μ L 每孔, 于 4 $^{\circ}$ C 过夜后使用。
- i) 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 1×10^6 cells/mL。
- j) 将步骤 h 包被过夜的孔板取出, 吸弃上清; Assay Buffer 润洗 2 遍后, 加入步骤 i 准备好的细胞悬液, 每孔 100 μ L。
- k) 盖上检测板盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 24 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_V γ 9V δ 2(MOP) Reporter Jurkat(TCR $\alpha\beta$ KO) Cell Line	0 μ g/mL	1.11 μ g/mL	507.54 pg/mL
	1637	540121	1507

3) 验证结果

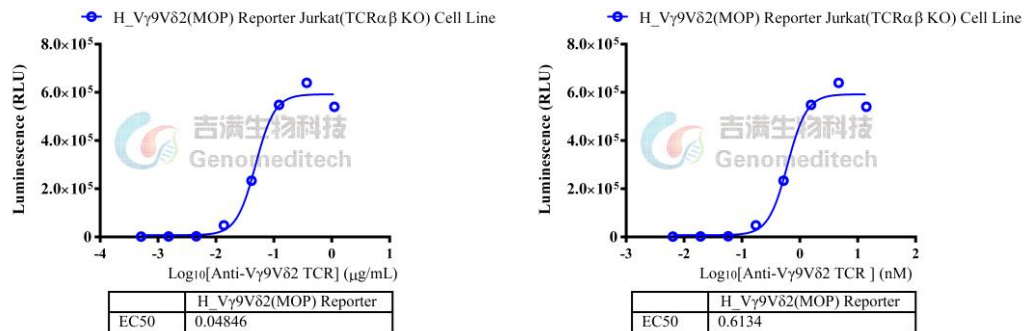


Fig.3 激活功能验证结果

(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 对照验证结果

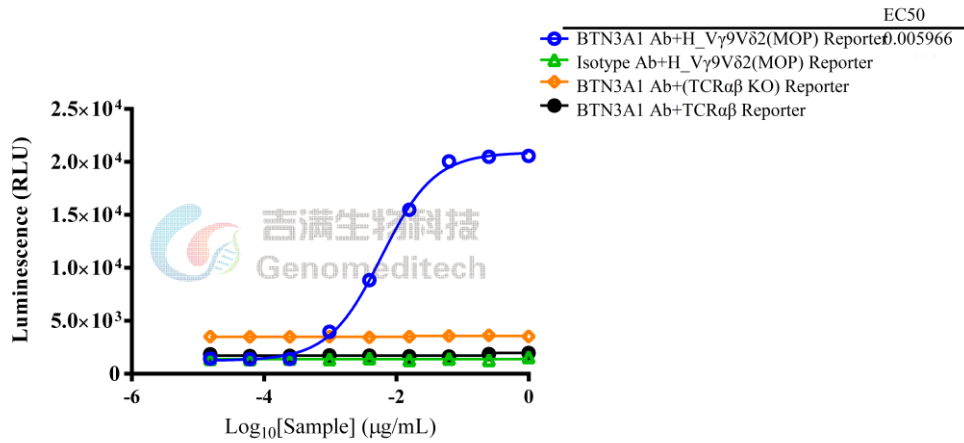


Fig.4 对照细胞、对照抗体验证结果

附录 2 OKT3 激活验证结果

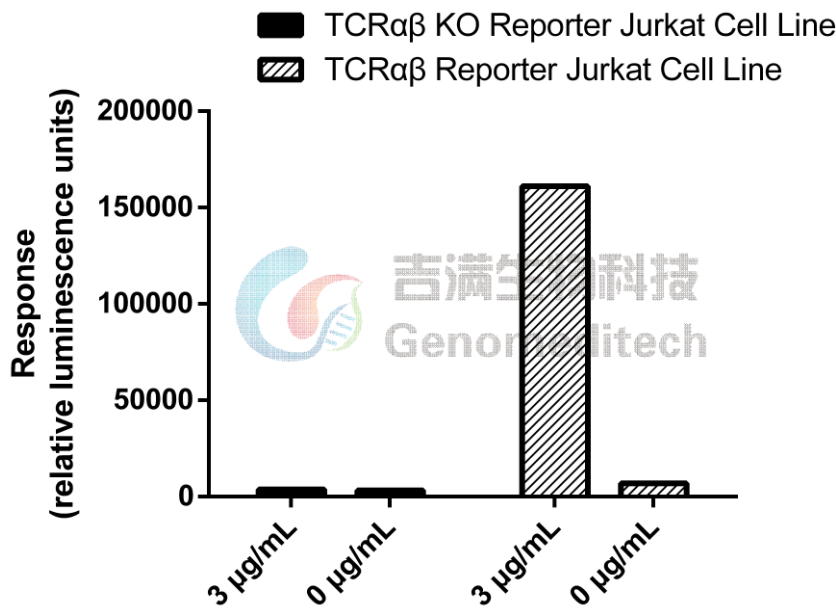


Fig 5. 使用 OKT3 药物, 1E5/孔细胞量, 16h. 结果显示, OKT3 激活 TCRαβ KO Reporter Jurkat Cell Line 无效, OKT3 激活 TCRαβ reporter Jurkat Cell Line 有效

附录 3 流式验证结果

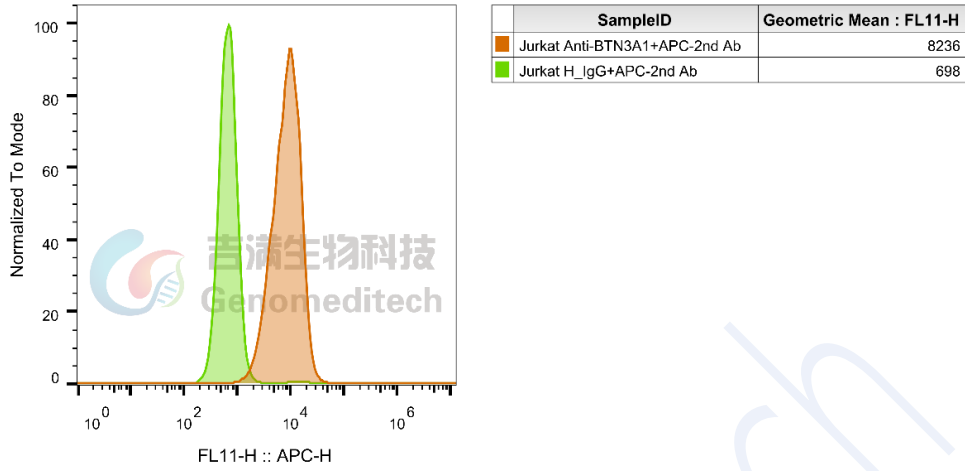


Fig 6. Jurkat 空细胞使用 Anti-BTN3A1 hIgG1 Antibody(mAb1) (Genomeditech/GM-52838AB)流式验证有表达

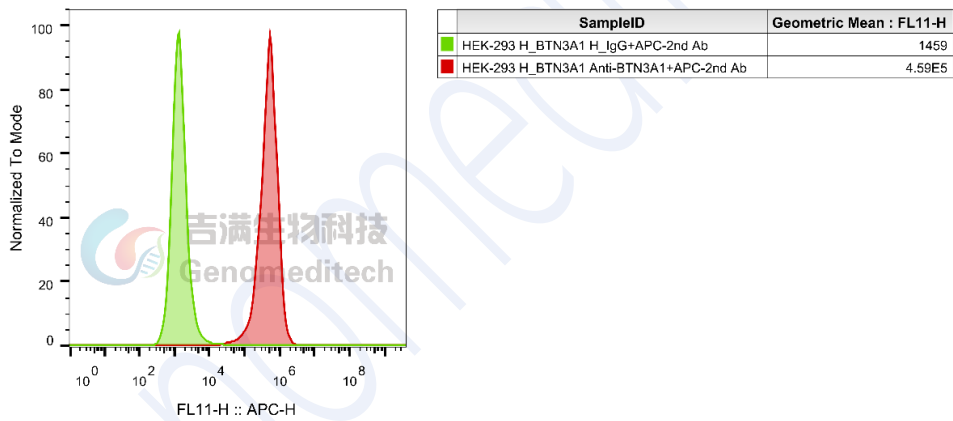


Fig 7. H_BTN3A1 HEK-293 Cell Line(Genomeditech/GM-C19701)使用 Anti-BTN3A1 hIgG1 Antibody(mAb1) (Genomeditech/GM-52838AB)流式验证结果

附录 4 测序结果

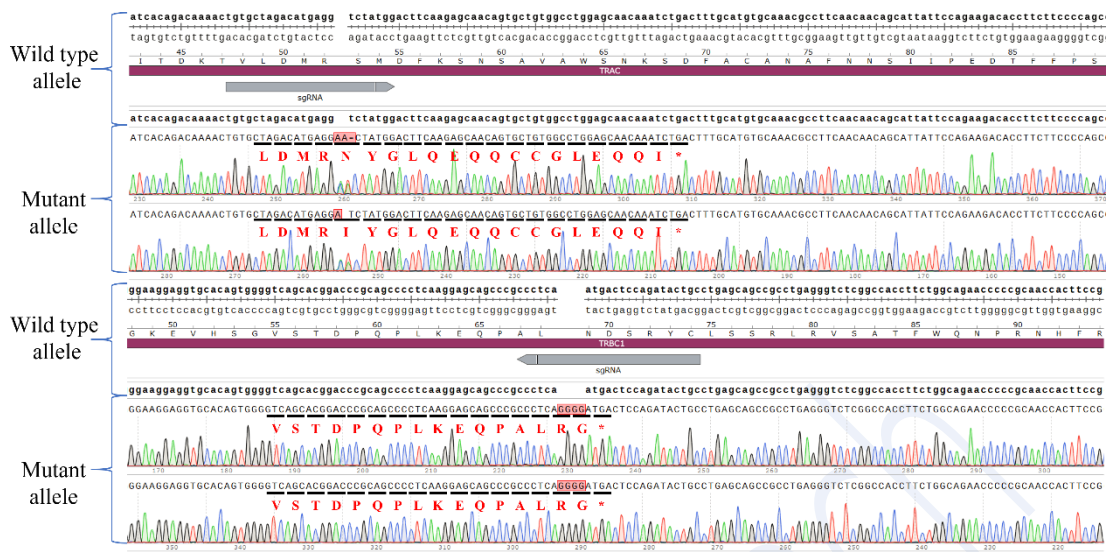


Fig 8. TCR $\alpha\beta$ KO Reporter Jurkat Cell Line 测序验证敲除效果

附录 5 稳定性验证结果

H_V γ 9V δ 2(MOP) Reporter Jurkat(TCR $\alpha\beta$ KO) Cell Line

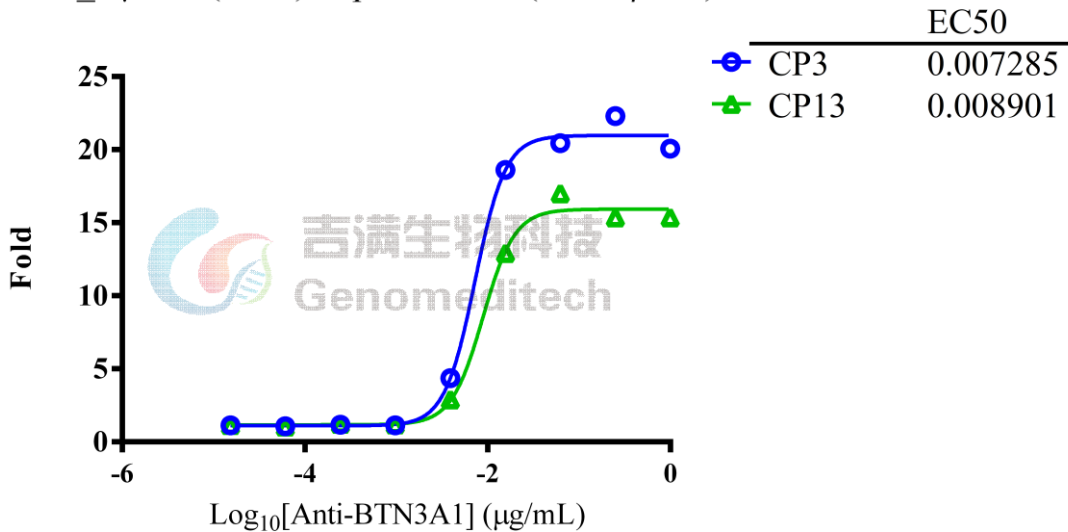


Fig 9. H_V γ 9V δ 2(MOP) Reporter Jurkat(TCR $\alpha\beta$ KO) Cell Line 稳定性验证结果

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