

产品手册

H_CD200R1 Blockade Reporter Cell Line

H_CD200R1 Blockade Reporter 细胞

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.240525

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、	细胞培养、复苏、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. Assay 验证——CD200R 拮抗剂.....	7
	1) 加样步骤.....	7
	2) 报告基因检测.....	8
	3) 验证结果.....	9
	使用许可协议:	10

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-C31022	H_CD200R1 Blockade Reporter Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C31022	H_CD200R1 Blockade Reporter 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

OX-2 膜糖蛋白，也称为 CD200，含有两个 IgSF 免疫球蛋白结构域、跨膜区和一个 19 个氨基酸长的胞质结构域。CD200 属于免疫球蛋白超家族，特别是属于 B7 受体家族。

CD200R1 是细胞表面跨膜糖蛋白 CD200 受体 1，在骨髓细胞和 CD4+ T 细胞表面表达。

CD200 与 CD200R 的结合导致 CD200R 细胞质 PTB 结构域上的酪氨酸磷酸化。这导致接头蛋白 DOK-1 和 DOK-2 的募集，促进 SHIP 与 DOK-1 的结合，以及 RasGAP 的募集，从而负向调节 MAPK/ERK 信号通路。这种信号传导导致促炎细胞因子释放的抑制、免疫细胞活化的抑制以及肥大细胞脱颗粒的抑制。

吉满生物 H_CD200R1 Blockade Reporter Cell Line 报告基因细胞系，通过将 CD200R1 蛋白的胞内抑制信号替换为强激动信号；当 CD200 结合细胞表面改造后的 CD200R1 蛋白后，导致 CD200R1 的胞内区域激活，继而激活下游信号通路促使荧光素酶（Luciferase）表达，且这种激活作用可以被具有 Block 效应的抗体阻断。Luciferase 读值即代表信号通路的激活和阻断效果，因此可用于 CD200 和 CD200R1 相关抗体药物的体外效果评价。

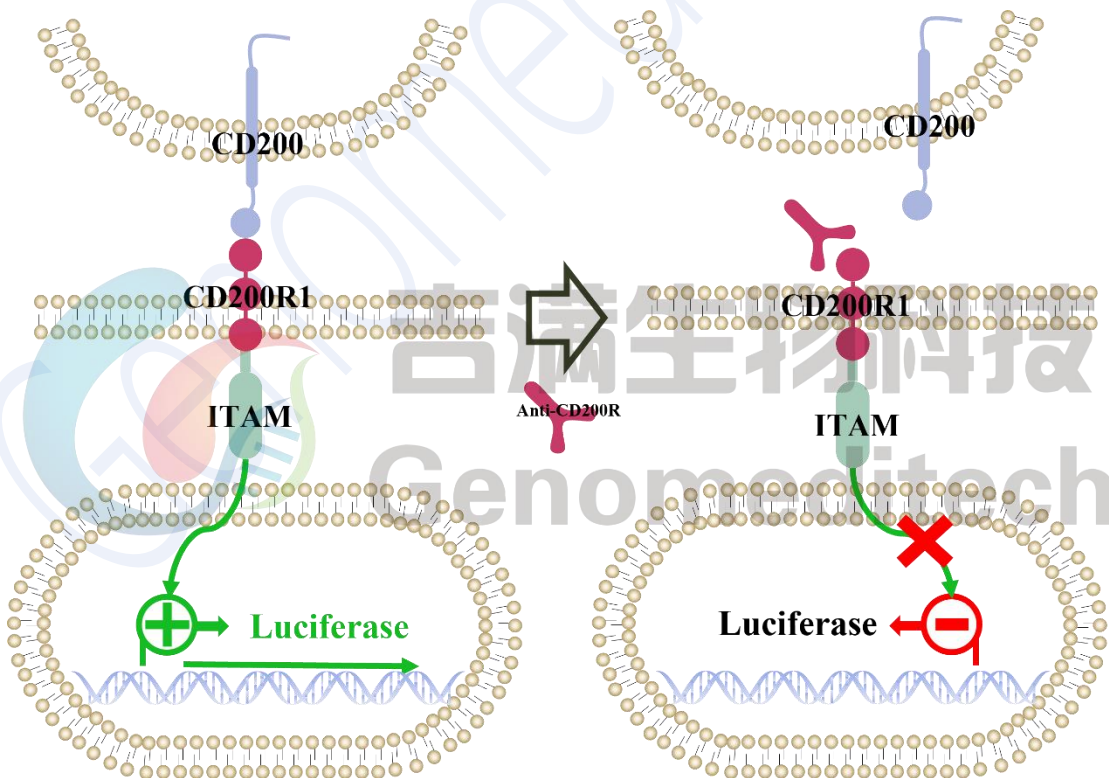


Fig 1. 原理示意图

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
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
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
H_CD200 CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL	Genomeditech/GM-C25422
Anti-CD200R hIgG4 Antibody	/	Genomeditech/GM-48240AB
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
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 × 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. Assay 验证——CD200R 拮抗剂

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_CD200R1 Blockade Reporter Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔，H_CD200 CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Anti-CD200R hIgG4 Antibody（以下简称为 Anti-CD200R；分子量：150 kDa）作为阳性拮抗剂，首孔终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，3 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 μL PBS，以防止边孔蒸发。具体孔板排布如下：

	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-CD200R	100 $\mu\text{g/mL}$	33.33 $\mu\text{g/mL}$	11.11 $\mu\text{g/mL}$	3.7 $\mu\text{g/mL}$	1.23 $\mu\text{g/mL}$	411.52 ng/mL	137.17 ng/mL	45.72 ng/mL	15.24 ng/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，消化离心收集 H_CD200 CHO-K1 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到 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于培养箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h，离心收集 H_CD200R1 Blockade Reporter Cell Line 细胞，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，调整细胞浓度到 2×10^6 cells/mL。
- 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 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-CD200R	2 mg/mL	/	直接使用储液

- 在 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 27.5 μL , 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	8.25 μL Anti-CD200R	加入	74.25 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) 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 8.25 μL Anti-CD200R)。
- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5 μL 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 B3, 充分混匀。
- i) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- j) 将步骤 b 准备好的 H_CD200R1 Blockade Reporter Cell Line 细胞取出, 向步骤 i 的梯度稀释的抗体孔板中, 依次加入 55 μL 细胞 (B2-B11), 孵育 1 h。
- k) 1 h 后将步骤 a 准备好的 H_CD200 CHO-K1 细胞孔板取出, 每孔吸弃 90 μL 细胞, 然后将步骤 j 孵育好的混合液, 吸取 100 μL /孔加入到步骤 a 的细胞孔板中, 盖上盖板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中继续孵育 15 h。
- l) 使用 GMOne-Step 报告基因检测试剂盒, 检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CD200R1 Blockade Reporter Cell line	H_CD200 CHO+None Ab	H_CD200 CHO+100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ab	H_CD200 CHO+15.24 ng/mL Ab
	850697	138298	891330

3) 验证结果

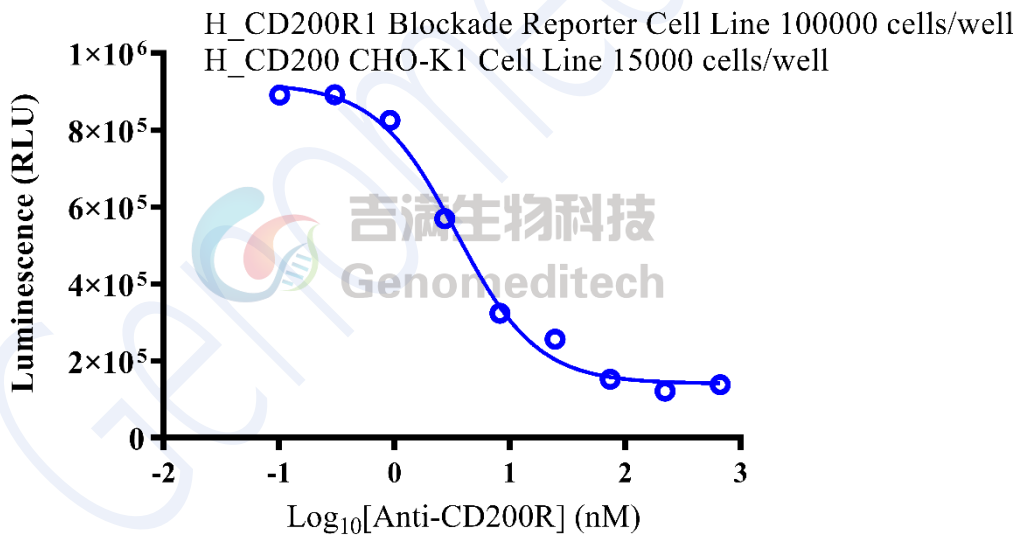
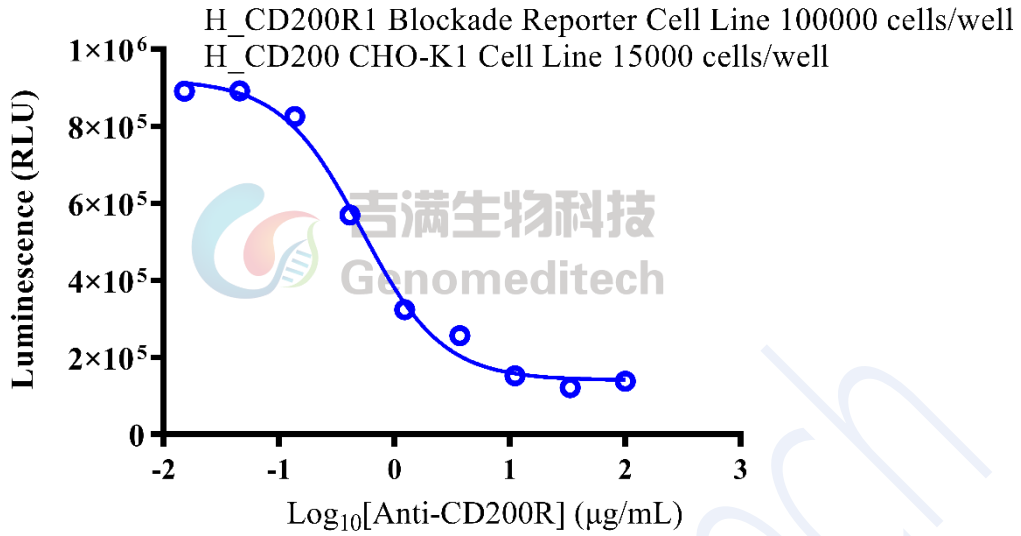


Fig 2.功能验证结果

(下图对抗体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