

## 产品手册

### H\_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat Cell Line

### H\_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat 细胞

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.8.1

## 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. H_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat Cell Line 细胞复苏..... | 6  |
|    | 2. H_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat Cell Line 细胞传代..... | 6  |
|    | 3. H_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat Cell Line 细胞冻存..... | 6  |
| 六、 | 使用方法.....  | 7  |
|    | 1. 功能验证实验.....   | 7  |
|    | 1) 加样步骤.....   | 7  |
|    | 2) 报告基因检测.....   | 9  |
|    | 3) 验证结果.....   | 9  |
|    | 使用许可协议: .....  | 10 |
|    | 附录 H_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat 流式结果 .....          | 11 |

## 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-C18952 | H_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat Cell Line | 5E6 Cells/mL |

### 组成成分

| 产品编号      | 产品名称                                      | 规格           | 数量  | 储存     |
|-----------|---|--------------|-----|--------|
| GM-C18952 | H_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat 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

人脊髓灰质炎病毒受体相关免疫球蛋白结构域蛋白(PVRIG)，也称为 CD112 受体 (CD112R)，是脊髓灰质炎病毒受体样蛋白(PVR)家族中一个约 34 kDa 的单跨膜蛋白。CD112R 基因编码单个跨膜蛋白，该蛋白由单个胞外 IgV 结构域、一个跨膜结构域和一个长胞内结构域组成。膜受体与 CD226(DNAM-1)竞争性结合 CD112。在经过一系列的信号，激活受体胞内的 ITIM 基序，抑制淋巴细胞的激活。用抗体阻断 PVRIG 与 CD112 的相互作用可增强 T 细胞的杀伤作用。

吉满生物 H\_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat Cell Line 报告基因细胞系稳定表达 H\_PVRIG(CD112R)基因及 Luciferase 报告基因，可用于靶向 H\_PVRIG(CD112R)的单抗等治疗性抗体的体外效果评价。

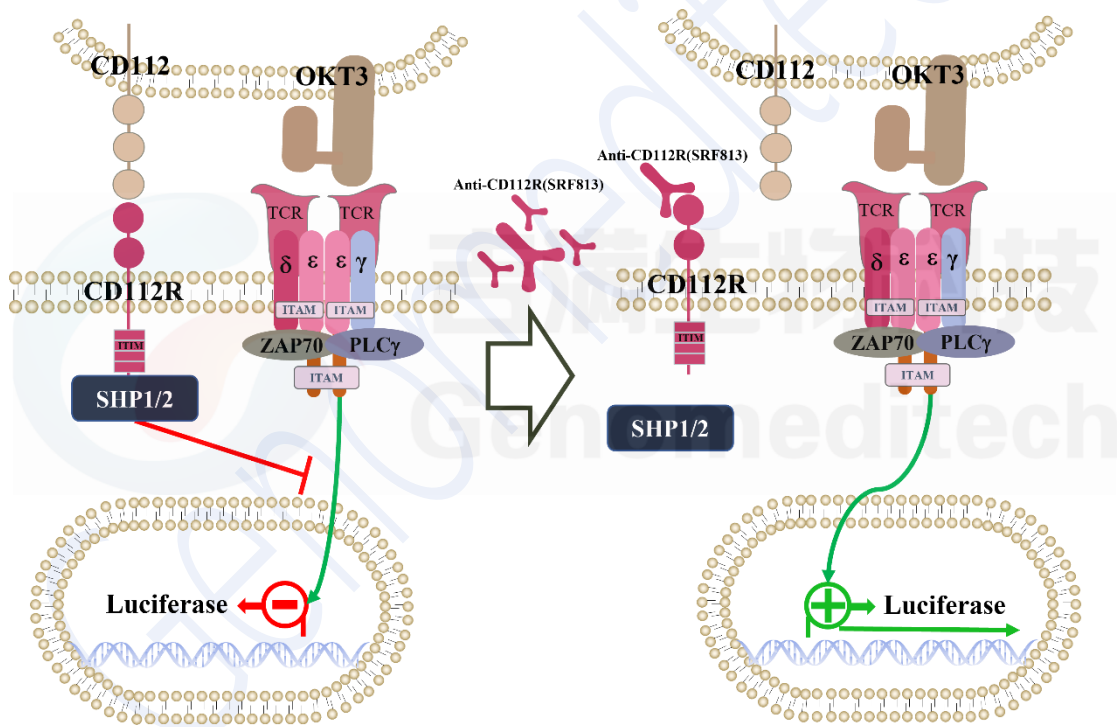


Fig 1. 原理示意图

## 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+0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin+3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin |
| 细胞冻存培养基:      | 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        | gibco/C11875500BT/8121699  |
| 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               |
| H_CD112 aAPC CHO-K1 Cell Line                                | 5E6 Cells/mL  | Genomeditech/GM-C18951     |
| Anti-CD112R hIgG1 Antibody(SRF813)                           | /             | Genomeditech/GM-48167AB    |
| GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit                | /             | Genomeditech/GM-040503     |

#### 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. H\_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat 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。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。
- e) 通过补加培养基的形式调整活细胞密度为  $4-6 \times 10^5$  cells/mL，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL 悬液），竖瓶培养。

### 2. H\_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat Cell Line 细胞传代

- a) 当细胞密度达到  $1.5-2 \times 10^6$  cells/mL，1 传 3，隔 2-3 天继续传代，不要让其密度超过  $2 \times 10^6$  cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养。
- b) 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新鲜培养液，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。
- c) 注意营养，不处理时务必隔天适当补加培养基。

### 3. H\_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat 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. 功能验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  cells/孔。本次实验使用 Anti-CD112R hIgG1 Antibody(SRF813)（以下简称 Anti-CD112R; 150 kDa）作为阳性药物。Conc.01 终浓度为  $100 \mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.14 分别排布在 B2-C5，C6 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-CD112R | 100<br>$\mu\text{g/mL}$ | 25<br>$\mu\text{g/mL}$  | 6.25<br>$\mu\text{g/mL}$ | 1.56<br>$\mu\text{g/mL}$ | 390.63<br>$\text{ng/mL}$ | 97.66<br>$\text{ng/mL}$ | 24.41<br>$\text{ng/mL}$ | 6.1<br>$\text{ng/mL}$ | 1.53<br>$\text{ng/mL}$ | 381.47<br>$\text{pg/mL}$ | PBS |
| C | PBS         | 95.37<br>$\text{pg/mL}$ | 23.84<br>$\text{pg/mL}$ | 5.96<br>$\text{pg/mL}$   | 1.49<br>$\text{pg/mL}$   | 0                        | PBS                     | PBS                     | PBS                   | PBS                    | PBS                      | PBS |
| D |             | PBS                     | PBS                     | PBS                      | PBS                      | PBS                      |                         |                         |                       |                        |                          |     |
| E |             |                         |                         |                          |                          |                          |                         |                         |                       |                        |                          |     |
| F |             |                         |                         |                          |                          |                          |                         |                         |                       |                        |                          |     |
| G |             |                         |                         |                          |                          |                          |                         |                         |                       |                        |                          |     |
| H |             |                         |                         |                          |                          |                          |                         |                         |                       |                        |                          |     |

#### 1) 加样步骤

- 在实验前 16-24 h，将 H\_CD112 aAPC CHO-K1 细胞从培养瓶中消化下来，以新鲜培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以新鲜培养基调整细胞浓度为  $4 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加  $100 \mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔。周围的孔加  $100 \mu\text{L}$  PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。
- 在实验前 1 h，将 H\_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat 细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用 Assay Buffer 重悬，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$  cells/mL。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。

## d) 母液配置

| 抗体名称        | 储液      | 母液 | 配置方法   |
|-------------|---------|----|--------|
| Anti-CD112R | 2 mg/mL | /  | 直接使用储液 |

e) 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。B2 孔中加入 66  $\mu\text{L}$  的 Assay buffer, B3-C6 加入 55  $\mu\text{L}$  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 7.3  $\mu\text{L}$  Anti-CD112R)。

| 母液吸取 |                               | 梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.3 $\mu\text{L}$ , 加入次孔 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|------|-------------------------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|      | 1                             | 2  | 3                | 4                | 5                | 6                | 7                | 8                | 9                | 10               | 11               | 12               |
| A    |                               |  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| B    | 7.3 $\mu\text{L}$ Anti-CD112R | 加入                                       | 66 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ |
| C    | 从 B11 孔                       | 加入                                       | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ |                  |                  |                  |                  |                  |
| D    |                               |  |                  |                  |                  | 对照孔              |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| E    |                               |  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| F    |                               |  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| G    |                               |  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| H    |                               |  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |

g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.3  $\mu\text{L}$  液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 B3, 充分混匀。

h) 以此类推, 直至第 14 个梯度稀释孔 (C5)。

i) 将步骤 b 调整好细胞密度的 H\_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat 细胞取出, 加入到步骤 h 的梯度稀释的抗体中, 每孔 55  $\mu\text{L}$  (B2-C6), 混匀后, 孵育 1 h。

j) 1 h 后, 将步骤 a 孵育过夜的 H\_CD112 aAPC CHO-K1 细胞孔板取出, 每孔吸弃 90  $\mu\text{L}$  培养基。从步骤 i 的细胞孔板中, 每孔吸取 100  $\mu\text{L}$  加入到步骤 a 的细胞孔板中。

k) 盖上班盖, 于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养 6 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_CD112R(PVRIG) Reporter<br>Jurkat Cell line | 0 $\mu\text{g/mL}$ | 100 $\mu\text{g/mL}$ | 1.49 $\text{pg/mL}$ |
|  | 84709              | 180405               | 95624               |

## 3) 验证结果

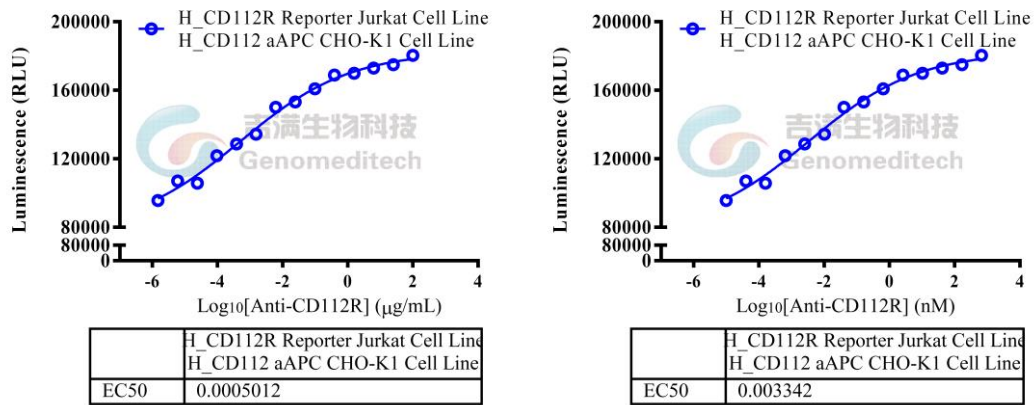


Fig 2.功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 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

## 附录 H\_CD112R(PVRIG) Reporter Jurkat 流式结果

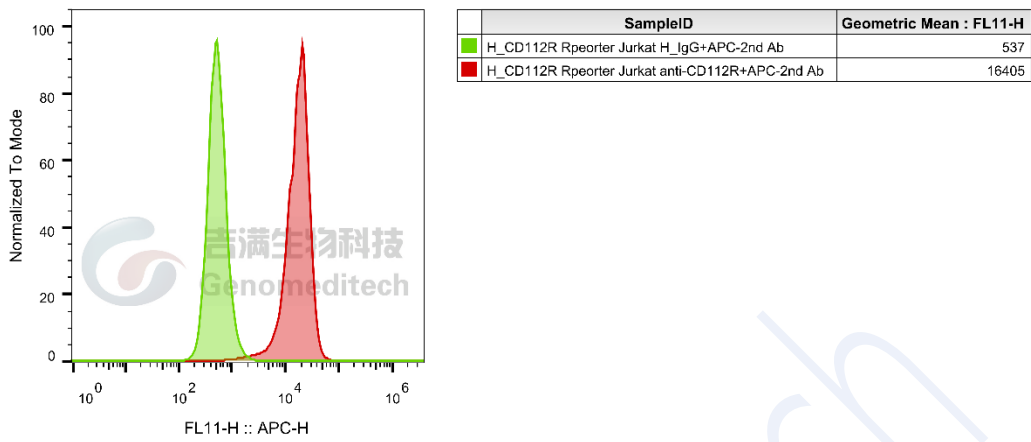


Fig 3.使用 Anti-CD112R hIgG1 Antibody(SRF813)(Genomeditech/GM-48167AB)流式验证结果