

产品手册

H_TREM2 Reporter Jurkat Cell Line

H_TREM2 Reporter Jurkat 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.1

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.	激活验证实验 (Crosslink)	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	9
2.	VG-3927 药物激活实验	10
加样步骤		10
报告基因检测		11
验证结果		11
附录：	流式验证结果	12
产品清单：		12
使用许可协议：		12

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-C44356	H_TREM2 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-C44356	H_TREM2 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

骨髓细胞表达的触发受体 2 (TREM-2)，是一种在人体中由 TREM2 基因编码的蛋白质。TREM-2 蛋白主要在许多不同组织的免疫细胞中表达。正日益成为不同炎症性疾病的重要受体，并且可能具有未来作为治疗靶点的潜力。

TREM-2 与同型二聚体 DAP12 结合。导致其上的免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM) 被酪氨酸激酶磷酸化。磷酸化的 ITAM 招募并激活 Syk 酪氨酸激酶，进而通过 GRB2/SOS1、DOK3 等适配蛋白激活磷脂酶 C γ (PLC γ)。活化的 PLC γ 水解磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP₂)，生成三磷酸肌醇 (IP₃) 和二酰甘油 (DAG)。IP₃介导细胞内钙离子 (Ca²⁺) 浓度升高，这一系列信号事件最终诱导抗炎细胞因子的产生、细胞骨架重排以及吞噬作用。

吉满生物 H_TREM2 Reporter Jurkat Cell Line 报告基因细胞系，是基于 PLC γ 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。通过信号通路的激活，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 TREM2 相关药物的体外效果评价。

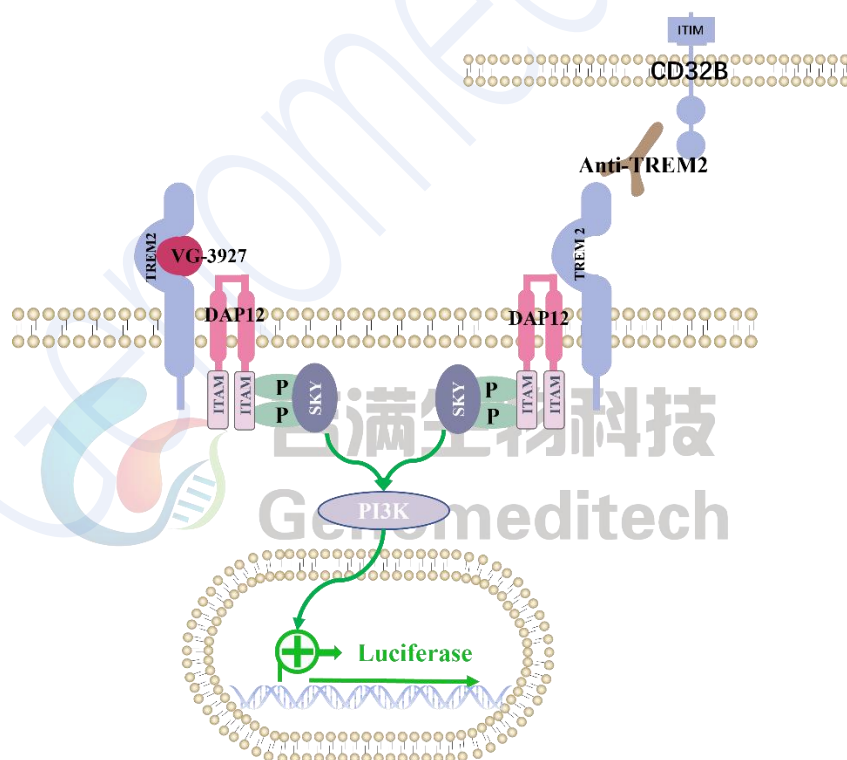


Fig 1.信号通路图

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+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.
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
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
H_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line	1 管(5E6 Cells/mL)	Genomeditech/GM-C16925
Anti-TREM2 hIgG1 Antibody(AL002)	/	Genomeditech/GM-88284AB
VG-3927	2 mg	probechem/PC-24792
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	Genomeditech/GM-040513C

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， $176 \times g$ ，离心 5 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 $4-6 \times 10^5$ 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 $176 \times g$ ，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。

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，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 $1.5-2 \times 10^6$ cells/mL，1 传 3，隔 2-3 天继续传代，不要让其密度超 2×10^6 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。
- FBS 需 56°C 加热 30 分钟，可灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

六、 使用方法

1. 激活验证实验（Crosslink）

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TREM2 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 5×10^4 cells/孔，H_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Anti-TREM2 hIgG1 Antibody(AL002)（约 150 kDa；以下简称 Anti-TREM2）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ ，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 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-H_TREM2	PBS	30.00 μg/mL	7.50 μg/mL	1.88 μg/mL	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.30 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 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

- 在实验前 16-24 h，将 H_FCGR2B(CD32B) 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 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上班盖，放入培养箱中孵育过夜。
- 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

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-H_TREM2	4.8 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 80 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 60 μL 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 1.01 μL Anti-H_TREM2），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 20 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.01 μL Anti-H_TREM2	加入	80 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 20 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- i) 在实验前 1 h，将 H_TREM2 Reporter Jurkat Cell Line 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 1×10^5 cells/mL。
- j) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出，弃上清；加入步骤 i 准备好的 H_TREM2 Reporter Jurkat Cell Line 溶液，每孔 50 μL 。
- k) 然后加入步骤 h 准备好抗体溶液，每孔 50 μL 。
- l) 盖上板盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 6 h。
- m) 使用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_TREM2 Reporter Jurkat Cell Line + H_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	30.00 $\mu\text{g/mL}$	457.76 pg/mL
	50080	10422399	52573

3) 验证结果

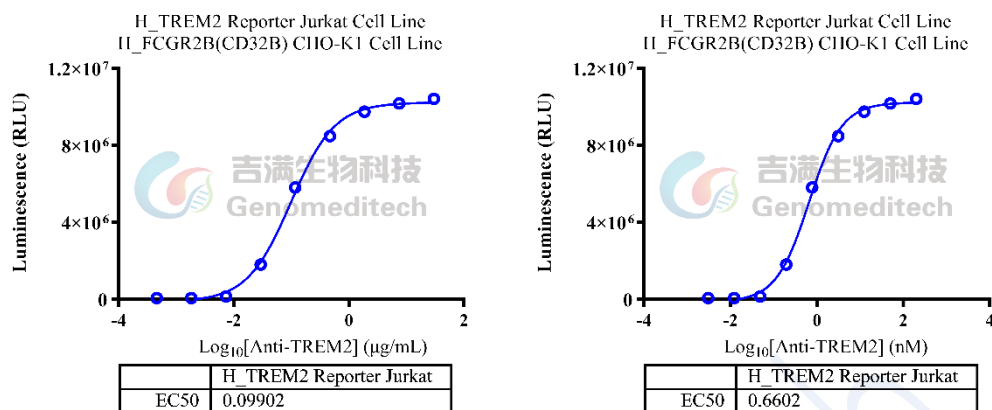


Fig 2.功能验证结果

(右图对药物或抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

2. VG-3927 药物激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TREM2 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 5×10^4 Cells/孔。本次实验使用 VG-3927 (451.93 Da) 作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 50 μ M，2 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围为 100 μ L PBS，以防止边孔蒸发。孔板布局：

		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	VG-3927	50.00 μM	25.00 μM	12.50 μM	6.25 μM	3.13 μM	1.56 μM	781.25 nM	390.63 nM	195.31 nM	97.66 nM	48.83 nM	0
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

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 1×10^5 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。盖板上盖，放入培养箱中备用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B1-B11）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
VG-3927	10 mM	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1 孔加入 120 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 60 μ L 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 B1 中加入 1.21 μ L VG-3927），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 60 μL，加入次孔											对照组
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.21 μL VG-3927	120 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL		60 μL
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B1 中吸取 60 μ L, 加入到第 2 个梯度稀释孔 B3, 充分混匀。以此类推, 直至第 11 个梯度稀释孔 (B11)。
- h) 将步骤 a 准备的细胞孔板取出, 加入步骤 g 准备好的梯度稀释液, 每孔 50 μ L。
- i) 盖上板盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 16 h。
- j) 使用报告基因检测试剂盒, 检测 Luciferase。

报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TREM2 Reporter Jurkat Cell Line	0 μ M	50.00 μ M	48.83 nM
	97452	2789067	110083

验证结果

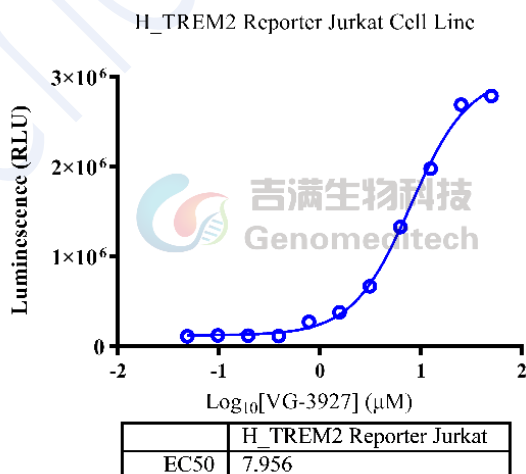


Fig 3.功能验证结果

附录：流式验证结果

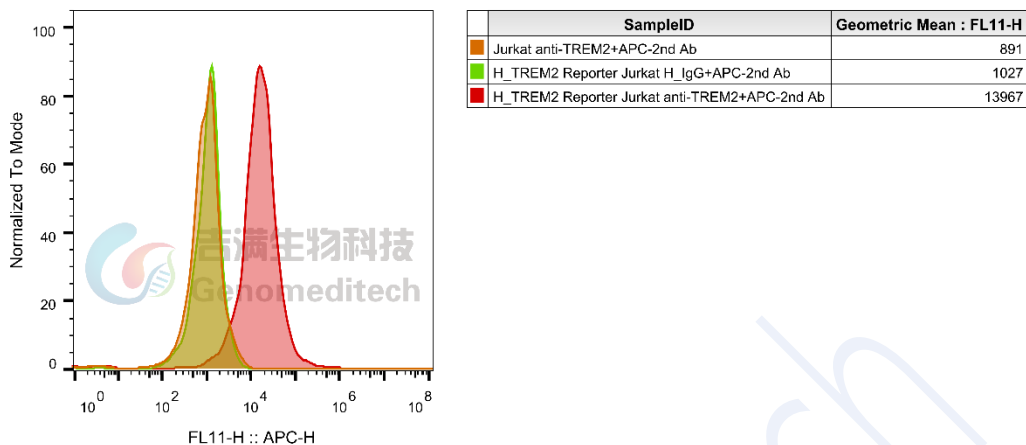


Fig 4.使用 Anti-TREM2 hIgG1 Antibody(AL002) (Genomeditech/GM-88284AB)流式验证结果

产品清单：

TREM2	
H_TREM2 Reporter Jurkat Cell Line	Cynomolgus_TREM2 CHO-K1 Cell Line
Cynomolgus_TREM2 HEK-293 Cell Line	H_TREM2 CHO-K1 Cell Line
H_TREM2 HEK-293 Cell Line	Mouse_TREM2 HEK-293 Cell Line
Anti-H_TREM2 hIgG4 Antibody	Anti-H_TREM2 Rat_IgG2b Antibody
Anti-TREM2 hIgG1 Antibody	

使用许可协议：

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策：

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。