

## 产品手册

### H\_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat Cell Line

### H\_LILRB2(ILT4) 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：V2.8.5

## 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、	细胞培养、复苏、冻存.....	6
	1. H_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat Cell Line 细胞复苏.....	6
	2. H_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat Cell Line 细胞传代.....	6
	3. H_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat Cell Line 细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	8
1.	功能验证实验-Anti-H_HLA-G1.....	8
	1) 加样步骤.....	8
	2) 报告基因检测.....	9
	3) 验证结果.....	10
2.	功能验证实验-Anti-H_LILRB2.....	10
	1) 报告基因检测.....	10
	2) 验证结果.....	10
附录:	稳定性验证.....	11
附录:	流式验证结果.....	11
	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-C16968	H_LILRB2(ILT4) 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-C16968	H_LILRB2(ILT4) 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

LILRB2 是抑制性白细胞免疫球蛋白样受体 (The leukocyte Ig-like receptor subfamily B, LILRB) 家族中的成员, 该蛋白是一次跨膜的糖蛋白, 胞外区有免疫球蛋白类似 (Ig-like) 的结构域, 胞内区域有 ITIM 基序 (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)。LILRB2 膜受体通过结合对应的配体能够激活受体胞内的 ITIM 基序, 经过一系列的信号传导后抑制 T 细胞的激活。

HLA-G 是一种非经典的 MHC I 类分子, 在胎儿-母体耐受性中起着至关重要的作用, 是一种免疫检查点分子。HLA-G 通过 LILRB1 (ILT2) 和 LILRB2 (ILT4) 受体的相互作用抑制细胞毒性 T 细胞, 自然杀伤 (NK) 细胞和 B 细胞的活性, 诱导 T 细胞失能, 并促进 T 调节细胞 (Tregs) 发育。此外, 在骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) 或耐受性树突状细胞 (DC) 这类抗原呈递细胞 (APC) 上表达的 HLA-G, 会促进 T 细胞反应迟钝并诱导 Treg 分化。

吉满生物 H\_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat Cell Line 报告基因细胞系, 是基于 LILRB2 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。该细胞稳定表达 H\_LILRB2(ILT4)基因及 Luciferase 报告基因, 可用于靶向 H\_LILRB2(ILT4)的单抗或双抗等治疗性抗体的体外效果评价。

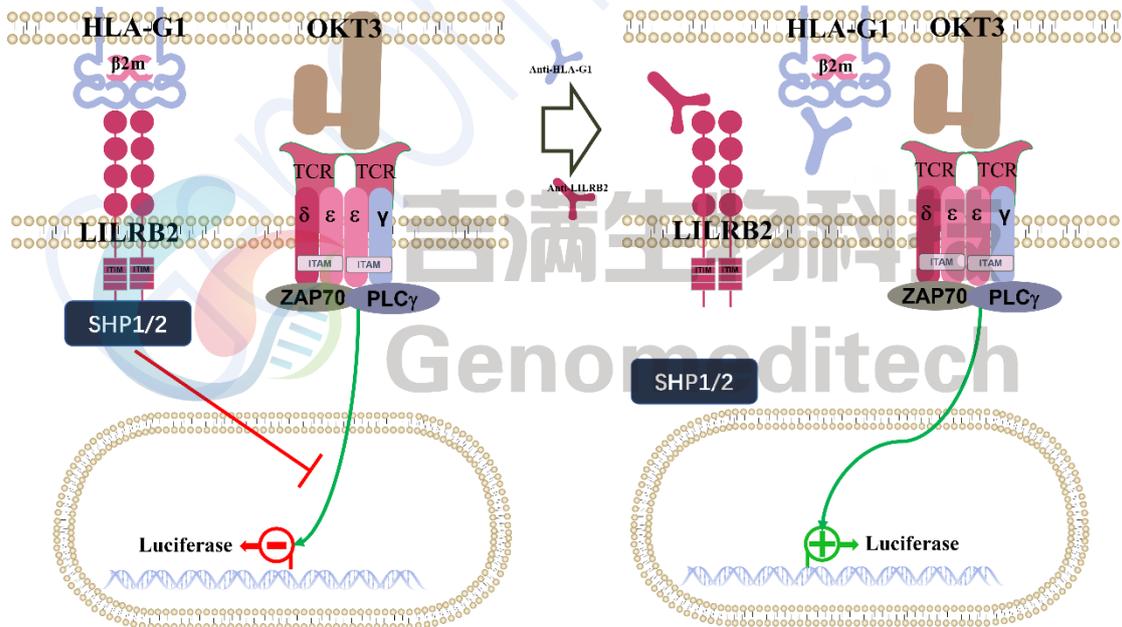


Fig 1. 原理示意图

## 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 µg/mL Puromycin+3.5 µg/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	BI/ 01-100-1ACS
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_HLA-G1 OKT3 CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL	Genomeditech/GM-C16834
Anti-H_LILRB2(ILT4) hIgG4 Antibody	/	Genomeditech/GM-27362AB
Anti-H_HLA-G1 hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-28208AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C

注：可选用吉满生物 Complete Growth Medium 4-BP (Cat. GM-042173) 现货完全培养基，其中含有血清、双抗及生长因子等，无需额外再行添加可直接使用。为您的细胞提供充足的营养和最优的条件。

#### 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\_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat Cell Line 细胞复苏

- a) 细胞冻存密度为  $5 \times 10^6$  cells/mL，冻存管分装 1 mL。
- b) 在 37°C 水浴锅预热培养基，加入预热完全培养基 5 mL 到 15 mL 离心管。
- c) 从液氮中取出冻存的细胞并迅速放入 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。
- d) 用 70% 乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。
- e) 在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到预先加有预热好的 15 mL 离心管中，轻轻混匀，1000 rpm，离心 5 min 使细胞沉淀，弃上清。
- f) 冻存细胞离心后收集沉淀，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。
- g) 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\_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat Cell Line 细胞传代

- a) 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完全培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加培养基，瓶体改为横向放置。
- b) 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  $2 \times 10^6$  cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养。
- c) 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。
- d) 该细胞对细胞密度较为敏感，培养、传代时请注意保持细胞密度在合适的范围。
- e) 注意营养，不处理时务必隔天适当补加培养基。

### 3. H\_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat Cell Line 细胞冻存

- a) 细胞冻存液：90% FBS+10% DMSO。
- b) 细胞计数后，1000 rpm，3 min 离心收集细胞。
- c) 使用预冷细胞冻存液重悬细胞，细胞密度调整为  $5 \times 10^6$  cells/mL。

- d) 每管 1 mL 分装到细胞冻存管中，冻存体积为 1 mL，冻存密度为  $5 \times 10^6$  cells/mL。拧紧盖子，适当标记后，将细胞冻存管置于梯度降温盒中，在  $-80^{\circ}\text{C}$  下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

Genomeditech

## 六、 使用方法

### 1. 功能验证实验-Anti-H\_HLA-G1

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  cells/孔。本次实验使用 Anti-H\_HLA-G1 hIgG1 Antibody(以下简称为 Anti-H\_HLA-G1; 150 kDa)作为阳性药物。Conc.01 终浓度为 30  $\mu\text{g/mL}$ ，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  $\mu\text{L}$  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-H_HLA-G1	30 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	3.33 $\mu\text{g/mL}$	1.11 $\mu\text{g/mL}$	370.37 $\text{ng/mL}$	123.46 $\text{ng/mL}$	41.15 $\text{ng/mL}$	13.72 $\text{ng/mL}$	4.57 $\text{ng/mL}$	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，将靶细胞 H\_HLA-G1 OKT3 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  $2 \times 10^5$  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\_LILRB2(ILT4) 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。以排枪加 50  $\mu\text{L}$  细胞/孔至孔。周围的孔加 100  $\mu\text{L}$  PBS。盖上板盖
- 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-H_HLA-G1	3.7 mg/mL	/	直接使用储液

- f) 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。B2 孔中加入 81.2  $\mu\text{L}$  的 Assay buffer, B3-B11 加入 55  $\mu\text{L}$  的 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 B2 中加入 1.34  $\mu\text{L}$  Anti-H\_HLA-G1)。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 27.5 $\mu\text{L}$ , 加入次孔										对照孔			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12	
A															
B	1.34 $\mu\text{L}$ Anti-H_HLA-G1	加入	81.2 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$											
C															
D															
E															
F															
G															
H															

- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5  $\mu\text{L}$  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 a 孵育过夜的靶细胞孔板取出, 每孔吸弃 90  $\mu\text{L}$  培养基。加入之前准备好的 Anti-H\_HLA-G1 梯度稀释液, 每孔 50  $\mu\text{L}$ , 孵育 1 小时。
- k) 1 h 后将步骤 j 和步骤 b 的细胞孔板取出, 将步骤 b 的细胞孔板内的细胞, 每孔吸取 50  $\mu\text{L}$  加入到步骤 j 的细胞孔板中 B2-B11。
- l) 将混匀后的孔板盖板上板盖, 于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养 5 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_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat	PBS Control	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4.57 ng/mL
Cell line+Anti-H_HLA-G1	50628	229858	42503

### 3) 验证结果

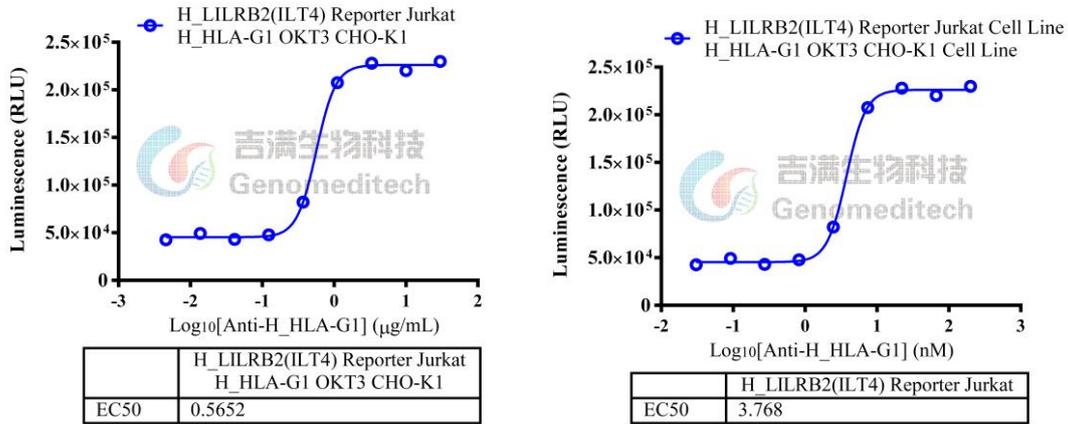


Fig 2.功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 2. 功能验证实验-Anti-H\_LILRB2

实验步骤参考功能验证实验-Anti-H\_HLA-G1，其中不同的是：Anti-H\_LILRB2 需要先和 H\_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat 细胞(抗体和细胞每孔各 50  $\mu$ L)共孵育 1 h 后,将 H\_HLA-G1 OKT3 CHO-K1 细胞取出,吸弃 90  $\mu$ L,然后将 Anti-H\_LILRB2 和 H\_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat 细胞的混合物每孔吸取 100  $\mu$ L 加入到 H\_HLA-G1 OKT3 CHO-K1 细胞孔板中,继续培养 5 h 后检测 Luciferase。

### 1) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat	PBS Control	30 $\mu$ g/mL	4.57 ng/mL
Cell line+Anti-H_LILRB2	24069	268672	28028

### 2) 验证结果

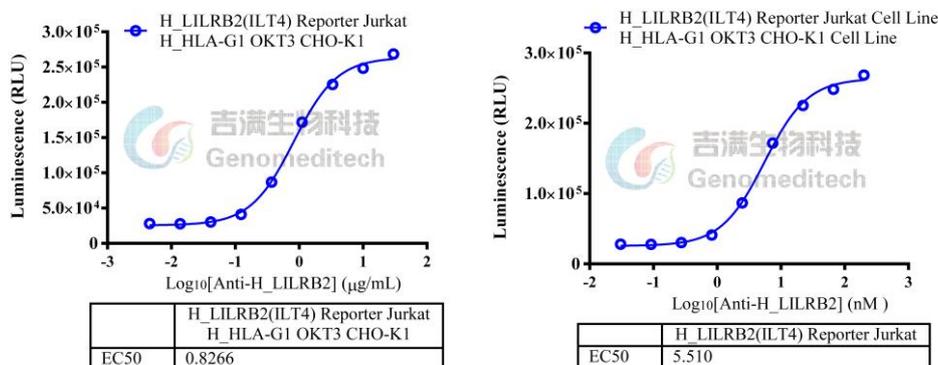


Fig 3.功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 附录：稳定性验证

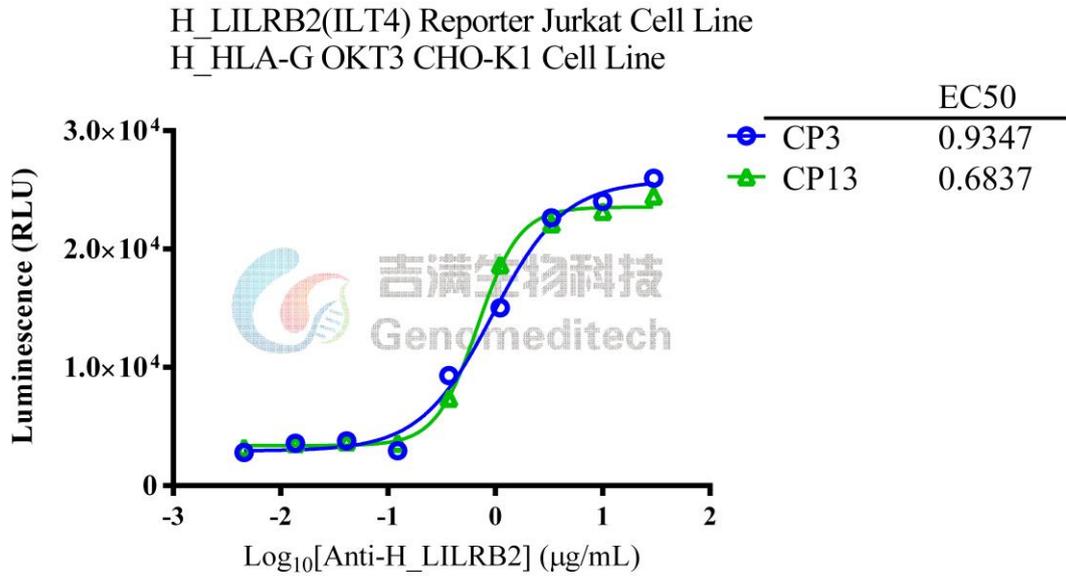


Fig 4. H\_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat Cell Line 稳定性证结果 P3-P13

## 附录：流式验证结果

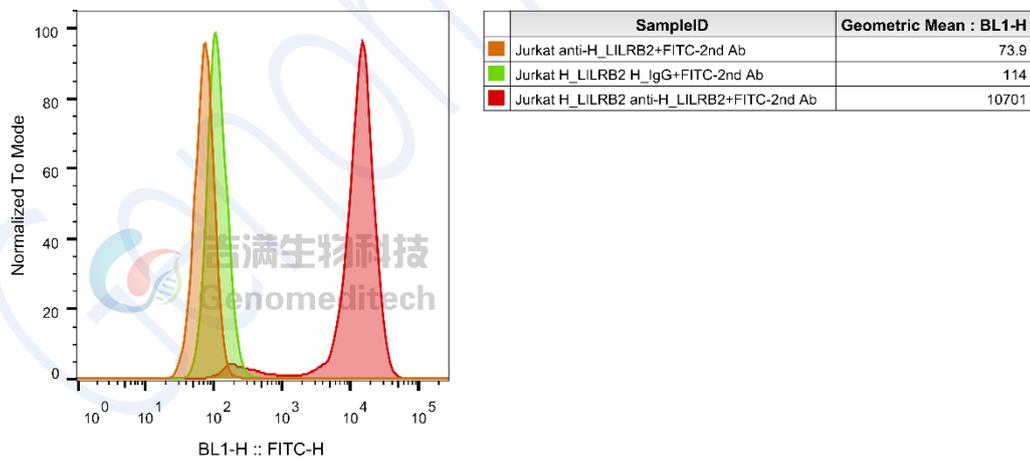


Fig 5. H\_LILRB2(ILT4) Reporter Jurkat Cell Line 使用 Anti-H\_LILRB2(ILT4) hIgG4 Antibody 流式验证结果

## 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