

CLEC2D aAPC Cell

CBP74138

操作说明书



4008-750-250

目录

1. 背景信息	1
2. 产品介绍	1
3. 细胞基本信息	2
4. 主要仪器试剂耗材	2
5. 细胞培养	3
5.1 细胞复苏	3
5.2 细胞传代	3
5.3 细胞冻存	3
6. 细胞实验流程	3
6.1 CD161/CLEC2D Blockade Assay	3
7. 数据展示	5
8. 相关产品	7

1. 背景信息

CLEC2D 是 CD161 的配体，是一种由髓细胞和恶性细胞表达的表面分子，提示一种用于免疫治疗的配体-受体途径。研究发现 CD161 受体能被表达在肿瘤细胞和大脑免疫抑制细胞上的 CLEC2D 的激活，形成 CD161-CLEC2D 信号通路。为了确定阻断该通路是否能恢复 T 细胞攻击胶质瘤细胞的能力，研究人员通过基因敲除 CD161,以及用 CD161 抗体阻断 CD161&CLEC2D 结合两种方式进行验证，验证结果表明阻断该通路可增强 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤，并提高小鼠的存活率，此外实验中还发现阻断该通路之后 PD-1 的表达量也出现了降低，进而减少了 T 细胞耗竭，提示针对该靶点开发药物可能也会是克服部分 PD-1 耐药的一个新的治疗思路。

2. 产品介绍

科佰生物推出 CLEC2D aAPC Cell 细胞模型, CLEC2D aAPC Cell 稳定表达人 CLEC2D。报告基因细胞模型可以很好的反映分子作用机制，同时具备更小的变异性和更好的可操作性，已被中检院及药企广泛应用于抗体药物生物活性的检定，对于药物研发、质量控制、批次放行都有重要意义。

CD161/CLEC2D 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 CD161/CLEC2D 的信号转导过程，原理见图 1 所示。

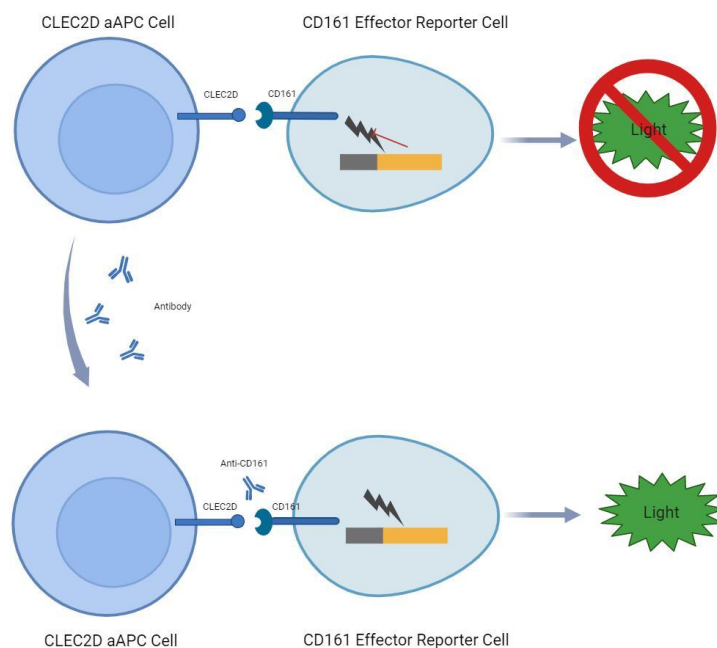


图 1: CD161/CLEC2D 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: CLEC2D

传代培养基: F12K+10%FBS+600ug/ml hygromycin+2ug/ml puromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 贴壁

支原体检测: 阴性

稳定性: 32 代 (室内测试结果, 不表示超过 32 代以上不稳定)

保存条件: 液氮保存

应用: 细胞水平 CD161/CLEC2D 信号传导的激活剂或抑制剂的活性检测, 可用于高通量筛选或 QC 放行

4. 主要仪器试剂耗材

名称	品牌	货号
CLEC2D aAPC Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74138M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
CD161 Effector Reporter Cell 细胞	Cobioer	CBP74137
Anti-CD161 mAb	Cobioer	CBP74137A
Ultra Luciferase Detection Kit	Cobioer	CBPH0001
96 Well Assay Plate (White Plate, Clear Bottom with Lid Tissue Culture Treated Polystyrene 1/Pack)	Costar	3610
Synergy H1 多功能酶标仪	Biotek	/

5. 细胞培养

5.1 细胞复苏

- 1) 在 37°C 水浴中快速融化细胞约 60 秒。一旦细胞解冻（可能比 60 秒稍快或稍慢），快速将冻存管中的细胞吸入装有 10 ml 预热 CLEC2D aAPC Cell 完全培养基的 15ml 离心管中。
- 2) 1000 转、5 分钟离心细胞，除去培养基并将细胞重悬于 5 ml 预热的完全培养基中。
- 3) 加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中。
- 4) 复苏 24-36 小时左右换液或传代，将未贴壁的死细胞去掉。

5.2 细胞传代

- 1) 当细胞密度符合传代要求时，PBS 清洗细胞，加入 1ml 胰酶，消化细胞传代。当 80%以上细胞培养瓶轻轻晃动脱落时，加培养基终止消化，吹打成单细胞，吸入 15ml 离心管，1000 转离心 5 分钟。
- 2) 离心后弃上清，加入新培养基吹打重悬细胞成单细胞，加入新的培养瓶中继续培养。

5.3 细胞冻存

每个 T75 或 10cm 培养皿的细胞消化离心后弃上清。加 2ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入 2 个细胞冻存管。立即放入细胞冻存盒(Nalgene 5100-0001)，加异丙醇到刻度线，放-80°C 冰箱。24 小时后将冻存管转到液氮中长期保存。

6. 细胞实验流程

6.1 CD161/CLEC2D Blockade Assay

CD161/CLEC2D Blockade Assay 由报告细胞 CD161 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74137 细胞和靶细胞 CLEC2D aAPC Cell, Cat. #CBP74138 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-CD161 mAb, Cat.#CBP74137A 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

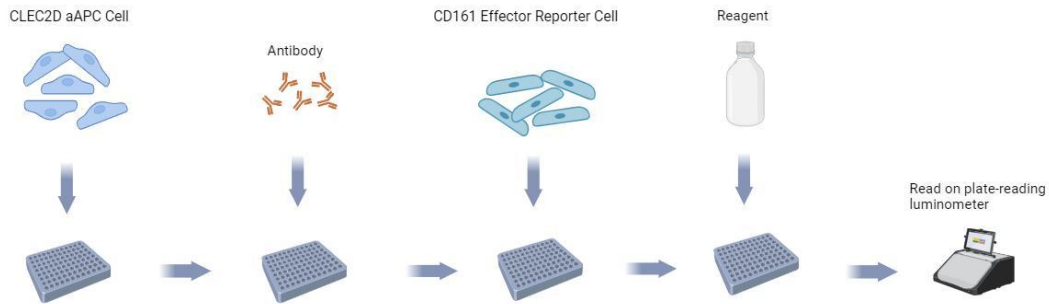


图 2: CD161/CLEC2D Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 CLEC2D aAPC Cell 细胞，胰酶消化重悬于新鲜的含 10%FBS 的 F12K 培养基中，将重悬的细胞密度调整为 4×10^5 cells/ml。
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中，100 ul/孔细胞悬液，37°C 培养箱培养过夜。
- 3) 第二天将接种 CLEC2D aAPC Cell 细胞的 96 孔板内 F12K 培养基吸干，另用 10%血清 RPMI1640 培养基对测试样本进行梯度稀释，加入梯度稀释的 2*浓度样品（50 ul/孔）到接种好细胞的 96 孔板中，样本从最高浓度 2 ug/ml（2*浓度）开始，2 倍稀释 11 个浓度梯度，并另外设置空白培养基对照孔。（注意：样品浓度及梯度设置跟样品本身的特性及客户的实验需求高度相关，客户应根据自身的实际情况优化设置，我们不做具体推荐，本梯度稀释方案仅适用我们本次验证实验涉及样本）
- 4) 取对数期生长的 CD161 Effector Reporter Cell 细胞离心弃上清，重悬于新鲜的 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中将重悬的细胞密度调整为 8×10^5 cells/ml，然后将细胞加入步骤 3 的 96 孔板中，每孔 50 ul，放置 37°C 培养箱中继续培养 5.5 到 6 小时。
- 5) 将 96 孔板从培养箱中取出，加入 100 ul/孔 Ultra Luciferase Detection Kit, Cat.#CBPH0001 放置 3 到 5 分钟，放入酶标仪中读取数值。
- 6) 根据每个梯度浓度孔对应的读值，利用 Prism Graphpad 软件拟合样品对细胞激活的梯度曲线，并且计算样品的 EC50。

孔板排布:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer
B	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
C	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
D	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
E	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
F	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
G	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
H	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer

图 3: 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

Dose Response of CD161 Blocking Antibody in CD161 Effector Reporter Cells (Clone 8) With CLEC2D aAPC Cells

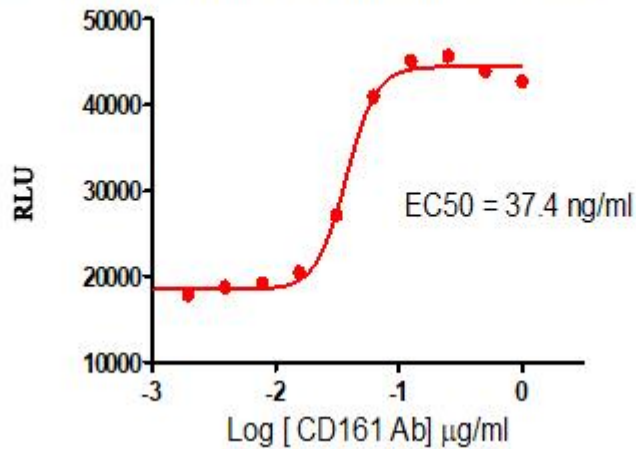


图 4: CD161/CLEC2D Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-CD161 Ab)

8. 相关产品

名称	货号
CD161 Effector Reporter Cell	CBP74137
CLEC2D aAPC Cell	CBP74138