

41BB/NF κ B-Luc/HEK293

CBP74045

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	4
6.1 41BB Stimulation Assay (FcγR Independent)	4
6.2 41BB Stimulation Assay (FcγR Dependent)	5
7. 数据展示	6
8. 相关产品	6

1. 背景信息

4-1BB (CD137) 是 T 细胞表面一种重要的激活型免疫检查点分子。是一种可诱导的细胞表面受体，属于肿瘤坏死因子受体家族分子 (TNFR)。广泛表达于激活后的 T 细胞、NK 细胞等人体免疫细胞的表面。它的配体是 CD137L，也属于 TNFSF 成员，主要表达于激活后的抗原呈递细胞。

2. 产品介绍

科佰生物推出 41BB/NFκB-Luc/HEK293 报告基因细胞，在由 NFκB 调控并表达 Luc 荧光素酶报告基因的 HEK293 重组细胞 NFκB-Luc/HEK293 上，稳定表达人 41BB。见图 1 流式验证 41BB 表达。

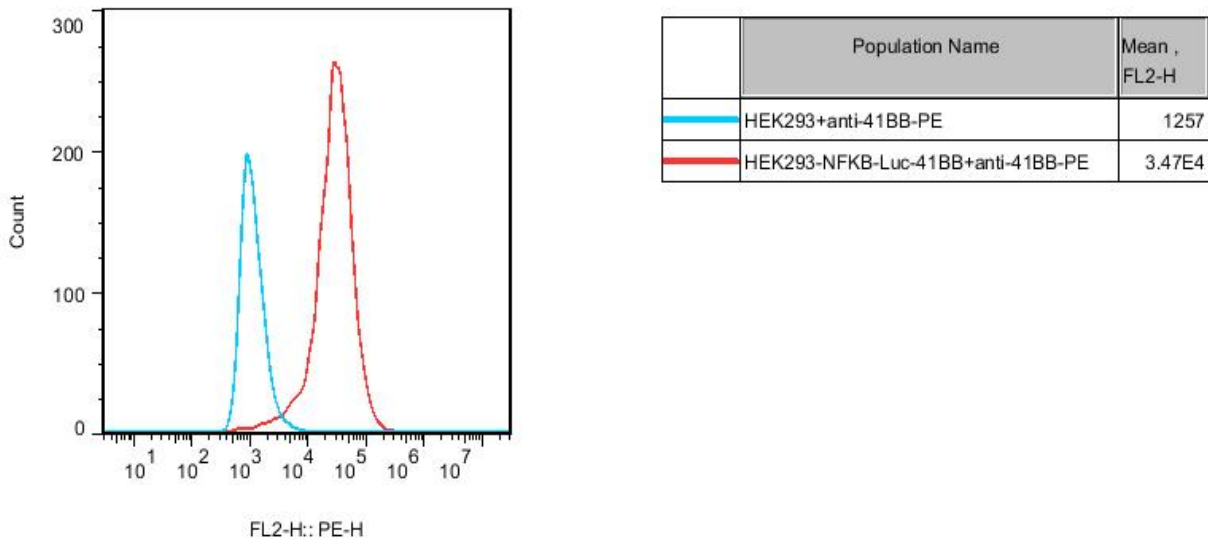


图 1: 41BB/NFκB-Luc/HEK293 细胞表达人 41BB

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。

41BB/NFκB-Luc/HEK293 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 41BB 的信号转导过程，原理见图 2 所示。

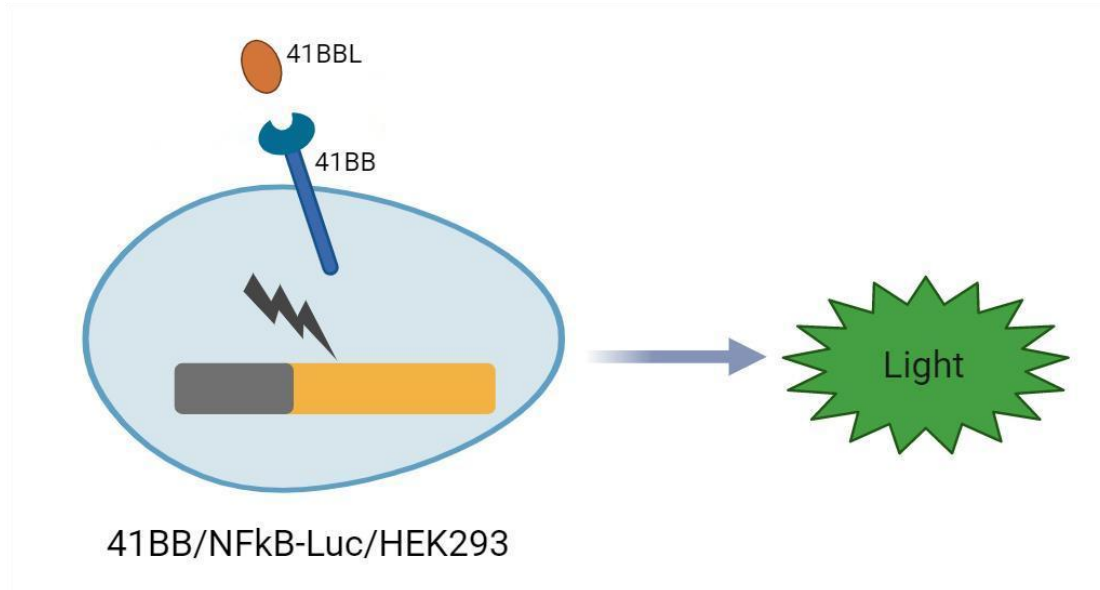


图 2: 41BB/NFκB-Luc/HEK293 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

母细胞: HEK293

表达基因: 41BB,NFκB-Luc

别名: CD137

传代培养基: MEM+10% Foetal Bovine Serum (FBS)+ 1% Non Essential Amino Acids (NEAA) +
1mM Sodium Pyruvate (NaP) +1ug/ml puromycin+100ug/ml hygromycin

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 41BB 信号传导的激活剂的活性检测, 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
41BB/NFκB-Luc/HEK293 完全培养基	Cobioer	CBP74045M

细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
41BBL	/	/
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 41BB/NFκB-Luc/HEK293 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能脱落时，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 41BB Stimulation Assay(FcγR Independent)

41BB Stimulation Assay 由报告细胞 41BB/NFκB-Luc/HEK293, Cat. #CBP74045 开展, 本实验中使用 41BBL 作为测试样本, 对本模型的生物功能进行验证。

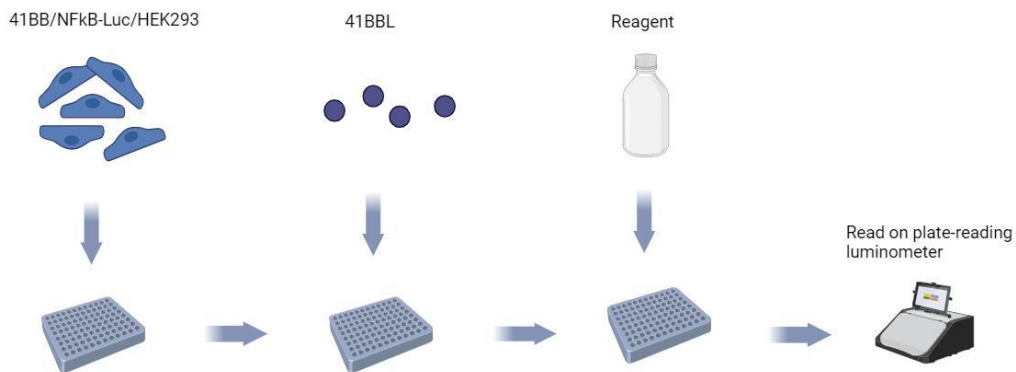


图 3: 41BB Stimulation Assay 流程示意图

- 1) 取对数期生长的 41BB/NFκB-Luc/HEK293 细胞消化离心去上清, 重悬于新鲜 MEM+10%FBS 培养基中, 细胞密度调整为 3×10^5 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, 100ul/孔细胞悬液。
- 3) 第二天, 用 MEM+10%FBS 培养基对样品进行梯度, 加入梯度稀释的 10* 浓度样品 (11.1 ul/孔) 到接种好细胞的 96 孔板中, 样品从最高浓度开始, 3 倍稀释 11 个浓度梯度, 每个浓度设置双复孔或三复孔, 并设置 0 浓度对照, 继续在 37°C 细胞培养箱培养 5.5 到 6 小时。(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) 将 96 孔板从培养箱中取出, 加入 100ul/孔 Ultra Luciferase Detection Kit, Cat.#CBPH0001 放置 3 到 5 分钟, 放入酶标仪中读取数值。
- 5) 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。

6.2 41BB Stimulation Assay (FcγR Dependent)

- 1) 取对数期生长的 41BB/NFκB-Luc/HEK293 细胞消化离心去上清,重悬于新鲜 MEM+10%FBS 培养基中, 细胞密度调整为 6×10^5 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, 50ul/孔细胞悬液。
- 3) 第二天,用 MEM+10%FBS 培养基对样品进行梯度,加入梯度稀释的 10*浓度样品 (10 ul/孔) 到接种好细胞的 96 孔板中, 样品从最高浓度开始, 3 倍稀释 11 个浓度梯度, 每个浓度设置双复孔或三复孔, 并设置 0 浓度对照。(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 FCGR2B/CHO 细胞消化离心去上清,重悬于新鲜 MEM+10%FBS 培养基中, 细胞密度调整为 1×10^6 Cells/ml。
- 5) 将消化好的 FCGR2B/CHO 细胞加入步骤 3) 96 孔板中, 40 ul/孔, 然后将 96 孔板继续放置 37°C 培养箱 5.5 至 6 小时。
- 6) 将 96 孔板从培养箱中取出, 加入 100ul/孔 Ultra Luciferase Detection Kit, Cat.#CBPH0001 放置 3 到 5 分钟, 放入酶标仪中读取数值。
- 7) 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	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
B	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
C	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
D	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
E	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
F	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
G	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
H	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照

图 4: 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

Dose Response of 4-1BB / NF-κB Reporter – HEK293 cell line (Clone C4) to 4-1BBL

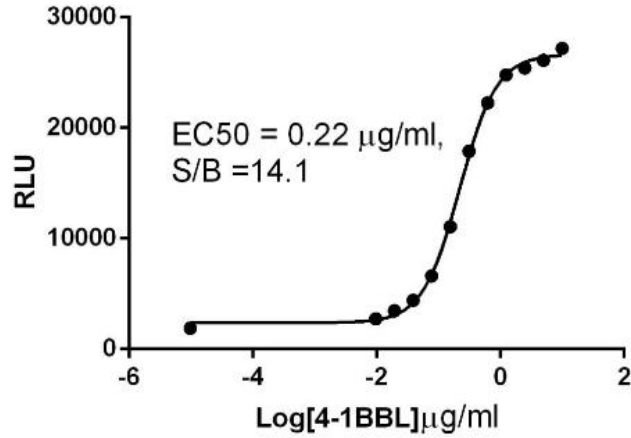


图 5: 41BB Stimulation Assay 验证结果

8. 相关产品

名称	货号
PD1/41BB Dual Effector Reporter Cell	CBP74172
41BB/NFκB-Luc/Jurkat	CBP74062
41BB/NFκB-Luc/HEK293	CBP74045
41BB/HEK293	CBP74040
41BB/CHO	CBP74093