

CD200R Effector Reporter Cell

CBP74179

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	3
4. 主要仪器试剂耗材	4
5. 细胞培养	4
5.1 细胞复苏	4
5.2 细胞传代	4
5.3 细胞冻存	4
6. 细胞实验流程	5
6.1 CD200/CD200R Blockade Assay	5
7. 数据展示	6
8. 相关产品	7

1. 背景信息

CD200（也称为 OX-2）是 Ig 超家族（IgSF）中的一员，该家族蛋白与 B7 家族蛋白结构相似，它包含两个胞外免疫球蛋白结构域和一个小的 19 个氨基酸的胞内结构域，没有已知的信号基序。CD200 在多种正常组织中表达，其中包括 B 淋巴细胞和活化的 T 淋巴细胞等免疫细胞。近年来的研究表明，CD200 也在多种人类癌症细胞中存在过度表达，其中包括人类黑色素瘤、卵巢癌、脑胶质瘤、髓系白血病、以及一些 B 细胞恶性肿瘤和大多数内分泌恶性肿瘤（如小细胞肺癌等）。而 CD200R 作为 CD200 的同源配体，也是一种 IgSF 蛋白，在小鼠和人类中，CD200R 的表达模式相似，均在巨噬细胞、中性粒细胞和肥大细胞中高表达。与大多数 IgSF 受体不同，CD200R 缺乏 ITIM 结构域，然而，它的 67 个氨基酸组成的细胞质尾部含有三个酪氨酸残基，第三个酪氨酸残留位于 NPXY 基序内，该基序在 CD200R 结合配体后会被磷酸化，这导致其并不直接招募 SHP1, SHP2 等蛋白质酪氨酸磷酸酶或磷酸化后的肌醇磷酸酶（SHIP），而是招募酪氨酸激酶下游衔接蛋白 Dok-2 和 1，然后再与 RasGAP 和 SHIP 结合。在巨噬细胞和肥大细胞中，这种级联反应已被证明可以抑制 ERK、P38 和 JNK 的磷酸化，并抑制髓细胞的活化。尽管 CD200R 表达主要在巨噬细胞和中性粒细胞中发现，但进一步的研究表明，树突状细胞（DC）和一些 T 细胞亚群中也存在 CD200R 的表达，这提示 CD200R 信号在这些细胞类型中可能也具有调节功能。

2. 产品介绍

科佰生物推出 CD200R Effector Reporter Cell 报告基因细胞，在由因子调控并表达报告基因的重组细胞上，稳定表达人 CD200R。见图 1 流式验证 CD200R 表达。

	Population Name	Mean , FL4-A
	CD200R Effector Reporter Cell+anti-CD200R	5.17E5
	Control cell+anti-CD200R	671

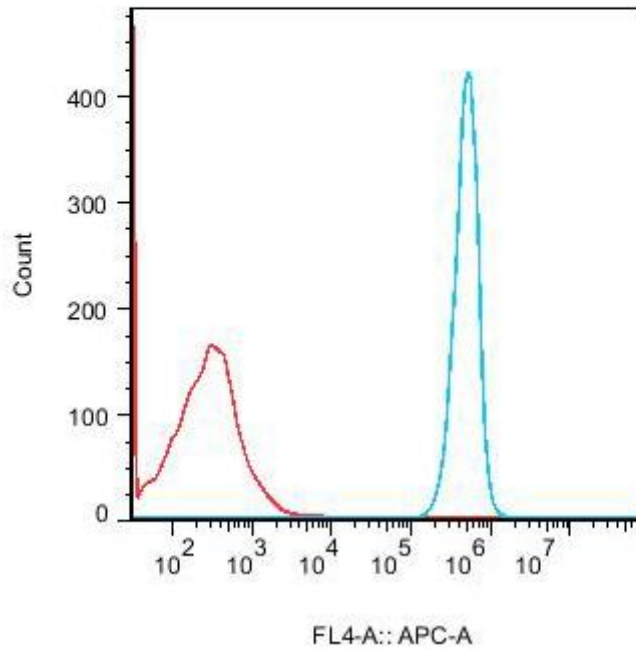


图 1: CD200R Effector Reporter Cell 细胞稳定表达人 CD200R

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。

CD200/CD200R 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 CD200/CD200R 的信号转导过程,原理见图 2 所示。

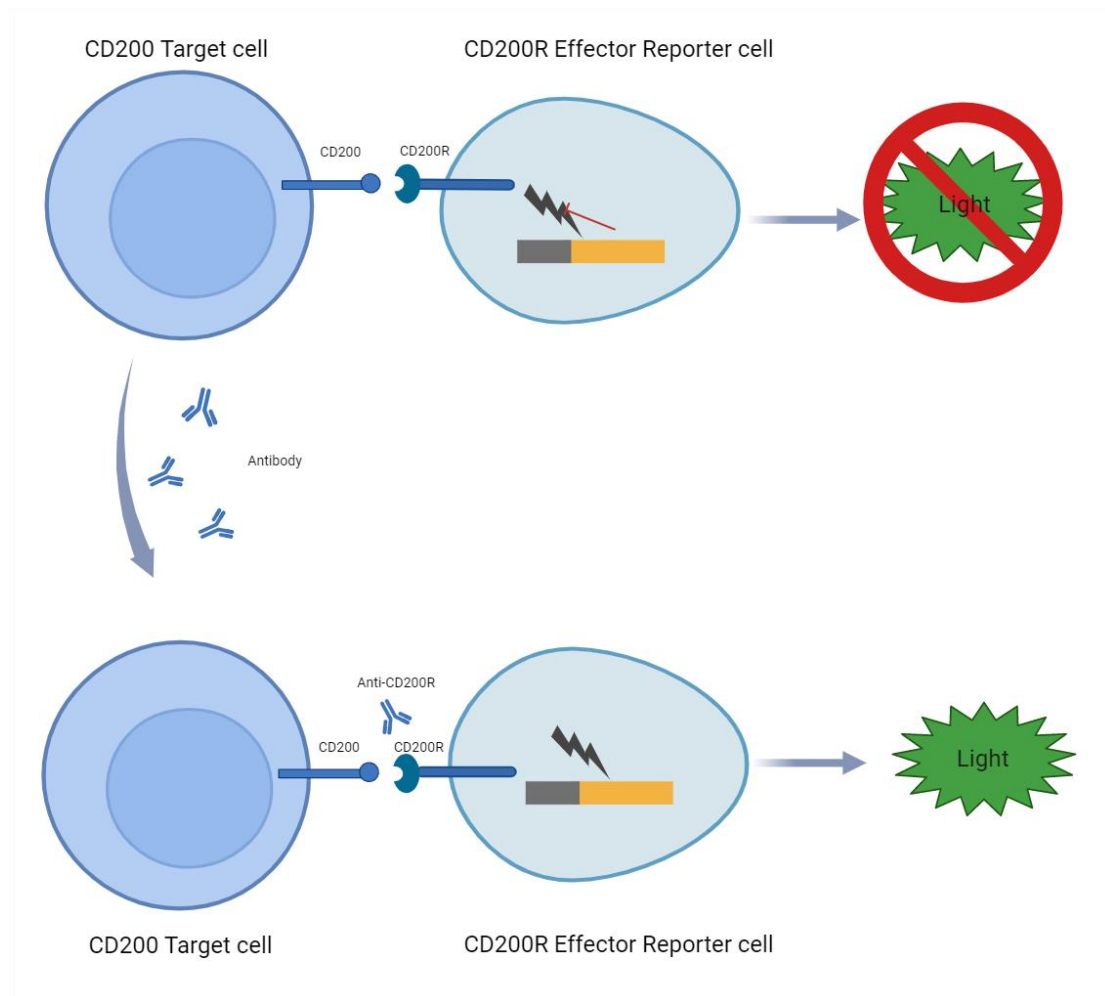


图 2: CD200/CD200R 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: CD200R

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+1ug/ml puromycin+10ug/ml blastcidin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 悬浮

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 CD200R 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
CD200R Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74179M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
CD200 Target Cell 细胞	Cobioer	CBP74180
Anti-CD200R mAb	Cobioer	CBP74179A
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 CD200R Effector Reporter Cell 完全培养基的 15 ml 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) 调整细胞密度到 $3-6 \times 10^5$ cells/ml，加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中。

5.2 细胞传代

每 1-2 天取细胞悬液计数，当密度大于 1×10^6 cells/ml 时,请及时传代或补加新鲜完全培养基. 保持细胞密度在 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cells/ml 之间。

5.3 细胞冻存

取 $4-8 \times 10^6$ 细胞离心后弃上清。加 1ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入细胞冻存管。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 CD200/CD200R Blockade Assay

CD200/CD200R Blockade Assay 由报告细胞 CD200R Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74179 细胞和靶细胞 CD200 Target Cell, Cat. #CBP74180 细胞配对开展, 本实验中使用 Anti-CD200R mAb, Cat.#CBP74179A 作为测试样本, 对本模型的生物功能进行验证。

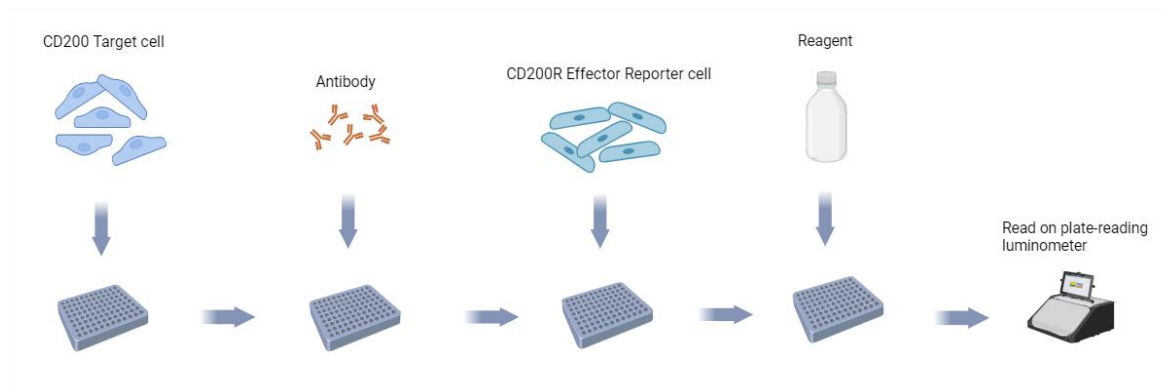


图 3: CD200/CD200R Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 CD200 Target Cell 细胞, 胰酶消化用 DPBS 洗涤一次, 离心弃去 DPBS, 然后重悬于新鲜的含 2%FBS 的 Opti-MEM 培养基中, 将重悬的细胞密度调整为 8×10^5 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) 第二天用含 2%FBS 的 Opti-MEM 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 (25 ul/孔) 到接种好细胞的 96 孔板中, 样本从最高浓度 120 ug/ml (4*浓度) 开始, 3 倍稀释 10 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 CD200R Effector Reporter Cell 细胞, 用 DPBS 洗涤一次, 离心弃去 DPBS, 重悬于新鲜的含 2%FBS 的 Opti-MEM 培养基中将重悬的细胞密度调整为 1.6×10^6 cells/ml, 然后将细胞加入步骤 3 的 96 孔板中, 每孔 25 ul, 放置 37°C 培养箱中继续培养 2 小时。
- 5) 将 Nano-Glo® Live Cell Assay System 中的 Nano-Glo® Live Cell Substrate 用 Nano-Glo® LCS

Dilution Buffer 稀释 20 倍，配制成 5*检测液。

- 6) 将步骤 4)的 96 孔板从培养箱中取出，加入 25ul/孔 步骤 5)中配制的 5*检测液，然后剧烈震荡 15 到 30 秒，然后放置 10 到 20 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	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 4: 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

Dose Response of CD200R Blocking Ab in CD200R Effector Reporter Cells (C34) With CD200 Target Cells (C18)

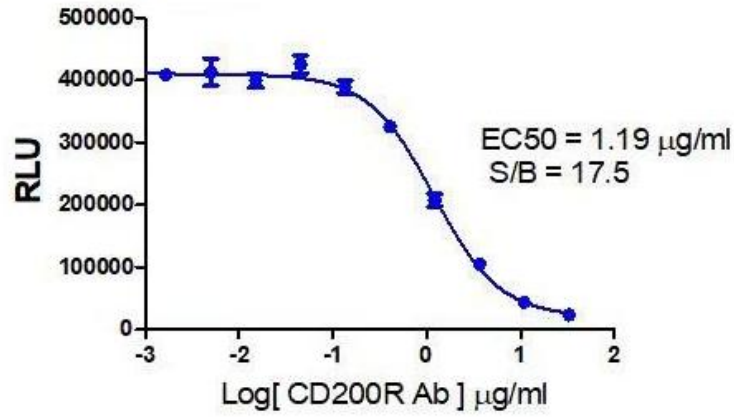


图 5: CD200/CD200R Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-CD200R Ab)

8. 相关产品

名称	货号
CD200R Effector Reporter Cell	CBP74179
CD200 Target Cell	CBP74180