

CD27/NFκB-Luc/Jurkat

CBP74007

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 CD27/CD70 Agonist Assay | 3 |
| 6.2 CD27/CD70 Blocking Assay | 5 |
| 7. 数据展示 | 6 |
| 8. 相关产品 | 6 |

1. 背景信息

CD27 是肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 受体超家族的成员之一。CD27 在不同类型的 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞亚群中表达。它通过与肿瘤细胞表达的肿瘤坏死因子样配体 CD70 相互作用激活 NF- κ B 和 MAPK/JNK 信号。衔接蛋白 TRAF2 和 TRAF5 也能刺激 CD27 信号传导。CD27 的激活可导致淋巴增殖、分化、凋亡和长期记忆的诱导。CD27/CD70 通路是癌症和炎症性疾病治疗发展的关键靶点之一。

2. 产品介绍

科佰生物推出 CD27/NF κ B-Luc/Jurkat 报告基因细胞，在由调控因子并表达报告基因的重组细胞上，稳定表达人 CD27。见图 1 流式验证 CD27 表达。

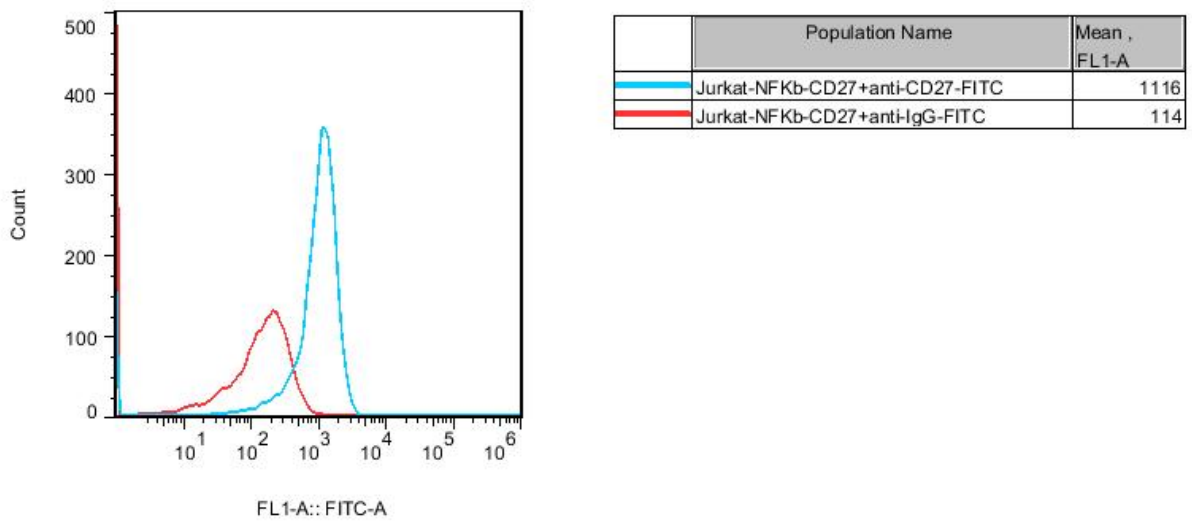


图 1: CD27/NF κ B-Luc/Jurkat 细胞稳定表达人 CD27

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。

CD27/CD70 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 CD27/CD70 的信号转导过程，原理见图 2 所示。

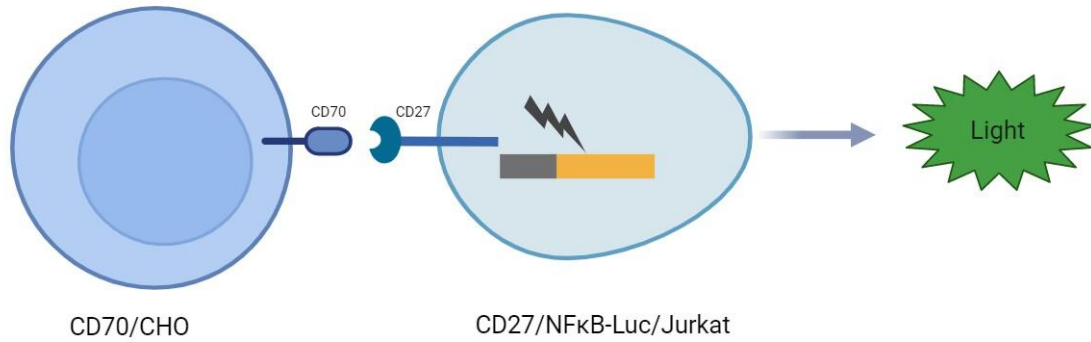


图 2: CD27/CD70 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: CD27

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+800ug/ml hygromycin+1ug/ml puromycin

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 CD27 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 |
|--|---------|-----------|
| CD27/NFκB-Luc/Jurkat 完全培养基 | Cobioer | CBP74007M |
| 细胞冻存液 | Cobioer | CBP50089 |
| CD70/CHO 细胞 | Cobioer | CBP74008 |
| 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 CD27/NFκB-Luc/Jurkat 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 CD27/CD70 Agonist Assay

CD27/CD70 Agonist Assay 由报告细胞 CD27/NFκB-Luc/Jurkat, Cat. #CBP74007 细胞和靶细胞 CD70/CHO, Cat. #CBP74008 细胞配对开展对本模型的生物功能进行验证。

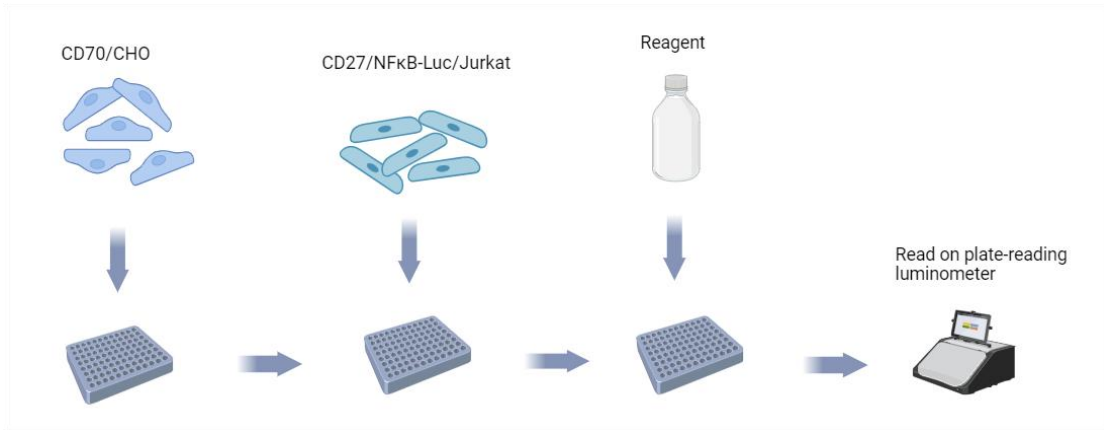


图 3: CD27/CD70 Agonist Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 CD70/CHO 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为不同密度梯度。
- 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 CD70/CHO 细胞的 96 孔板内 F12K 培养基吸干，取对数期生长的 CD27/NFκB-Luc/Jurkat 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 4×10^5 cells/ml，然后将细胞加入步骤 2) 的 96 孔板中，每孔 100 ul，放置 37°C 培养箱中继续培养 5.5 到 6 小时。
- 4) 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。
- 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，并且计算细胞刺激的 EC50。

6.2 CD27/CD70 Blocking Assay

- 1) 取对数生长的 CD70/CHO 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 1×10^5 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 CD70/CHO 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*浓度）开始，梯度稀释 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，对于 CD70 阻断抗体，加入样品后放置 37 度培养箱 1 小时，对于 CD27 阻断抗体，加入样品后直接进行下一步）

- 4) 取对数期生长的 CD27/NFκB-Luc/Jurkat 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，并且计算细胞刺激的 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

CD27/Jukart NFkB-Luc (Clone 2) report assay stimulated by CD70/CHO cells

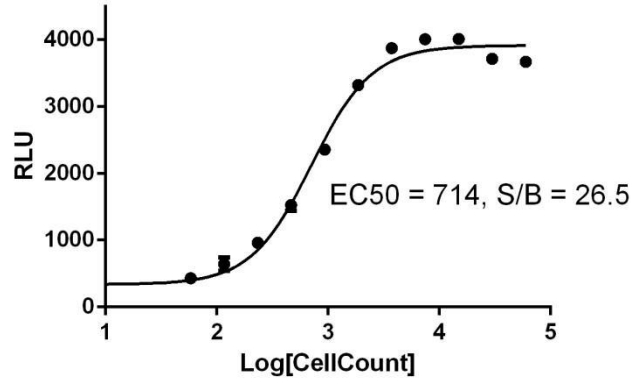


图 5: CD27/CD70 Agonist Assay 验证结果

8. 相关产品

| 名称 | 货号 |
|----------------------|----------|
| CD27/NFkB-Luc/Jurkat | CBP74007 |
| CD70/CHO | CBP74008 |
| CD27/HEK293 | CBP74039 |
| CD27/CHO | CBP74033 |