

# CD40/NF $\kappa$ B-Luc/HEK293

## CBP74009

# 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 .....	3
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 .....	4
6. 细胞实验流程 .....	4
6.1 CD40 Stimulation Assay(FcγR Independent) .....	4
6.2 CD40 Stimulation Assay(FcγR Dependent) .....	5
7. 数据展示 .....	6
8. 相关产品 .....	6

## 1. 背景信息

CD40 是肿瘤坏死因子受体超家族成员之一，最初在 B 淋巴细胞上发现。另外，抗原递呈细胞（APC）如单核细胞、嗜碱性粒细胞、树突状细胞和非免疫细胞如内皮细胞和上皮细胞已被发现表达 CD40。多种癌细胞也过度表达 CD40。CD4+T 辅助淋巴细胞与 CD40 配体（CD40L, CD154）的相互作用触发细胞间粘附分子（ICAM）和其他促炎细胞因子的表达。CD40:CD40L 信号转导同时增加抗原特异性 T 细胞的活化。激动性 CD40 单克隆抗体已被证明可以激活抗原呈递细胞（APC）和促进抗肿瘤 T 细胞反应，在没有 T 细胞免疫的情况下有可能控制癌症。

## 2. 产品介绍

科佰生物推出 CD40/NFkB-Luc/HEK293 报告基因细胞，在由 NFkB 调控并表达 Luc 荧光素酶报告基因的 HEK293 重组细胞 NFkB-Luc/HEK293 上，稳定表达人 CD40。见图 1 流式验证 CD40 表达。

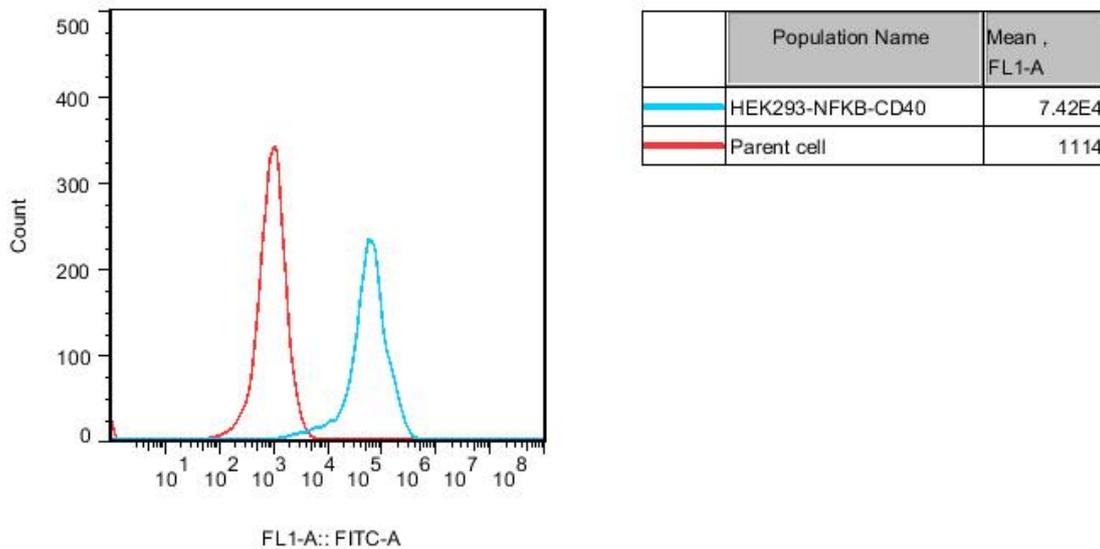


图 1: CD40/NFkB-Luc/HEK293 细胞表达人 CD40

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。

CD40/NFκB-Luc/HEK293 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 CD40 的信号转导过程, 原理见图 2 所示。

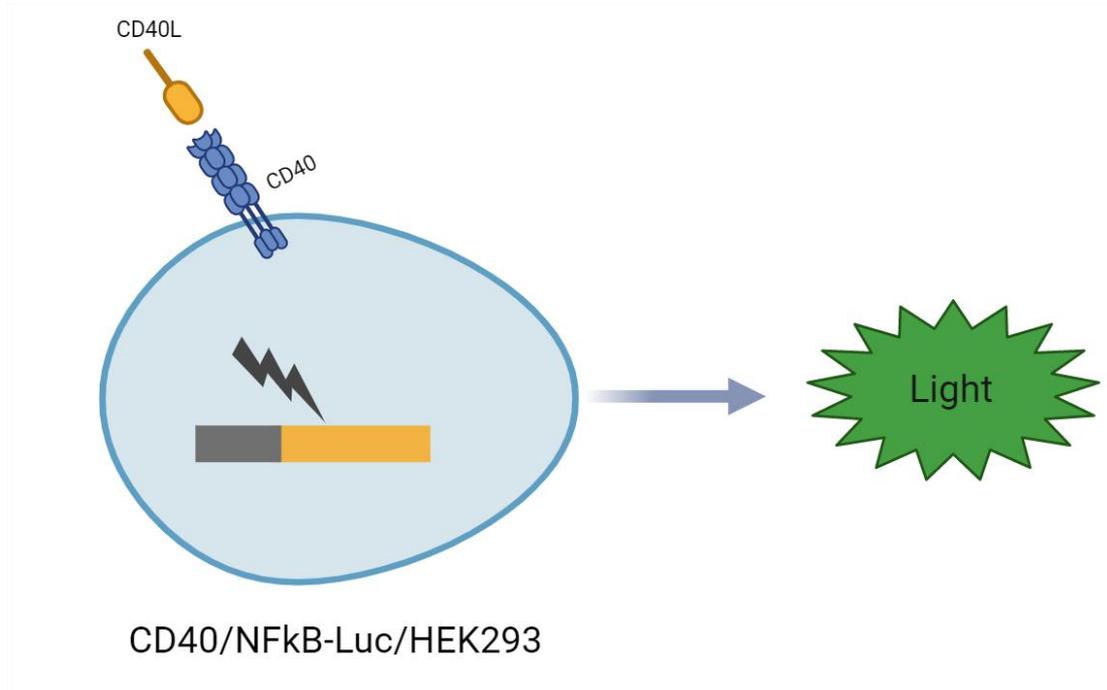


图 2: CD40/NFκB-Luc/HEK293 细胞模型原理图

### 3. 细胞基本信息

母细胞: HEK293

表达基因: CD40,NFκB-Luc

别名: TNFRSF5

传代培养基: MEM + 10% 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 CD40 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
CD40/NFκB-Luc/HEK293 完全培养基	Cobioer	CBP74009M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
CD40L	/	/
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 CD40/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% CO<sub>2</sub> 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 CD40 Stimulation Assay(FcγR Independent)

CD40 Stimulation Assay 由报告细胞 CD40/NFκB-Luc/HEK293, Cat. #CBP74009 开展, 本实验中使用 CD40L 作为测试样本, 对本模型的生物功能进行验证。

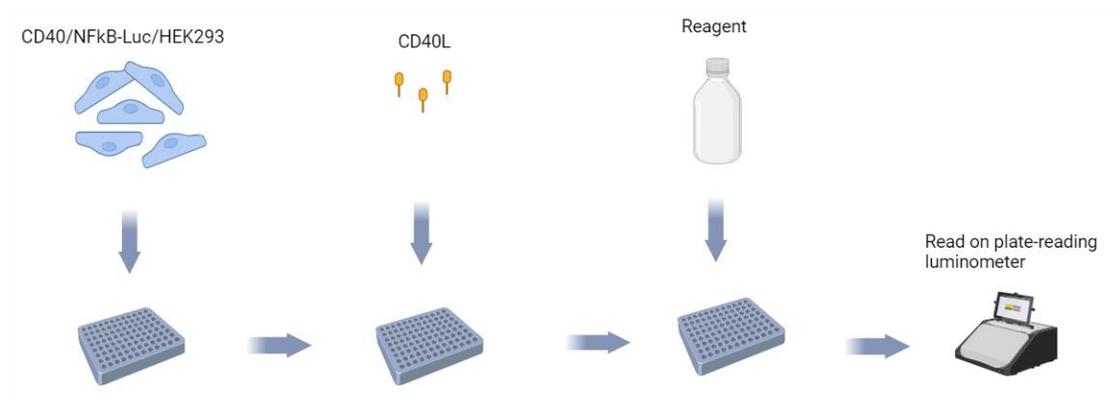


图 3: CD40 Stimulation Assay 流程示意图

- 1) 取对数期生长的 CD40/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  $3 \times 10^5$  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 CD40 Stimulation Assay (FcγR Dependent)**

- 1) 取对数期生长的 CD40/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  $6 \times 10^5$  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  $1 \times 10^6$  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 度培养箱 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

### CD40/NF- $\kappa$ B Reporter - HEK293 Recombinant Cell Line (C4)

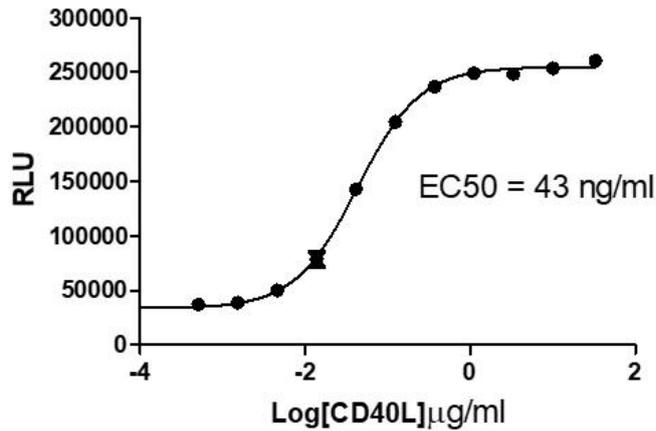


图 5: CD40 Stimulation Assay 验证结果

## 8. 相关产品

名称	货号
CD40/NF $\kappa$ B-Luc/HEK293	CBP74009

CD40/HEK293	CBP74041
CD40/CHO	CBP74034