

# CD47+ Target Cell

## CBP74124

### 操作说明书



4008-750-250

## 目录

1. 背景信息 .....	2
2. 产品介绍 .....	2
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 .....	5
6. 细胞实验流程 .....	5
6.1 SIRP $\alpha$ /CD47 Blockade Assay .....	5
7. 数据展示 .....	7
8. 相关产品 .....	7

## 1. 背景信息

SIRP $\alpha$ 属于 SIRP 家族，是一个抑制性的免疫受体，它通常选择性的表达在髓系细胞（巨噬细胞，粒细胞和树突细胞等）以及神经细胞的膜表面，在其它体细胞上则较少有表达。作为一种跨膜蛋白，其胞外区存在三种免疫球蛋白结构域，其中 N 端氨基酸末端结构可与 CD47 结合介导细胞信号转导。

CD47 也称为抗原表面决定蛋白 OA3、整合素相关蛋白（IAP）和蛋白 MER6,为 5 次跨膜蛋白，属于免疫球蛋白超家族，其 N 端胞外区包含 1 个 Ig 样 V 型（免疫球蛋白样）结构域。CD47 广泛分布于各种组织中，通过与信号调节蛋白 $\alpha$  (Signal regulatory  $\alpha$ , SIRP $\alpha$ ), 血小板反应蛋白（thrombospondin-1, TSP1）以及整合素（Integrins）相互作用，影响细胞凋亡，增殖，免疫等一系列生理功能。

## 2. 产品介绍

科佰生物推出 CD47+ Target Cell 细胞模型, CD47+ Target Cell 稳定表达人 CD47。见图 1 流式验证 CD47 表达。

图 1: CD47+ Target Cell 细胞稳定表达人 CD47

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。

SIRP $\alpha$ /CD47 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 SIRP $\alpha$ /CD47 的信号转导过程，原理见图 2 所示。

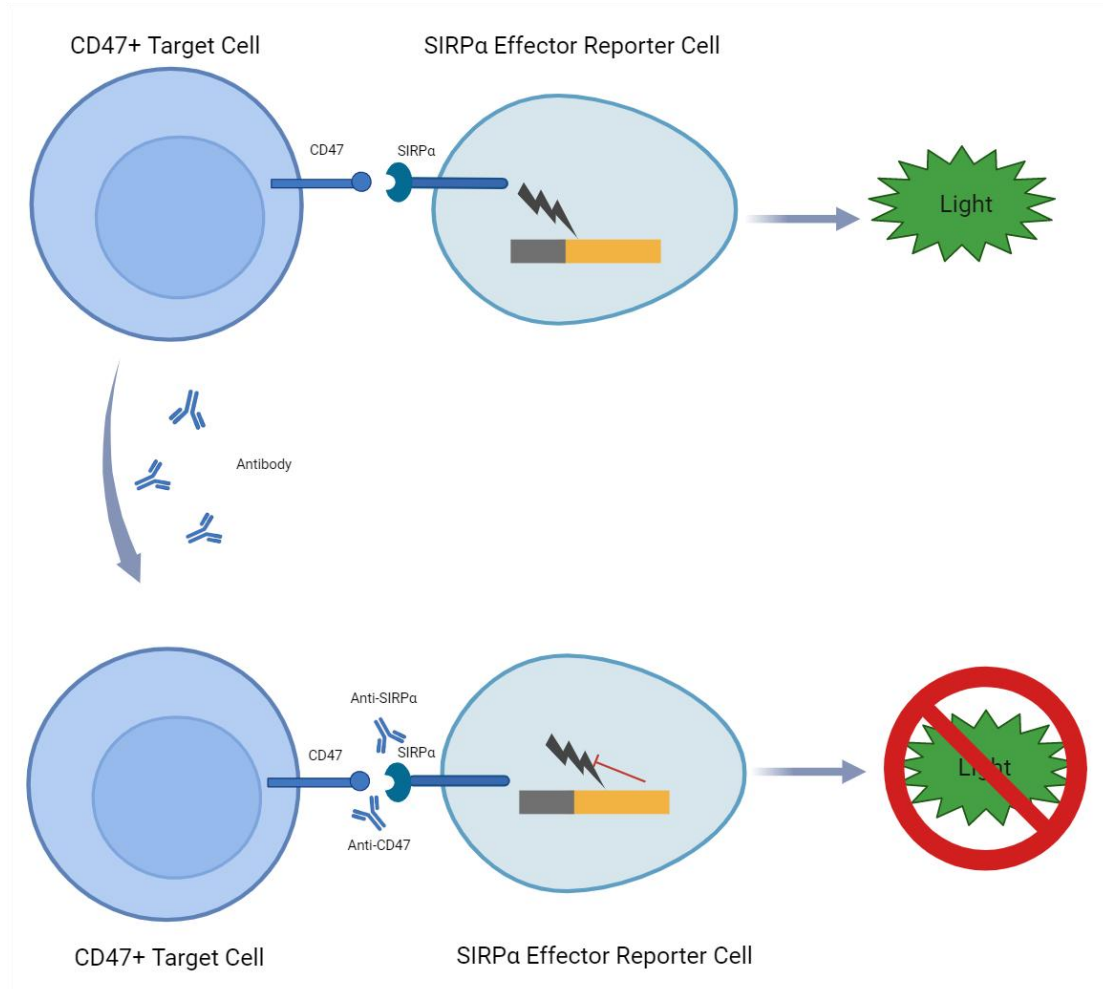


图 2: SIRP $\alpha$ /CD47 细胞模型原理图

### 3. 细胞基本信息

表达基因: CD47

传代培养基: F12K+10%FBS+5ug/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 SIRP $\alpha$ /CD47 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
CD47+ Target Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74124M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
SIRP $\alpha$ Effector Reporter Cell	Cobioer	CBP74122
Anti-SIRP $\alpha$ mAb	Cobioer	CBP74137A
Anti-CD47 mAb	Cobioer	CBP74124A
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 CD47+ Target 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% 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 SIRPα/CD47 Blockade Assay

SIRPα/CD47 Blockade Assay 由报告细胞 SIRPα Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74122 细胞和靶细胞 CD47+ Target Cell, Cat. #CBP74124 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-SIRPα mAb, Cat.#CBP74122A 和 Anti-CD47 mAb, Cat.#CBP74124A 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

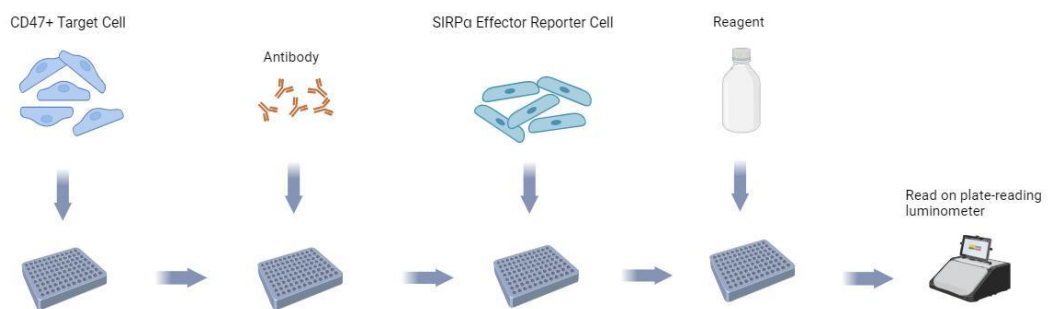


图 3: SIRPα/CD47 Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 CD47+ Target 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  $4 \times 10^5$  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，100 ul/孔细胞悬液，37°C 培养

箱培养过夜.

- 3) 第二天将接种 CD47+ Target 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 100 ug/ml (2\*浓度) 开始, 5 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 SIRPα 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  $4 \times 10^5$  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 4: 96 孔板排布建议案例展示

## 7. 数据展示

Dose response of SIRP $\alpha$  Blocking Antibodies in SIRP $\alpha$  Effector Reporter Cells (C11) With CD47<sup>+</sup> Target Cells

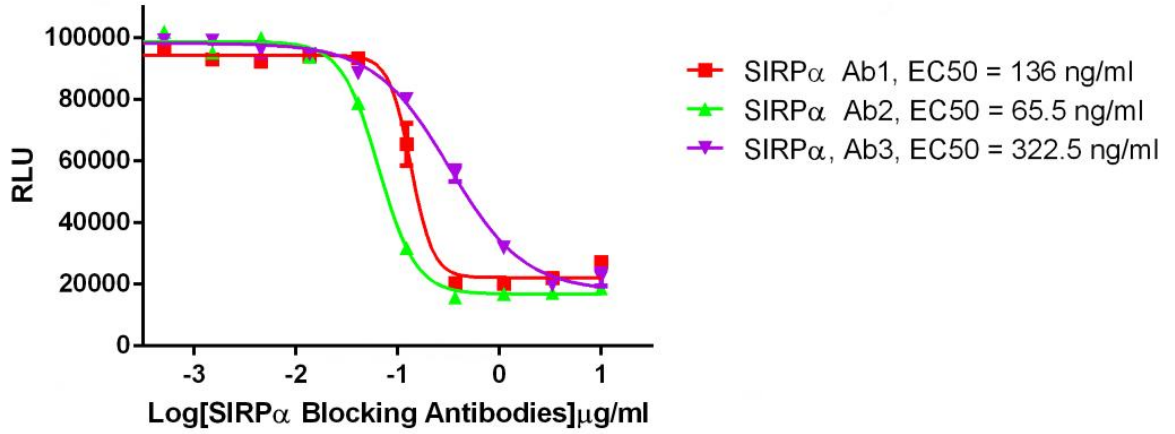


图 5: SIRP $\alpha$ /CD47 Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-SIRP $\alpha$  Ab)

Dose response of CD47 Blocking Antibody in SIRP $\alpha$  Effector Reporter Cells (C11) With CD47<sup>+</sup> Target Cells

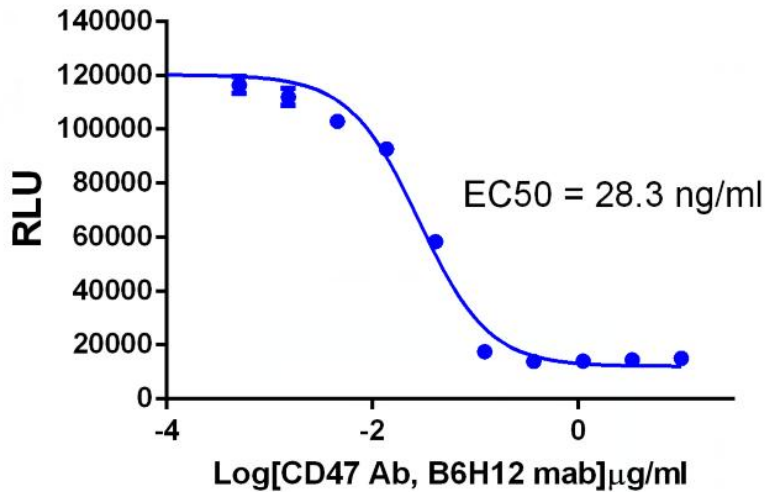


图 6: SIRP $\alpha$ /CD47 Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-CD47 Ab)



## 8. 相关产品

名称	货号
SIRP $\alpha$ /CD47 Dual Effector Reporter Cell	CBP74123
SIRP $\alpha$ Effector Reporter Cell	CBP74122
CD47+ Target Cell	CBP74124
SIRP $\alpha$ /PD-1 Dual Effector Reporter Cell	CBP74154
CD47/PD-L1 Dual Target Cell	CBP74155