

# CSF1R/SRE-Luc/HEK293

## CBP74010

# 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 CSF1R Stimulation Assay .....	4
6.2 CSF1R Inhibition Assay .....	5
7. 数据展示 .....	6
8. 相关产品 .....	7

## 1. 背景信息

CSF-1R 信号通路集落刺激因子-1 (CSF-1)，也称巨噬细胞集落刺激因子，是导致各种炎症性疾病的最常见的促炎细胞因子之一。其在骨关节炎、癌症和其他自身免疫性疾病的发展和进展中具有显著的作用。CSF-1 通过与称为集落刺激因子 1 受体 (CSF-1R) 的受体结合发挥作用，也称为 c-FMS，导致信号通路级联，导致细胞增殖和分化。虽然 CSF-1R 似乎是 CSF-1 的唯一受体，但 IL-34 还结合受体蛋白-酪氨酸磷酸酶-ζ (RPTP-ζ) 且配体的表达模式也不同。

## 2. 产品介绍

科佰生物推出 CSF1R/SRE-Luc/HEK293 报告基因细胞，在由 SRE 调控并表达 Luc 荧光素酶报告基因的 HEK293 重组细胞 SRE-Luc/HEK293 上，稳定表达人 CSF1R。见图 1 流式验证 CSF1R 表达。

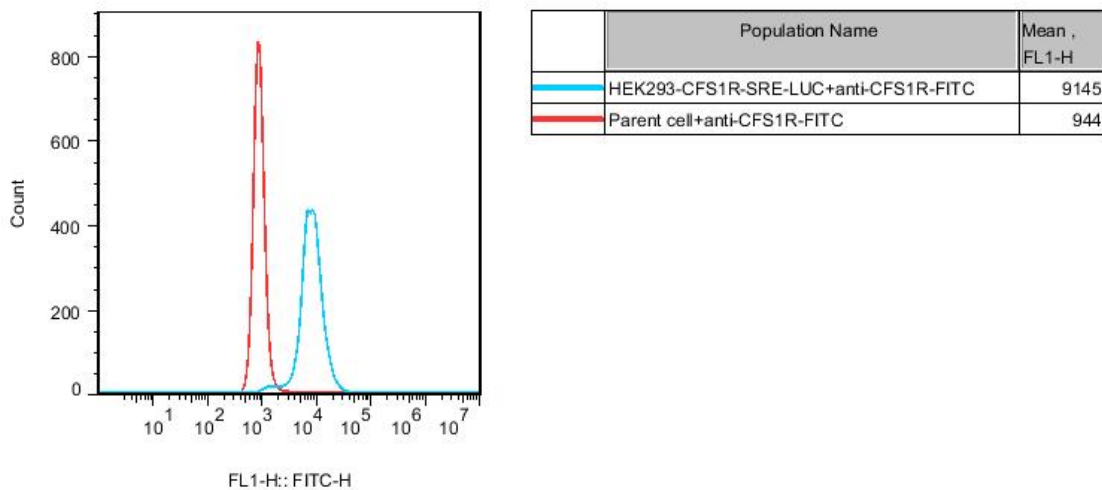


图 1: CSF1R/SRE-Luc/HEK293 细胞表达人 CSF1R

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。

CSF1R/SRE-Luc/HEK293 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 CSF1R 的信号转导过程，原理见图 2 所示。

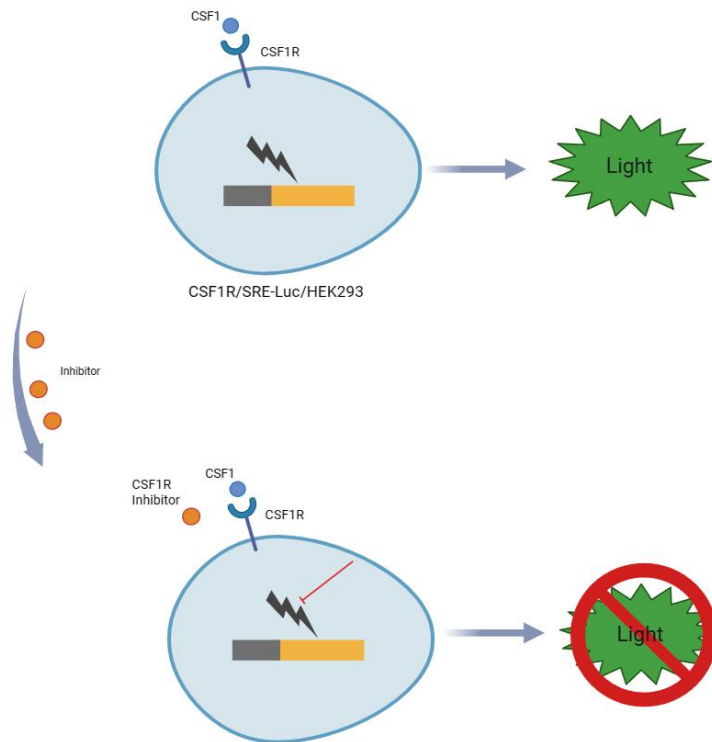


图 2: CSF1R/SRE-Luc/HEK293 细胞模型原理图

### 3. 细胞基本信息

母细胞: HEK293

表达基因: CSF1R,SRE-Luc

别名: CD115

传代培养基: DMEM +10%FBS+200ug/ml hygromycin+1ug/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 CSF1R 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
CSF1R/SRE-Luc/HEK293 完全培养基	Cobioer	CBP74010M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
CSF1	/	/
AC710	/	/
BLZ945	/	/
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 CSF1R/SRE-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

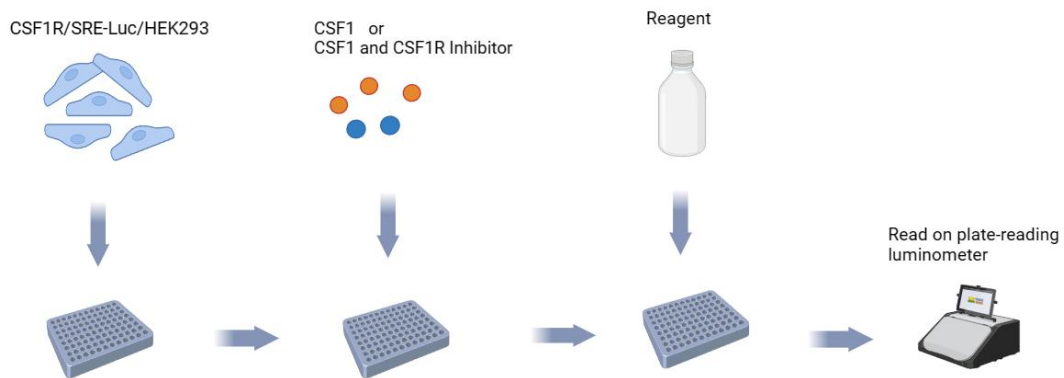


图 3: CSF1R Bioassay 流程示意图

### 6.1 CSF1R Stimulation Assay

CSF1R Stimulation Assay 由报告细胞 CSF1R/SRE-Luc/HEK293, Cat. #CBP74010 开展, 本实验中使用 CSF1 作为测试样本, 对本模型的生物功能进行验证。

- 1) 取对数期生长的 CSF1R/SRE-Luc/HEK293 细胞消化离心去上清, 重悬于新鲜 DMEM+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 DMEM+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 CSF1R Inhibition Assay

CSF1R Stimulation Assay 由报告细胞 CSF1R/SRE-Luc/HEK293, Cat. #CBP74010 开展, 本实验中使用 CSF1 和 CSF1R 抑制剂 AC710、BLZ945 作为测试样本, 对本模型的生物功能进行验证。

- 1) 取对数期生长的 CSF1R/SRE-Luc/HEK293 细胞消化离心去上清, 重悬于新鲜 DMEM+10%FBS 培养基中, 细胞密度调整为  $3.75 \times 10^5$  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, 80ul/孔细胞悬液。
- 3) 第二天, 用 DMEM+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 10 个浓度梯度, 每个浓度设置双复孔或三复孔 (可根据实验需求设定样品浓度, 稀释倍数, 浓度梯度, 复孔数等), 并设置 0 浓度对照 (96 孔板 1 到 10 列为梯度稀释的抗体样品孔, 11, 12 列为抗体 0 浓度只加相同体积培养基的对照孔)。
- 4) 用 DMEM+10%FBS 培养基配制 10\*浓度的配体 (配体在板内的终浓度可根据实验需要进行配制, 我们通常建议的配体浓度范围为配体的 EC80 到 EC90 之间), 加入步骤 e 的 96 孔板中 (10 ul/孔, 只加 1 到 11 列, 12 列加入等体积的培养基做为不加配体刺激的阴性对照孔), 然后将 96 孔板放入细胞培养箱继续培养 5.5 至 6 小时 (备注: 对于 CSF1 的阻断抗体, 建议加入抗体后马上加入配体刺激; 对于 CSF1R 受体的阻断抗体或小分子抑制剂, 建议加入样品后, 让样品与细胞孵育 1 小时后, 再加入配体刺激)。
- 5) 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。
- 6) 根据每个梯度浓度孔对应的读值, 计算对应每个孔样品的抑制率, 然后根据计算的抑制率及对应的样品浓度, 利用 Prism Graphpad 软件拟合样品对细胞激活的梯度曲线及 IC50 值。

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 CSF1R / SRE Reporter – HEK293 cell line to CSF1**

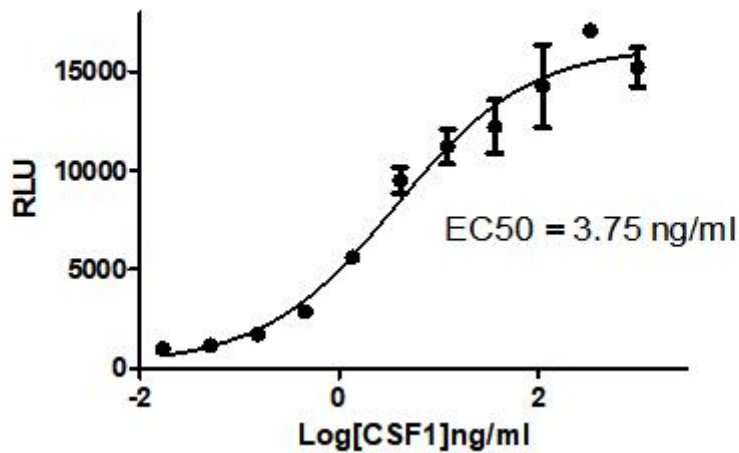


图 5: CSF1R Stimulation Assay 验证结果



Inhibition of CSF1 (100 ng/ml) -induced SRE reporter activity by CSF1R inhibitors

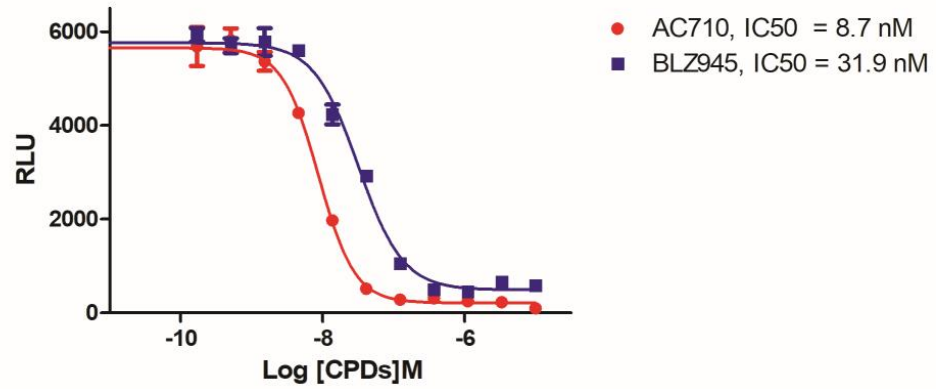


图 6: CSF1R Inhibition Assay 验证结果

## 8. 相关产品

名称	货号
CSF1R/SRE-Luc/HEK293	CBP74010
CSF1R/HEK293	CBP74048