

DKK-1 Effector Reporter Cell

CBP74200

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	4
6.1 DKK-1 Inhibition Rescue Assay	4
7. 数据展示	5
8. 相关产品	5

1. 背景信息

Wnt 信号通路一直是药物发现和免疫治疗的重要关注点之一，它被发现参与胚胎的发育过程，包括心血管发育和神经发育等，以及各种细胞行为，如细胞增殖、迁移、粘附和极性等。作为第一个被发现的 Wnt 通路，经典的 Wnt 信号转导通路已被广泛研究。尽管现代医学在治疗各种疾病方面取得了很大进展，但许多患者仍然患有与经典 Wnt 信号功能异常有关的疾病。Wnt 信号通路由 Wnt 蛋白介导，Wnt 蛋白是一种分泌性的调节特定下游靶基因的富含半胱氨酸的糖蛋白。在过去的几十年里，许多这方面的研究都强调了开发刺激 Wnt 途径的药物和探索可能的治疗策略的重要性。鉴于获得用于开发激动剂的生物活性 Wnt 蛋白具有一定难度以及成本过高，激活 Wnt 途径的可行替代方法是阻断天然存在的抑制剂。众所周知，DKK1 一种经典的 Wnt 信号通路的内源性抑制剂。此外，它还参与其他信号通路，包括 c-Jun NH2 末端激酶（JNK）通路和 DKK1/CKAP4 通路。高水平的 DKK1 表达已经在多种疾病中被检测到，DKK1 介导的抑制已被证实是许多导致机体功能异常的原因之一。由于 DKK1 在 Wnt 信号传导中的重要性，治疗与该信号传导途径相关的疾病的有效策略可以包括开发高效的抑制剂，如抗体和小分子等，以靶向 DKK1 的功能或在蛋白质和基因水平上抑制 DKK1 的表达。近年来，人们对 DKK1 抑制剂进行了许多研究，并在临床试验中开发和测试了几种 DKK1 抗体药物。

2. 产品介绍

科佰生物开发了 DKK-1 Effector Reporter Cell 报告基因细胞，在由调控因子调控并表达报告基因的重组细胞上。

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。

DKK-1 Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 DKK-1 的信号转导过程，原理见图 2 所示。

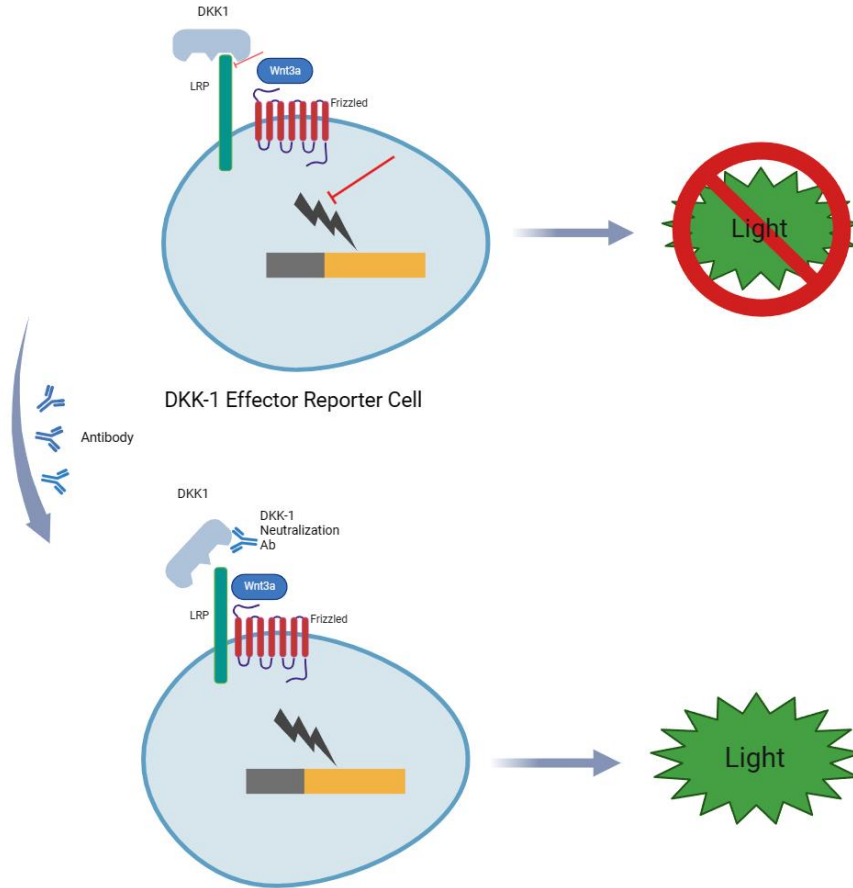


图 2: DKK-1 Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

传代培养基: DMEM+10%FBS+2ug/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 DKK-1 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
----	----	----

DKK-1 Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74200M
DKK-1 Neutralization Ab	/	/
Recombinant Human Wnt-3a	/	/
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
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 DKK-1 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) 加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO₂ 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 DKK-1 Inhibition Rescue Assay

DKK-1 Inhibition Rescue Assay 由报告细胞 DKK-1 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74200 开展，本实验中使用 Recombinant Human Wnt-3a、DKK-1 Neutralization Ab 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

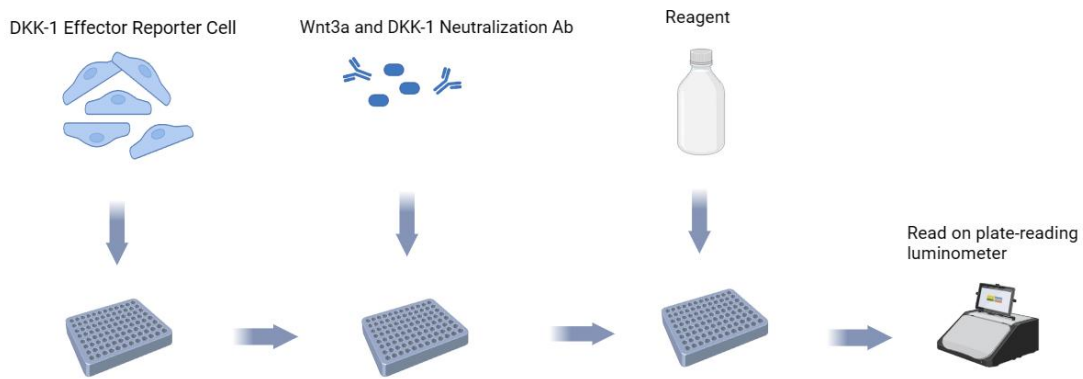


图 3: DKK-1 Inhibition Rescue Assay 流程示意图

- 1) 取对数期生长的 DKK-1 Effector Reporter 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 3.75×10^5 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 Wnt-3a(2 ug/ml)，加入 6.2 步骤 2) 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。
- 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抑制的梯度曲线及 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

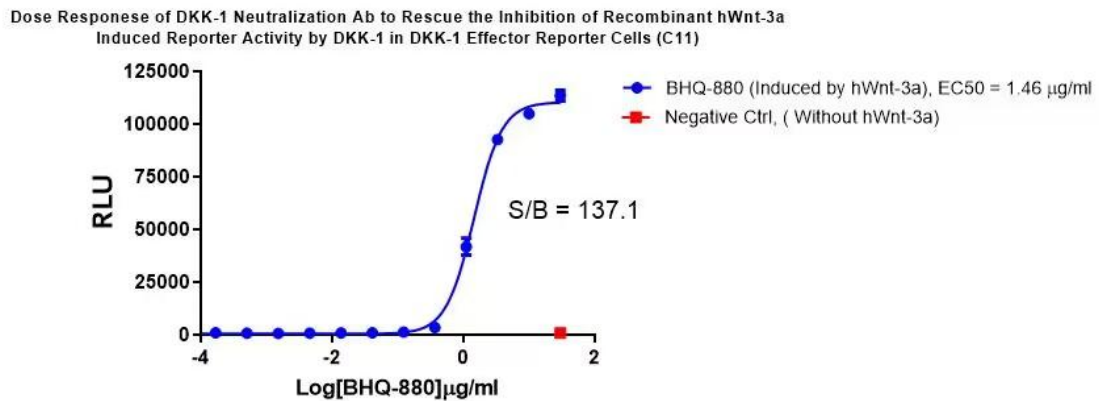


图 5: DKK-1 Inhibition Rescue Assay 验证结果

8. 相关产品

N/A