

FC γ R aAPC Cell

CBP74185

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	1
4. 主要仪器试剂耗材	1
5. 细胞培养	2
5.1 细胞复苏	2
5.2 细胞传代	3
5.3 细胞冻存	3
6. 细胞实验流程	3
6.1 PD1 Agonist Assay	3
6.2 BTLA Agonist Assay	4
7. 数据展示	5
8. 相关产品	5

1. 背景信息

FC γ 受体 (FC γ Rs) 是负责有效控制体液和先天免疫的关键免疫受体, 对于维持机体对感染产生适当反应和预防自身免疫之间的平衡至关重要。当失去这种平衡时, 会导致对癌症、自身免疫和感染的易感性增加。相比之下, 最佳的 FC γ R 结合有助于有效的疾病消退和对单克隆抗体免疫治疗的反应。

2. 产品介绍

科佰生物推出 FC γ R aAPC Cell 细胞模型, 将 FC γ R 和 aAPC 一起构建到细胞上。FC γ R aAPC Cell 稳定表达人 FC γ R。

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。

3. 细胞基本信息

表达基因: FC γ R

传代培养基: F12K+10%FBS+3ug/ml puromycin+600ug/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 PD1 或 BTLA 信号传导的拮抗剂的活性检测, 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
FC γ R aAPC Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74185M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089

PD1/NFAT-Luc/Jurkat 细胞	Cobioer	CBP74018
BTLA Effector Reporter Cell 细胞	Cobioer	CBP74118
Peresolimab	Cobioer	CBP74018PC
22B7	/	/
6G3	/	/
Icatolimab	/	/
Isotype Human IgG4	/	/
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 FCyR aAPC 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% 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 PD1 Agonist Assay

PD1 Agonist Assay 由报告细胞 PD1/NFAT-Luc/Jurkat, Cat. #CBP74018 细胞和靶细胞 FCγR aAPC Cell, Cat. #CBP74185 细胞配对开展,本实验中使用 Peresolimab, Cat.#CBP74018PC 作为测试样本,对本模型的生物功能进行验证。

图 1: PD1 Agonist Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 FCγR aAPC 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 4×10^5 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 FCγR aAPC 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 PD1/NFAT-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。

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 3: 96 孔板排布建议案例展示

6.2 BTLA Agonist Assay

BTLA Agonist Assay 由报告细胞 BTLA Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74118 细胞和靶细胞 FCyR aAPC Cell, Cat. #CBP74185 细胞配对开展，本实验中使用 22B7,6G3,Icatolimab, Isotype Human IgG4 作为测试样本,对本模型的生物功能进行验证。实验流程可参考 6.1 的操作规程。

7. 数据展示

Dose Response of PD-1 Agonist Antibody in PD-1/NFAT-Luc/Jurkat Cells With FC γ R aAPC Cells

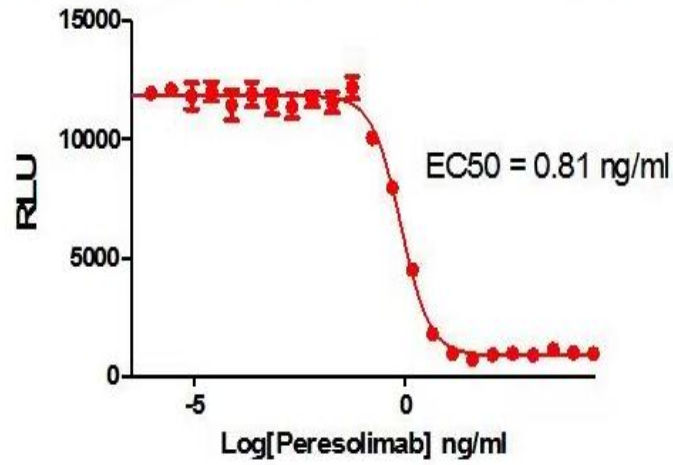


图 2: PD1 Agonist Assay 验证结果

Dose Response of BTLA Agonist Abs in BTLA Effector Reporter Cells With FC γ R aAPC Cells

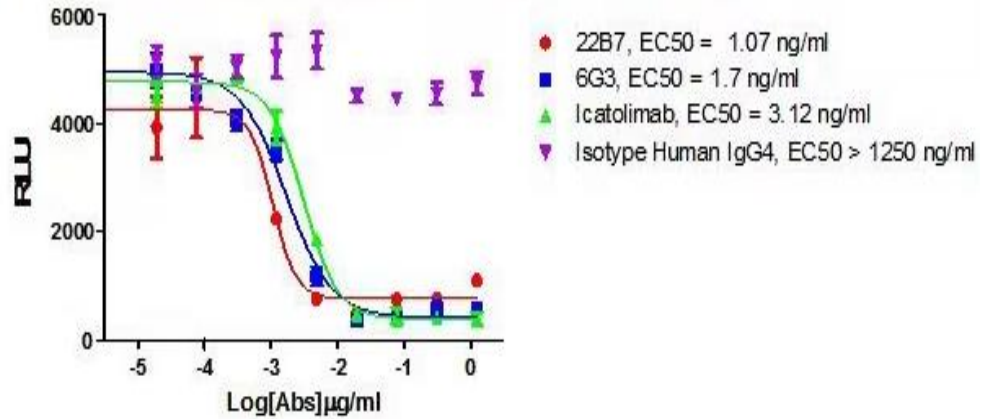


图 3: PD1&OX40 Blockade Assay 验证结果

8. 相关产品

名称	货号
PD1/NFAT-Luc/Jurkat	Cobioer
BTLA Effector Reporter Cell	Cobioer