

HVEM/TCR Activator/CHO

CBP74082

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 BTLA/HVEM Blockade Assay	4
7. 数据展示	6
8. 相关产品	7

1. 背景信息

HVEM 是肿瘤坏死因子受体家族的一员, BTLA/HVEM 的相互作用首次证明了这两个受体家族之间存在信号交叉。在发现 BTLA/HVEM 相互作用之前, HVEM 已经被发现与肿瘤坏死因子配体 LIGHT 和淋巴毒素- α 结合。BTLA/HVEM 相互作用产生共抑制信号, HVEM/LIGHT 的相互作用通过 HVEM 产生共刺激信号。

2. 产品介绍

科佰生物推出 HVEM/TCR Activator/CHO 细胞模型, 将 HVEM 和 TCR Activator 一起构建到 CHO 细胞上。HVEM/TCR Activator/CHO 稳定表达人 HVEM。见图 1 流式验证 HVEM 表达。

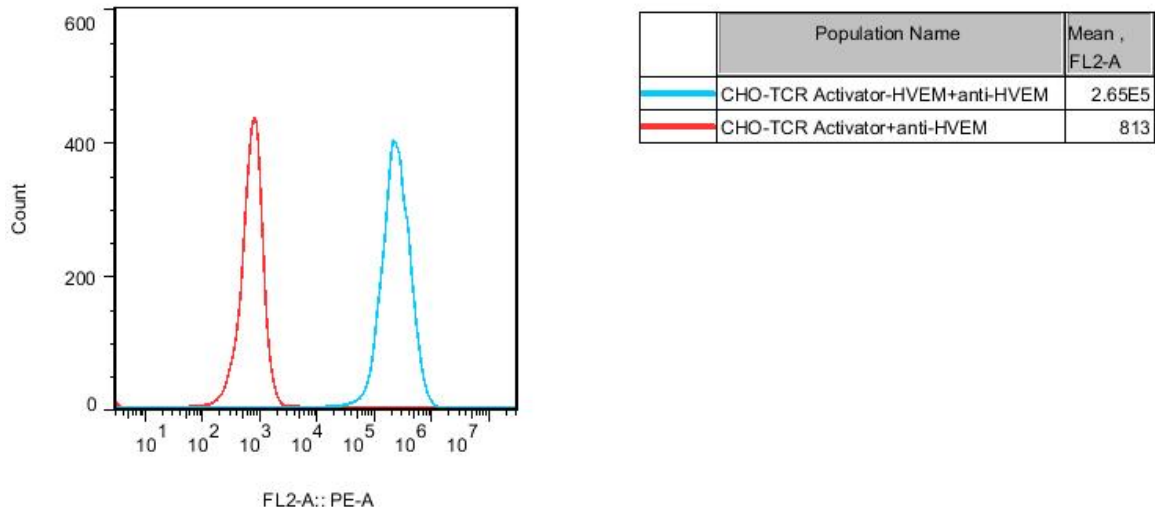


图 1: HVEM/TCR Activator/CHO 细胞稳定表达人 HVEM

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。

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

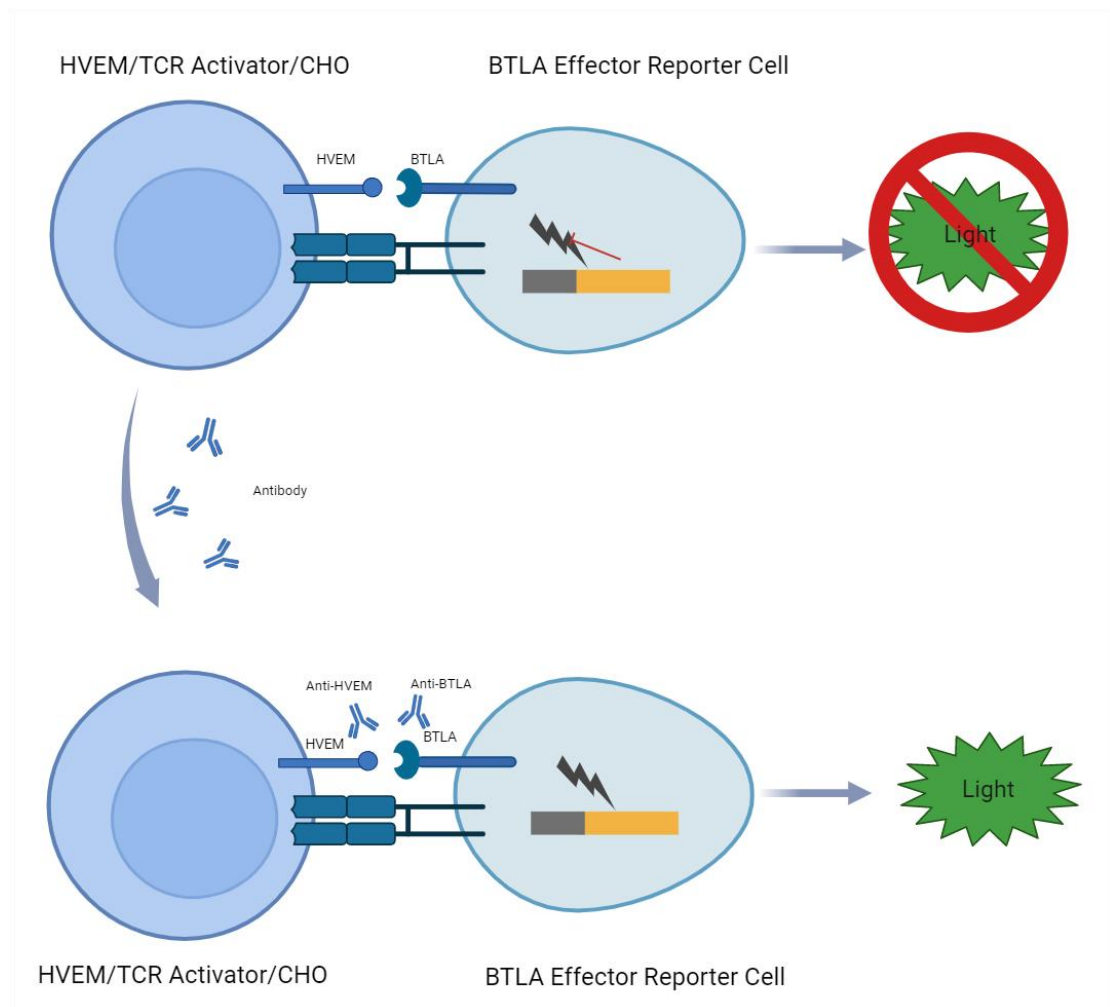


图 2: BTLA/HVEM 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

母细胞: CHO

表达基因: HVEM;TCR Activator

别名: HVEM, TNFRSF14, CD270, HVEA, TR2, LIGHTR

传代培养基: F12K+10%FBS+2ug/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 BTLA/HVEM 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
HVEM/TCR Activator/CHO 完全培养基	Cobioer	CBP74082
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
BTLA Effector Reporter Cell 细胞	Cobioer	CBP74118
Anti-BTLA mAb	Cobioer	CBP74118A
Anti-HVEM mAb	Cobioer	CBP74013A
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 HVEM/TCR Activator/CHO 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 BTLA/HVEM Blockade Assay

BTLA/HVEM Blockade Assay 由报告细胞 BTLA Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74018 细胞和靶细胞 HVEM/TCR Activator/CHO, Cat. #CBP74013 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-BTLA mAb, Cat.#CBP74118A 和 Anti-HVEM mAb, Cat.#CBP74013A 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

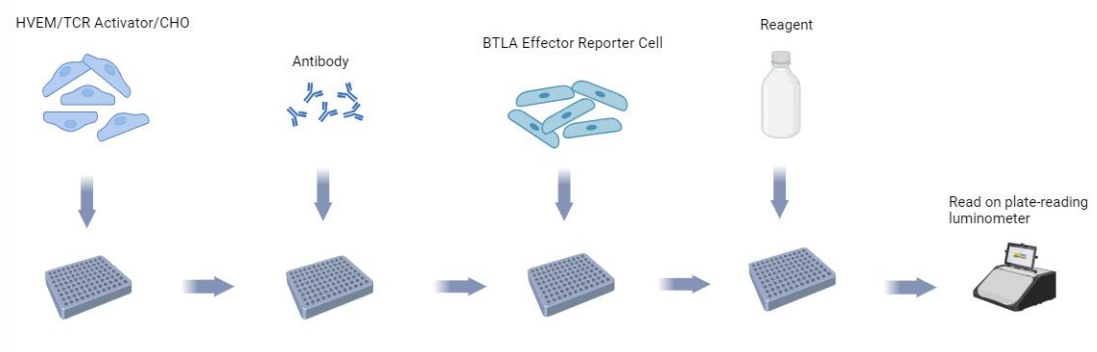


图 3: BTLA/HVEM Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 HVEM/TCR Activator/CHO 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 HVEM/TCR Activator/CHO 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 BTLA 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 4×10^5 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 BTLA Blocking Antibody in BTLA Effector Reporter Cells (Clone 1)
With HVEM / TCR Activator - CHO Cells

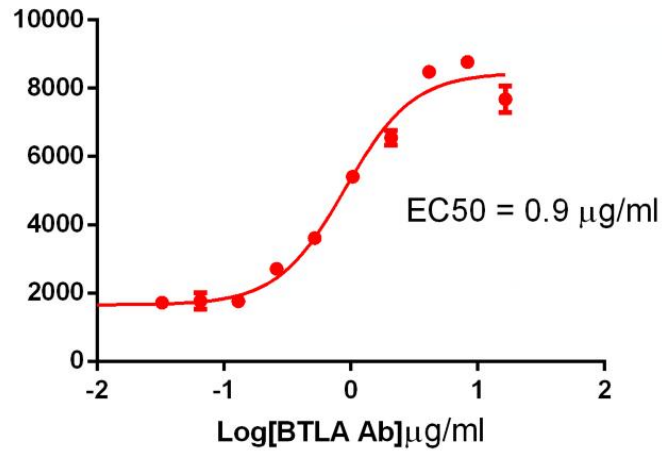


图 5: BTLA/HVEM Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-BTLA Ab)

Dose Response of HVEM Blocking Antibody in BTLA Effector Reporter Cells (Clone 1)
With HVEM / TCR Activator - CHO Cells

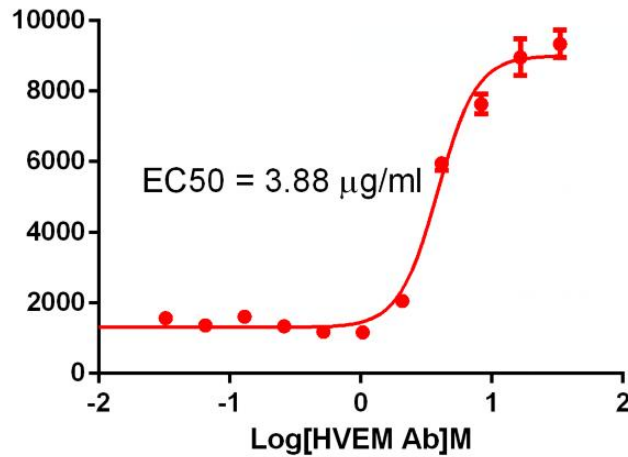


图 6: BTLA/HVEM Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-HVEM Ab)

8. 相关产品

名称	货号
BTLA Effector Reporter Cell	CBP74118
BTLA/SHP2 Reporter Cell	CBP74177
HVEM/U2OS Cell	CBP74178
HVEM/TCR Activator/CHO	CBP74082
HVEM/NFκB-Luc/Jurkat	CBP74013
HVEM/HEK293	CBP74047
HVEM/CHO	CBP74037
FCγR aAPC Cell	CBP74185