

NGF/hTRKA Effector Reporter Cell

CBP74174

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	4
5.3 细胞冻存	4
6. 细胞实验流程	4
6.1 NGF/hTRKA Stimulation Assay	4
6.2 NGF/hTRKA Inhibition Assay	5
7. 数据展示	7
8. 相关产品	8

1. 背景信息

神经生长因子(NGF)是一种由外周组织损伤刺激产生和释放的神经生长因子,它的表达水平通常在慢性神经系统疾病中会增加。NGF 与其受体 TrkA 结合,激活 TrkA 细胞内结构域激酶和下游信号通路的磷酸化,会导致神经递质的产生和异位放电,从而导致了疼痛的发生。基于上述机理,NGF 是用于疼痛治疗的一个极具潜力的靶点。研究表明,抗 NGF 抗体可以通过阻断 NGF 与其受体的结合来干扰神经系统,从而发挥镇痛作用。

2. 产品介绍

科佰生物开发了 NGF/hTRKA 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,稳定表达人 NGF/hTRKAR。见图 1 流式验证 NGF/hTRKA 表达。

	Population Name	Mean , FL4-A
	NGF / hTRKA Effector Reporter Cells+anti-TRKA	4.45E5
	Control cell+anti-TRKA	1182

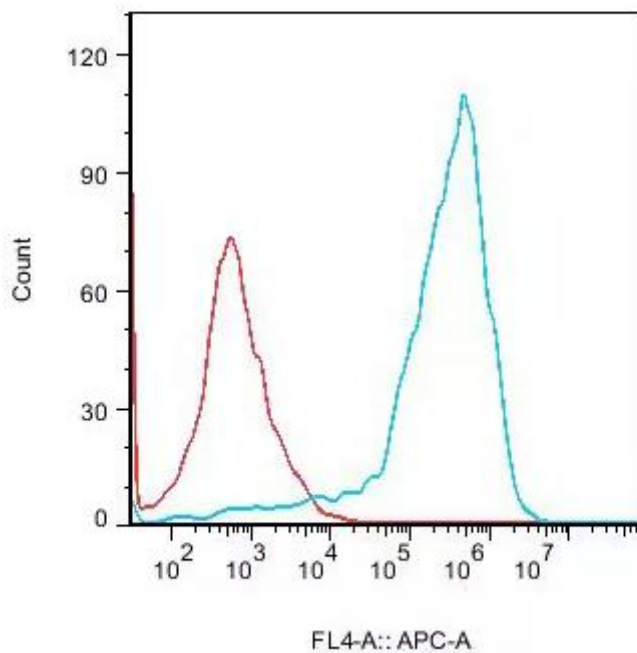


图 1: NGF/hTRKA Effector Reporter Cell 细胞表达人 NGF/hTRKA。

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。

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

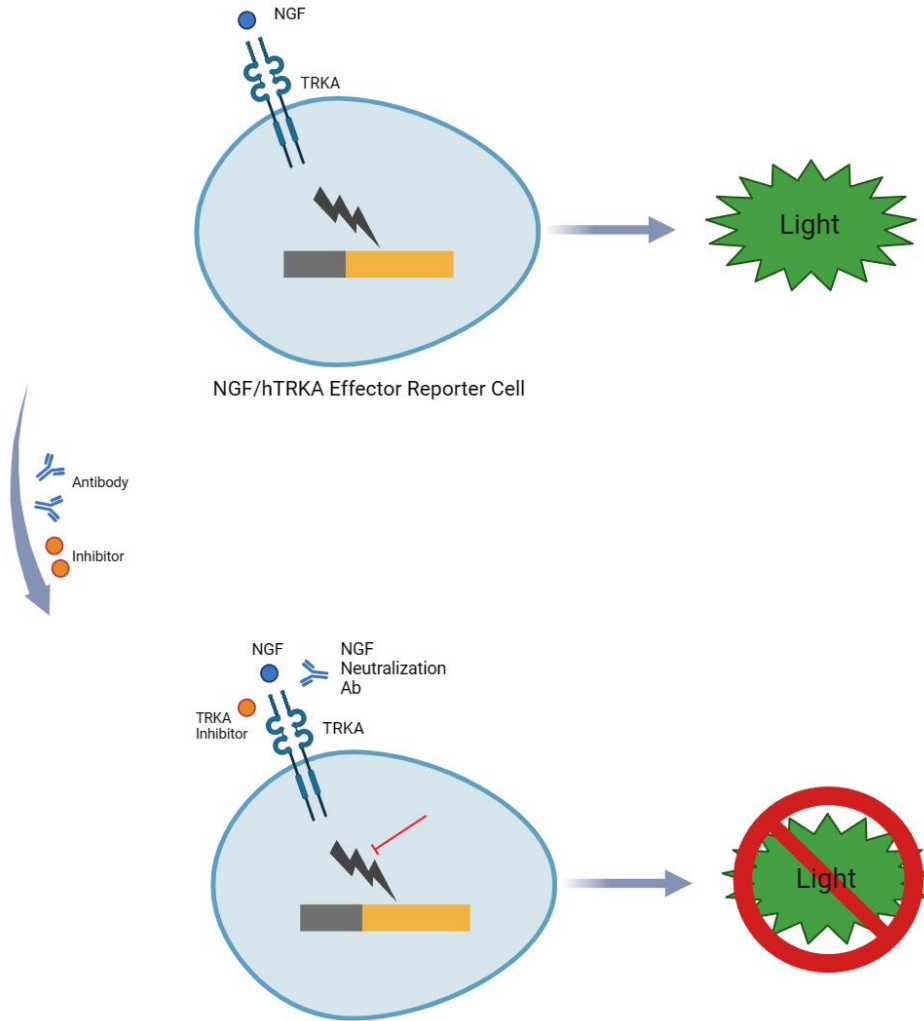


图 2: NGF/hTRKA Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: NGF/hTRKA

传代培养基: DMEM+10%FBS+2ug/ml puromycin+200ug/ml hrgromycin

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 NGF/hTRKA 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
NGF/hTRKA Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74174M
Recombinant Human NGF	/	/
TRKA Inhibitor	/	/
NGF Neutralization Ab	/	/
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
Ultra Luciferase Detection Kit	Cobioer	CBPH0001
Corning BioCoat Poly-D-Lysine Multiwell Plates 96-well	Corning	356651
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 NGF/hTRKA 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

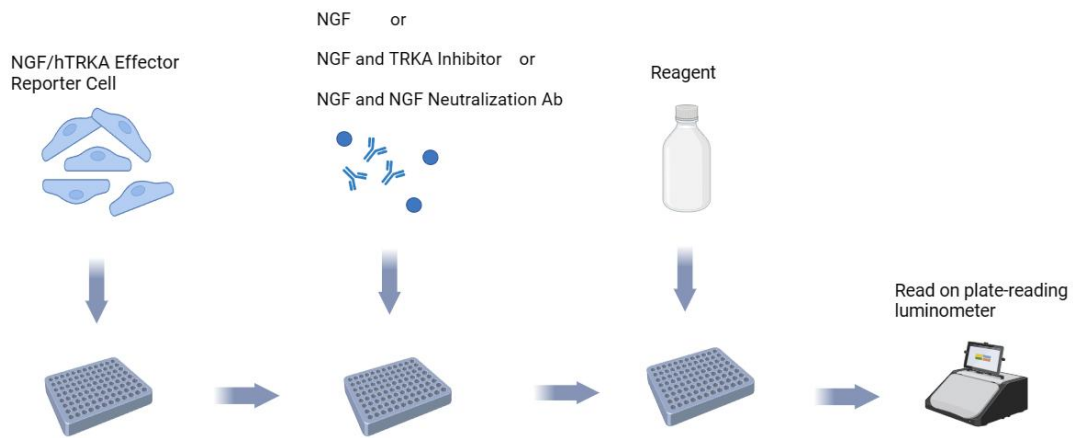


图 3: NGF/hTRKA Bioassay 流程示意图

6.1 NGF/hTRKA Stimulation Assay

NGF/hTRKA Stimulation Assay 由报告细胞 NGF/hTRKA Effector Reporter Cell，Cat. #CBP74174 开展，本实验中使用 Recombinant Human NGF 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 NGF/hTRKA Effector Reporter Cell 细胞消化离心去上清，DPBS 重悬洗涤

一次细胞，离心弃上清，然后重悬于新鲜 Opti-MEM+0.5%FBS+NEAA+Nap 培养基中，细胞密度调整为 3×10^5 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 Opti-MEM+0.5%FBS+NEAA+Nap 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 NGF/hTRKA Inhibition Assay

NGF/hTRKA Stimulation Assay 由报告细胞 NGF/hTRKA Effector Reporter Cell, Cat.#CBP74174 开展，本实验中使用 TRKA Inhibitor 和 NGF Neutralization Ab 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 NGF/hTRKA Effector Reporter Cell 细胞消化离心去上清，重悬于新鲜 Opti-MEM+0.5%FBS+NEAA+Nap 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 Opti-MEM+0.5%FBS+NEAA+Nap 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 Opti-MEM+0.5%FBS+NEAA+Nap 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 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。(备注：对于 NGF 的阻断抗体，建议加入抗体后马上加入配体刺激；对于 TrkA 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

Dose Response of Recombinant Human NGF in NGF/TRKA Effector Reporter Cells (C21)

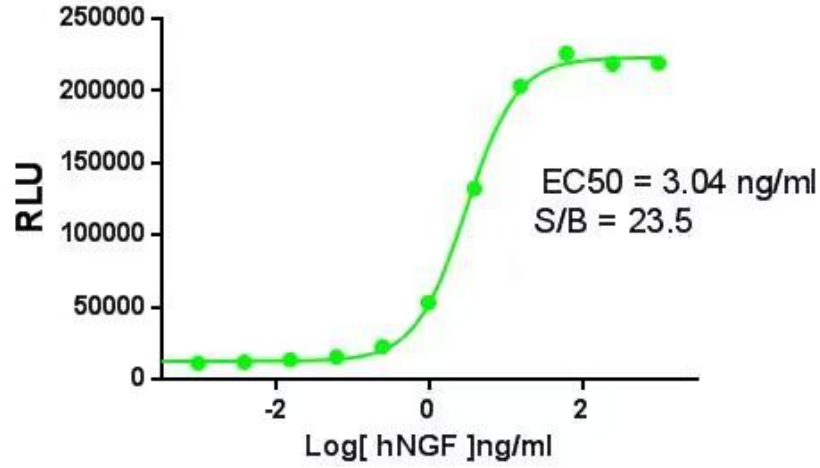


图 5: NGF/hTRKA Stimulation Assay 验证结果

Inhibition of hNGF-induced Reporter Activity by TRKA Inhibitor in NGF/hTRKA Effector Reporter Cells (Clone21)

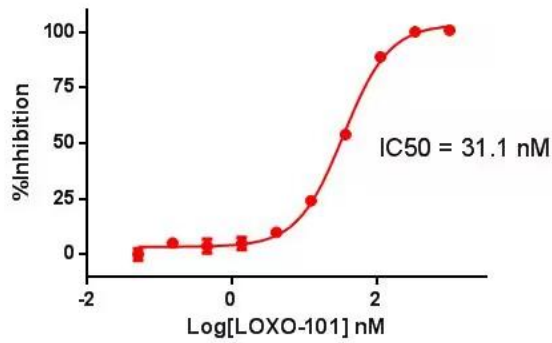


图 6: NGF/hTRKA Inhibition Assay 验证结果(测试样本: TRKA Inhibitor)

Inhibition of hNGF-induced Reporter Activity by NGF Neutralization Ab in NGF/hTRKA Effector Reporter Cells (Clone21)

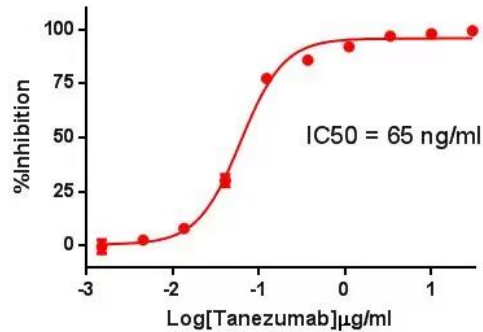


图 7: NGF/hTRKA Inhibition Assay 验证结果(测试样本: NGF Neutralization Ab)

8. 相关产品

N/A