

OX40/NF κ B-Luc/HEK293

CBP74017

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 OX40 Stimulation Assay	4
7. 数据展示	6
8. 相关产品	6

1. 背景信息

OX40（又称为 CD134）是一种在激活的人类 T 细胞上瞬时表达的共刺激分子，在 T 细胞激活、扩增、分化、生成和维持记忆性 T 细胞中发挥作用。它属于 TNF 受体（TNFR）超家族，该分子及其配体复合体（OX40L）的晶体结构是由一个三聚体 OX40L 分子和三个 OX40 单体组成的三聚体构型，同属 TNFR 超家族（TNFRSF）的成员都需要形成类似这样的高阶多聚结构才能实现足够的下游信号激活。在临床上，由于缺乏足够强度的激活，激动剂抗体单一疗法通常表现出相对微弱的疗效，因此 OX40 激动剂抗体作为单一疗法显示出的疗效非常有限，但在一些临床前模型中，与单独的检查点阻断抗体相比，抗 OX40+抗 PD-1/L1 以及抗 CTLA-4 的抗体联合治疗显示出了更好的抗肿瘤效果。因此，OX40 激动剂抗体与针对抑制性受体如抗 PD-1/L1 的免疫疗法结合使用是一种很有前途的治疗策略。

2. 产品介绍

科佰生物推出 OX40/NFκB-Luc/HEK293 报告基因细胞，在由 NFκB 调控并表达 Luc 荧光素酶报告基因的 HEK293 重组细胞 NFκB-Luc/HEK293 上，稳定表达人 OX40。见图 1 流式验证 OX40 表达。

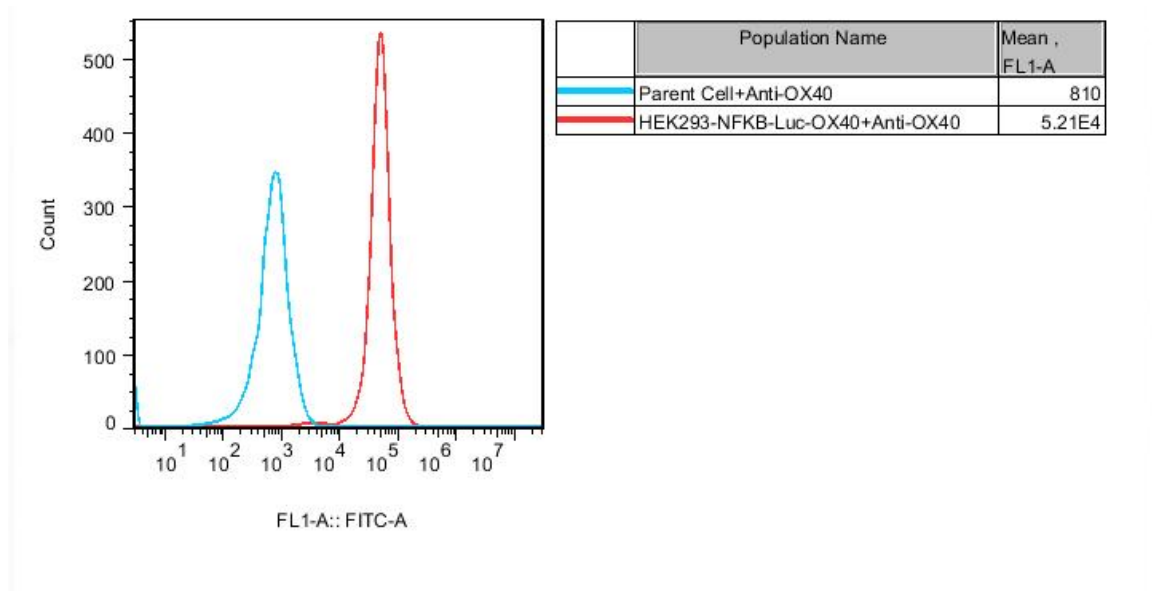


图 1: OX40/NFκB-Luc/HEK293 细胞表达人 OX40

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。

OX40/NFκB-Luc/HEK293 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 OX40 的信号转导过程，原理见图 2 所示。

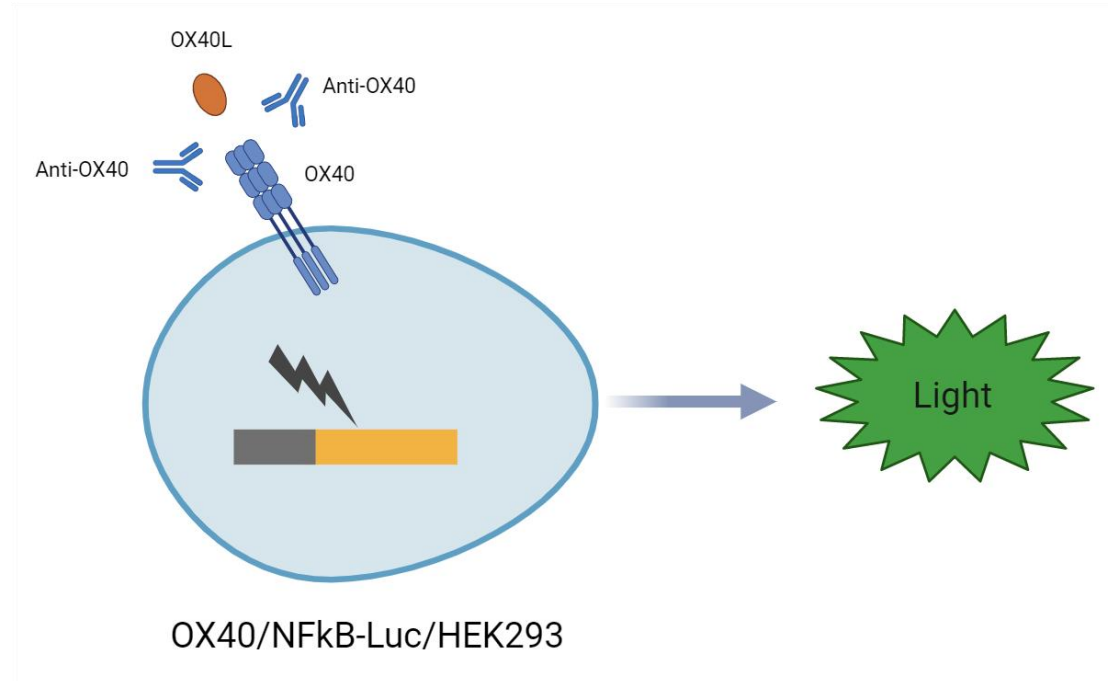


图 2: OX40/NFκB-Luc/HEK293 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

母细胞: HEK293

表达基因: OX40,NFκB-Luc

别名: CD134

传代培养基: MEM+10% Foetal Bovine Serum (FBS)+ 1% Non Essential Amino Acids (NEAA) + 1mM Sodium Pyruvate (NaP) +1ug/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 OX40 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
OX40/NFκB-Luc/HEK293 完全培养基	Cobioer	CBP74017M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
OX40L	/	/
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 OX40/NFκB-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% 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 OX40 Stimulation Assay (FcγR Independent)

OX40 Stimulation Assay 由报告细胞 OX40/NFκB-Luc/HEK293, Cat. #CBP74017 开展, 本实验中使用 OX40L 作为测试样本, 对本模型的生物功能进行验证。

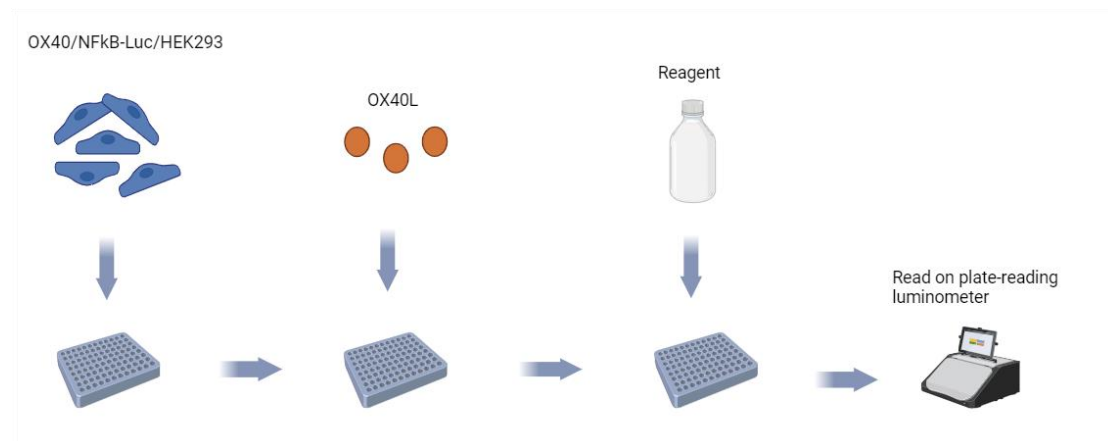


图 3: OX40 Stimulation Assay 流程示意图

- 1) 取对数期生长的 OX40/NFκB-Luc/HEK293 细胞消化离心去上清, 重悬于新鲜 MEM+10%FBS 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 MEM+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 OX40 Stimulation Assay (FcγR Dependent)

- 1) 取对数期生长的 OX40/NFκB-Luc/HEK293 细胞消化离心去上清, 重悬于新鲜 MEM+10%FBS 培养基中, 细胞密度调整为 6×10^5 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, 50ul/孔细胞悬液。
- 3) 第二天, 用 MEM+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 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。(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 FCGR2B/CHO 细胞消化离心去上清, 重悬于新鲜 MEM+10%FBS 培养基中, 细胞密度调整为 1×10^6 Cells/ml。
- 5) 将消化好的 FCGR2B/CHO 细胞加入步骤 3) 96 孔板中, 40 ul/孔, 然后将 96 孔板继续放置 37°C 培养箱 5.5 至 6 小时
- 6) 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。
- 7) 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	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

OX40/NF-κB Reporter - HEK293 Recombinant Cell Line (C1)

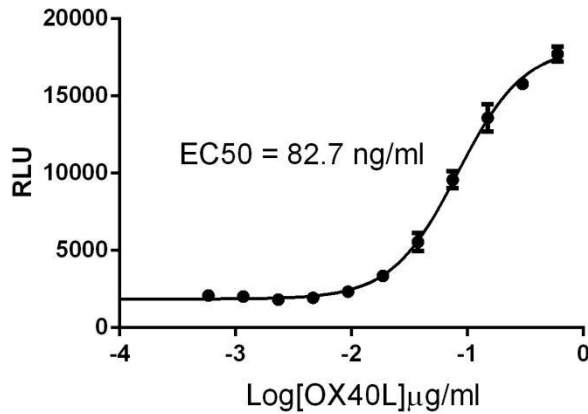


图 5: OX40 Stimulation Assay 验证结果

8. 相关产品

名称	货号
PD1/OX40 Dual Effector Reporter Cell	CBP74163

OX40/NFκB-Luc/Jurkat	CBP74061
OX40/NFκB-Luc/HEK293	CBP74017
OX40/HEK293	CBP74049
OX40/CHO	CBP74038