

RANK Effector Reporter Cell

CBP74125

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	3
6. 细胞实验流程	4
6.1 RANK Stimulation Assay	4
6.2 RANK Inhibition Assay	5
7. 数据展示	6
8. 相关产品	7

1. 背景信息

核因子受体- κ B 激活因子 (RANK/TRANCE 受体 (RANK/TRANCE receptor/TNFRSF11A)) 是肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 家族的一员。其配体 (RANKL) 与受体的结合可通过增加骨转换调节骨建模和重塑过程中破骨细胞的形成, 激活和存活, 以及参与几种相关疾病的病理过程。

破骨细胞生成信号通路被产生 RANKL 的成骨细胞激活, RANKL 结合并激活破骨细胞前体的 RANK 受体, 然后衔接蛋白 TRAF6 被招募到 RANK 受体并激活 NF- κ B, 诱导它进入细胞核, 促使 c-FOS 的和 NFATc1 表达的升高, 进而增强了破骨细胞生成相关基因的转录。而骨保护素 (OPG) 可结合并抑制 RANKL 诱导的信号通路, 在 RANKL 过多或 OPG 不足的细胞中, RANKL/RANK 信号上调会导致破骨细胞形成过多和发生骨吸收, 引起病理性骨流失和破坏。

此外, RANKL 在特定的癌症中也发挥一定作用, 在骨肉瘤中, 除了癌性骨破坏外, RANKL 还参与肿瘤的发生和转移; 也有研究表明在乳腺癌小鼠模型中 RANKL 抑制可显著延缓致癌物和激素诱导乳腺肿瘤的形成。

2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 RANK 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 RANK。见图 1 流式验证 RANK 表达。

图 1: RANK Effector Reporter Cell 细胞表达人 RANK。

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。

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

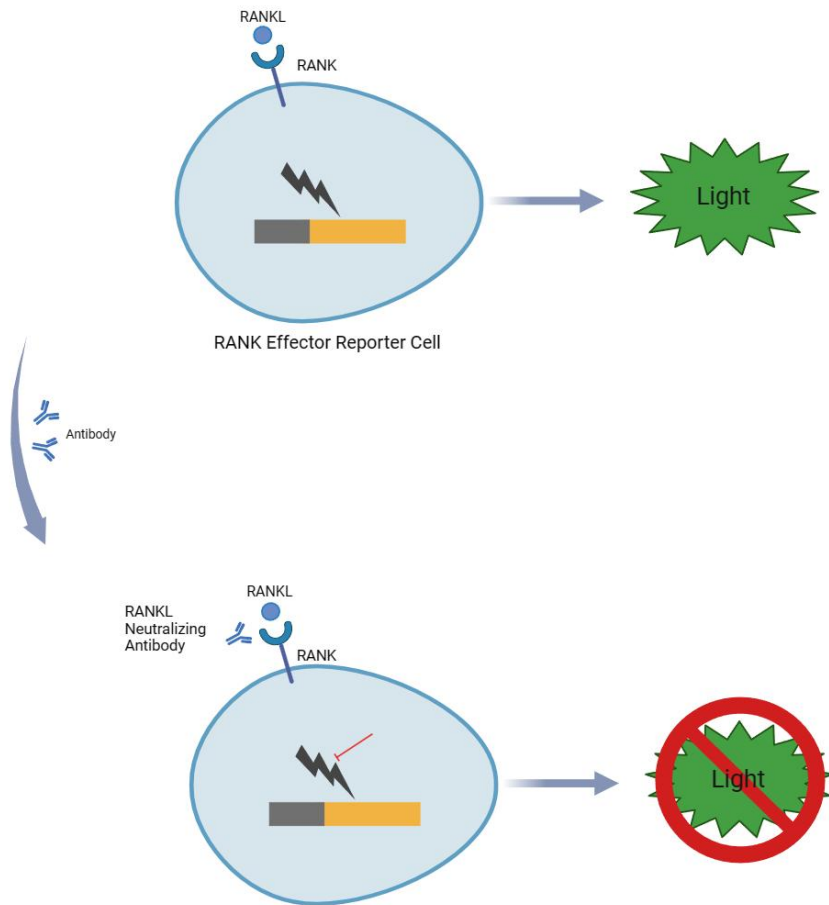


图 2: RANK Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因:RANK

传代培养基: MEM+10%FBS+NEAA+NaP+200ug/ml hygromycin+1ug/ml puromycin

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 RANK 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
RANK Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74125M
Recombinant RANKL	/	/
RANKL Neutralizing Antibody	/	/
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 RANK 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

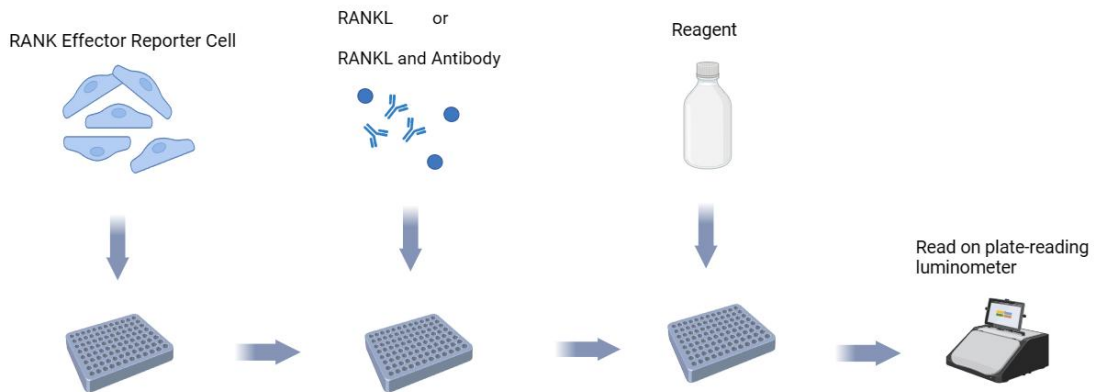


图 3: RANK Bioassay 流程示意图

6.1 RANK Stimulation Assay

RANK Stimulation Assay 由报告细胞 RANK Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74125 开展, 本实验中使用 Recombinant RANK 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 RANK Effector Reporter Cell 细胞消化离心去上清, 重悬于新鲜 MEM+10%FBS+NEAA+NaP 培养基中, 细胞密度调整为 5×10^5 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+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 RANK Inhibition Assay

RANK Stimulation Assay 由报告细胞 RANK Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74125 开展，本实验中使用 RANKL Neutralizing Antibody 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 RANK Effector Reporter Cell 细胞消化离心去上清，重悬于新鲜 MEM+10%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 MEM+10%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 MEM+10%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），加入步骤 e 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 RANKL 的阻断抗体，建议加入抗体后马上加入配体刺激；对于 RANK 受体的阻断抗体，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 Human Recombinant RANKL in RANK Effector Reporter Cell Line (C31)

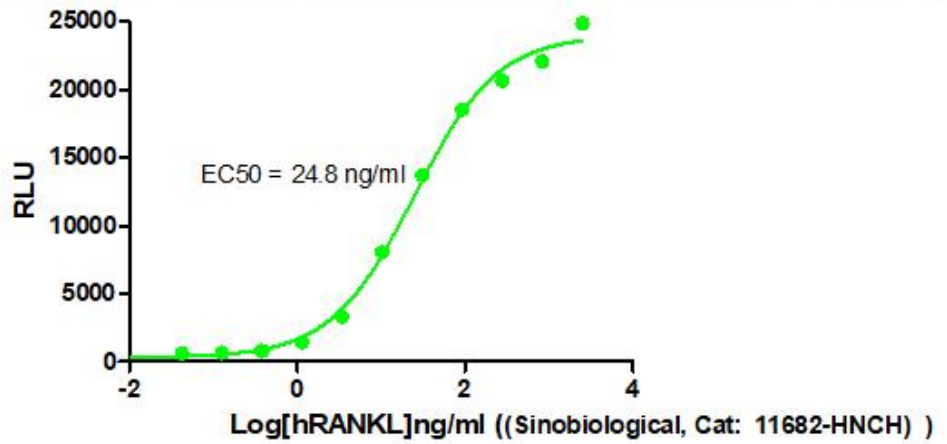


图 5: RANK Stimulation Assay 验证结果

Inhibition of RANKL-induced Reporter Activity by RANKL Neutralizing Antibody in RANK Effector Reporter Cells (Clone31)

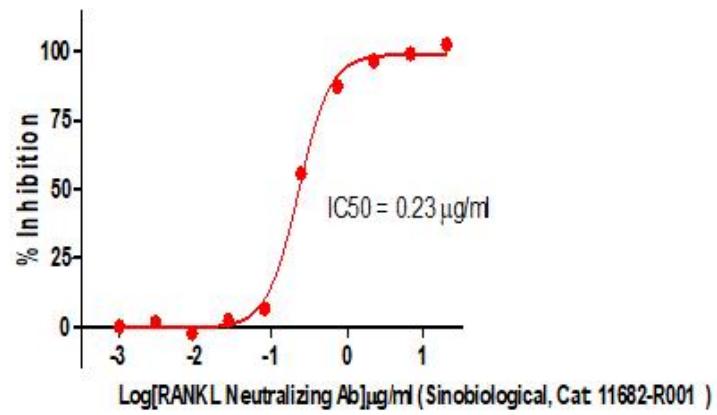


图 6: RANK Inhibition Assay 验证结果

8. 相关产品

N/A