

CCR4/ β -Arrestin /CHO

CBP71349

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	3
4. 主要仪器试剂耗材	3
5. 细胞培养	4
5.1 细胞复苏	4
5.2 细胞传代	4
5.3 细胞冻存	4
6. 细胞实验流程	4
6.1 激动剂检测	4
6.2 拮抗剂检测	5
7. 数据展示	6
8. 相关产品	7

1. 背景信息

趋化因子属于细胞因子家族,是具有趋化作用的细胞因子,调节吞噬细胞和淋巴细胞的游走和活化。趋化因子受体属于 GPCR 家族,包括 CXC、CC、C 和 CX3C 4 个亚族,趋化因子通过相应的趋化因子受体参与炎症反应并在其中起核心作用。C-C 趋化因子受体

(C-C chemokine receptor type 4, CCR4), 也称为 CD194, 由包含 7 次跨膜结构域的多肽链组成,属于 G 蛋白偶联受体家族。基因定位于 3 号染色体 p24,基因全长 3.34kb,编码蛋白含有 360 个氨基酸残基,相对分子质量为 41kDa。广泛表达于辅助性 T 细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、树突状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞等免疫细胞中,与肿瘤、炎症等疾病相关,在维持免疫平衡的过程中发挥重要作用。CCR4 与趋化因子 CCL2 ,CCL17 ,CCL22 和 CK-LF-1 结合,参与许多生理和病理过程。研究表明,CCR4 在人类过敏性皮炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病和糖尿病等发病时表达量明显增加,提示 CCR4 在免疫性疾病中起着重要作用。

2. 产品介绍

CCR4 在其配体的刺激下,会招募 β -Arrestin 并与之结合,根据此原理,科佰生物开发的 CCR4/ β -Arrestin/CHO 报告基因细胞上稳定表达了 CCR4 以及融合荧光素酶报告基因的 β -Arrestin,当缺乏配体刺激时, β -Arrestin 不与 CCR4 结合,融合 β -Arrestin 的荧光素酶处于失活构象,当 CCR4 遭遇配体刺激时,融合荧光素酶报告基因的 β -Arrestin 被招募,使荧光素酶报告基因处于激活状态,加入其底物后发光信号增强,当待测样品阻断配体对 CCR4 刺激时,报告基因发光信号又被抑制。

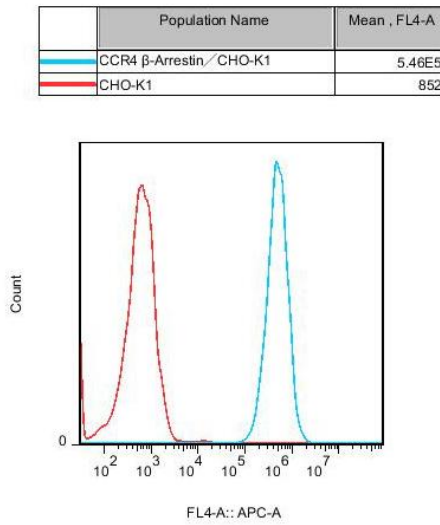


图 1: CCR4/ β -Arrestin/CHO 细胞表达人 CCR4

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。

CCR4/ β -Arrestin/CHO 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 CCR4/ β -Arrestin 的信号转导过程,原理见图 2 所示。

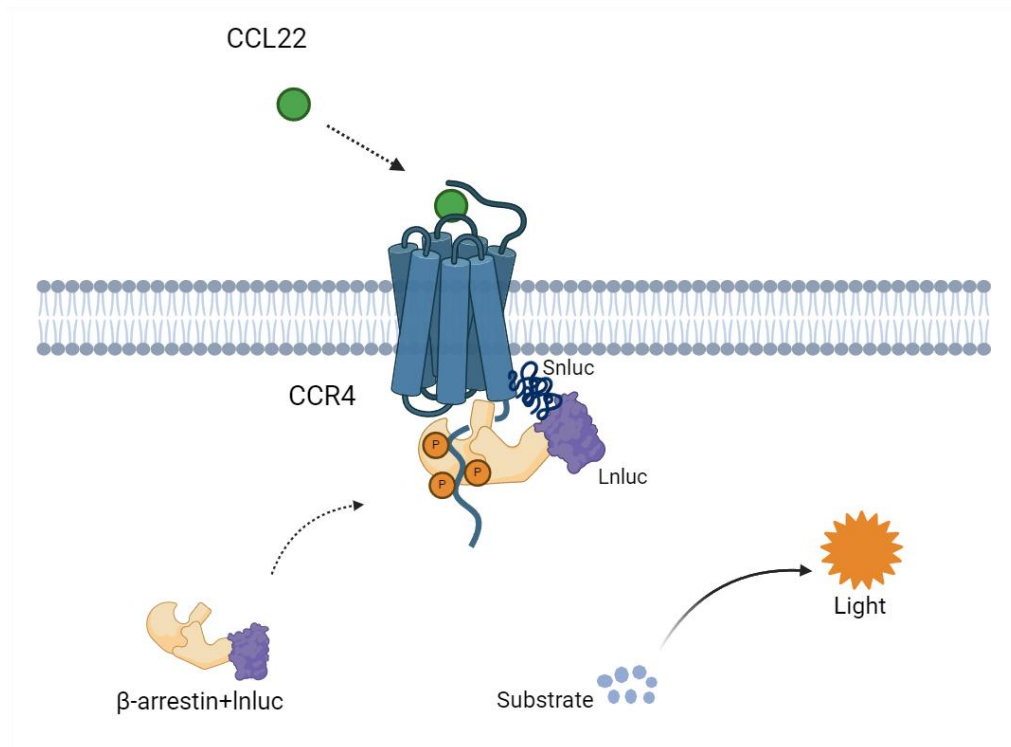


图 2: CCR4/ β -Arrestin/CHO 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

传代培养基: F12k+10%FBS+5ug/ml puromycin+5ug/ml blasticidin

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 CCR4/ β -Arrestin 信号传导的激活剂、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
Human CCR4/ β -Arrestin/CHO 完全培养基	Cobioer	CBP71349M
Recombinant Human Macrophage-Derived Chemokine/CCL22	PrimeGene	Item No: 204-22
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
C96 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	/
Nano-Glo [®] Live Cell Assay System	Promega	Cat.No.: N2011
Opti-MEM [™] 减血清培养基	Gibco	Cat.No.: 51985-034

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 CCR4/ β -Arrestin/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 激动剂检测

- 1) 取对数生长的 Human CCR4/ β -Arrestin/CHO 细胞，胰酶消化脱落并用 F12K+10%FBS 培养基终止胰酶反应，离心弃上清，用 DPBS 重悬洗涤细胞一次，继续离心弃上清，然后将细胞重悬于含 2%FBS 的 Opti-MEM™ 减血清培养基中，将重悬的细胞密度调整为 2.78×10^5 /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，90ul/孔细胞悬液，37 度培养箱培养过夜。
- 3) 第二天将配体 CCL22 用含 2%FBS 的 Opti-MEM™ 减血清培养基做梯度稀释，配制 10x 梯度稀释溶液然后将样品从 50 µg/ml 浓度开始，3 倍梯度稀释 11 个浓度，并设置 0 浓度对照孔，转移梯度稀释的样品溶液 10 ul 至步骤 2) 96 孔板中，使得 96 孔板中的 CCL22 梯度溶液终浓度达到 1x,然后将 96 孔板放入细胞培养箱继续培养 90 分钟。（**注意：不同厂家批次的 CCL22 可能存在活性差异，因此采用不同来源的 CCL22 可能需要优化其梯度浓度设置**）
- 4) 将 Nano-Glo® Live Cell Assay System 中的 Nano-Glo® Live Cell Substrate 用 Nano-Glo® LCS Dilution Buffer 稀释 20 倍，配制成 5x 检测液
- 5) 将步骤 4) 的 96 孔板从培养箱中取出，加入 25ul/孔 步骤 5) 中配制的 5x 检测液，然后剧烈震荡 15 到 30 秒放入酶标仪中读取 RLU 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 CCL22 对细胞激活的梯度曲线及 EC50 值。

6.2 拮抗剂检测

- (1) 取对数生长的 CCR4/β-Arrestin/CHO 细胞，胰酶消化脱落并用 F12K+10%FBS 培养基终止胰酶反应，离心弃上清，用 DPBS 重悬洗涤细胞一次，继续离心弃上清，然后将细胞重悬于含 2%FBS 的 Opti-MEM™ 减血清培养基中，将重悬的细胞密度调整为 3.125×10^5 /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，37 度培养箱培养过夜。
- (3) 第二天根据拮抗剂浓度，用含 2%FBS 的 Opti-MEM™ 减血清培养基配制 10*梯度稀释溶液，共设置 10 个浓度梯度，并设置 0 浓度培养基对照孔，取梯度稀释样品加入步骤 2) 的 96 孔板中（10 ul/孔，只加 1 到 10 列，11,12 列加入等体积的培养基）。（**备注：对于受体拮抗剂，加入 96 孔板后，建议 37 度培养箱孵育 30 分钟，对于配体阻断抗体，建议加入 96 孔板后，直接进行下一步配体刺激**）
- (4) 用含 2%FBS 的 Opti-MEM™ 减血清培养基配制 10*EC90 浓度的 CCL22 加入步骤 3) 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 90 分钟。

- (5) 将 Nano-Glo® Live Cell Assay System 中的 Nano-Glo® Live Cell Substrate 用 Nano-Glo® LCS Dilution Buffer 稀释 20 倍，配制成 5x 检测液
- (6) 将步骤 4) 的 96 孔板从培养箱中取出，加入 25ul/孔 步骤 5) 中配制的 5x 检测液，然后剧烈震荡 15 到 30 秒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，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(IC50 定义为化合物抑制率 50%时对应的化合物浓度)。
- (8) $\%Inhibition = [1 - (\text{待测化合物孔值} - \text{阴性对照孔平均值}) / (\text{DMSO 对照孔平均值} - \text{阴性对照孔平均值})] * 100$

7.数据展示

Dose response of Human Recombinant CCL22 in CHO-K1 CCR4 β -Arrestin Cell Line (C12)

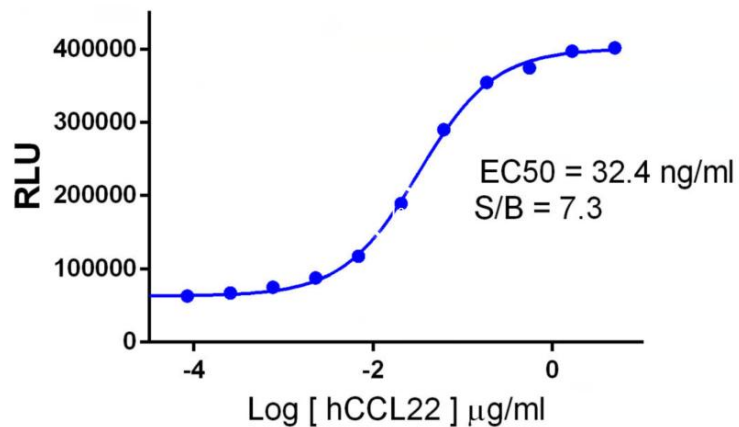


图 3: Dose response of Human Recombinant CCL22 in CHO-K1 CCR4 β -Arrestin Cell Line (C12).

**Inhibition of CCL22-induced beta-Arrestin Recruitment
in CCR4 beta-Arrestin CHO-K1 Cells**

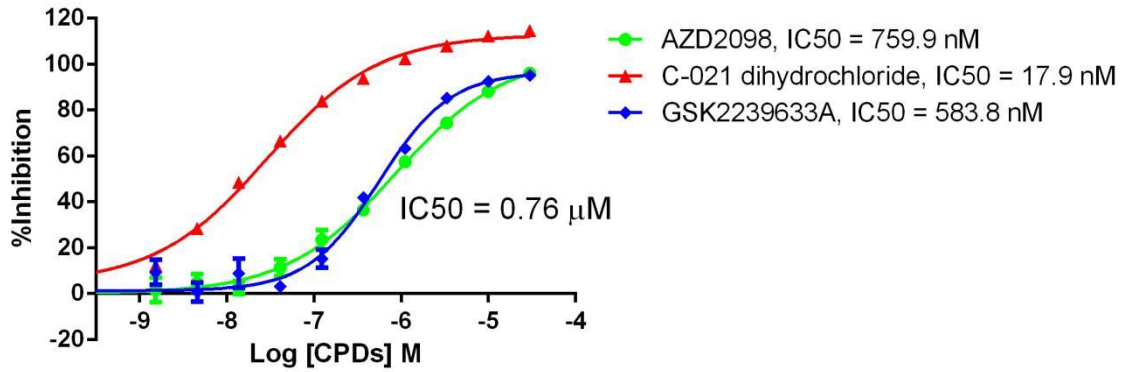


图 4: Inhibition of CCL22-induced beta-Arrestin Recruitment in CCR4 beta-Arrestin CHO-K1 Cells.

8.相关产品

名称	货号
CCR1/CHO	CBP71353
CCR2/CHO	CBP71350
CCR2/Ga15/CHO	CBP71335
CCR2/Ga16/HEK293	CBP71055
CCR4/Ga15/CHO	CBP71336
CCR4/ β -Arrestin/CHO	CBP71349
CCR5/CHO	CBP71352
CCR5/Ga15/CHO	CBP71057
CCR8/CHO	CBP71362
CCR8/ β -Arrestin/CHO	CBP71363
CCR8/CHO	CBP71364
CCR6/CHO	CBP71354
CCR7/CHO	CBP71351
CCR10/CHO	CBP71355