

hGDF/GFRAL&RET Effector Reporter Cell CBP74186 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	4
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	5
6.1 Human GDF-15	5
6.2 hGDF-15 Inhibition Assay	5
7. 数据展示	6
8. 相关产品	7

1. 背景信息

生长分化因子 15 (Growth differentiation factor 15, GDF15) 一种内分泌激素也被称为巨噬细胞抑制细胞因子 (MIC-1), 是 TGF β 超家族的成员。GDF15 作为一种以 25 kDa 二聚体形式循环的分泌蛋白, 由两个含 112 个氨基酸的多肽链组成, 单链间通过二硫键连接。GDF15 在正常的组织中表达较少, 但是在受伤的组织中表达会上调。GDF15 正常情况下并不在成人心肌表达, 不过在心肌损伤后心脏内的心肌细胞、脂肪细胞、巨噬细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞都会显著表达 GDF15。细胞应激以及二甲双胍会导致 GDF15 的表达升高, 引发各种癌症、厌食、体重减轻和新陈代谢的改变。GFRAL 作为胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 家族 α 样受体, 基因定位于人 6 号染色体, 含有 9 个外显子, 且存在可变剪切体。它是 GDF15 的唯一受体, 在结合 GDF15 后与辅助受体 RET 结合形成 GDF15-GFRAL-RET complex 复合物, 激活下游 AKT, ERK and PLC- γ 信号通路, 介导控制能量摄入和能量代谢调节的生物学效应。激活 GDF15-GFRAL 信号通路能够控制摄食进而抑制代谢性疾病发展, 治疗发胖相关疾病; 抑制 GDF15-GFRAL 信号通路则能够增强免疫系统对实体瘤的杀伤, 并能够治疗或预防癌症恶病质。

2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 hGDF/GFRAL&RET 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 hGDF/GFRAL&RET。见图 1 和图 2 流式验证 hGDF/GFRAL&RET 表达。

	Population Name	Mean , FL4-A
	GFRAL&RET Effector Reporter cell+anti-GFRAL	8.39E4
	Control Cell+anti-GFRAL	5481

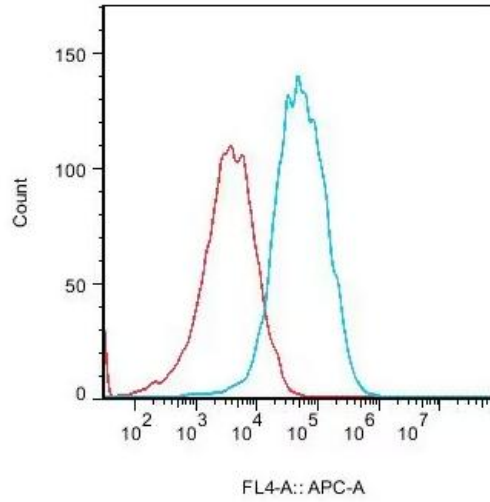




图 1: hGDF/GFRAL&RET Effector Reporter Cell 细胞表达人 GFRAL

	Population Name	Mean , FL4-A
	GFRAL & Ret Effector Cell+anti-RET	1.44E4
	Control Cell+anti-Ret	1866

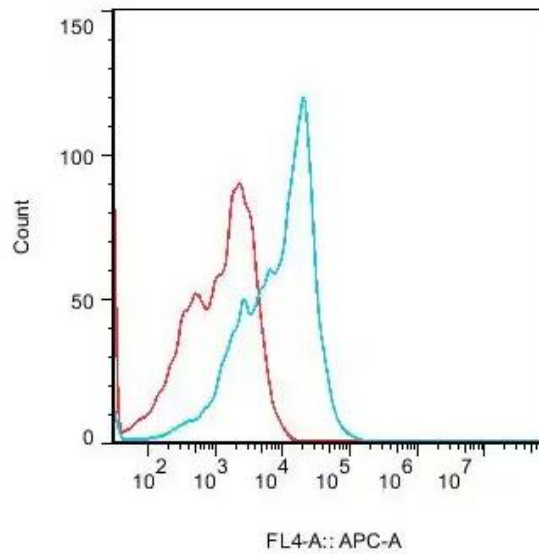


图 2: hGDF/GFRAL&RET Effector Reporter Cell 细胞表达人 RET

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。

hGDF/GFRAL&RET Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内hGDF/GFRAL&RET的信号转导过程,原理见图3所示。

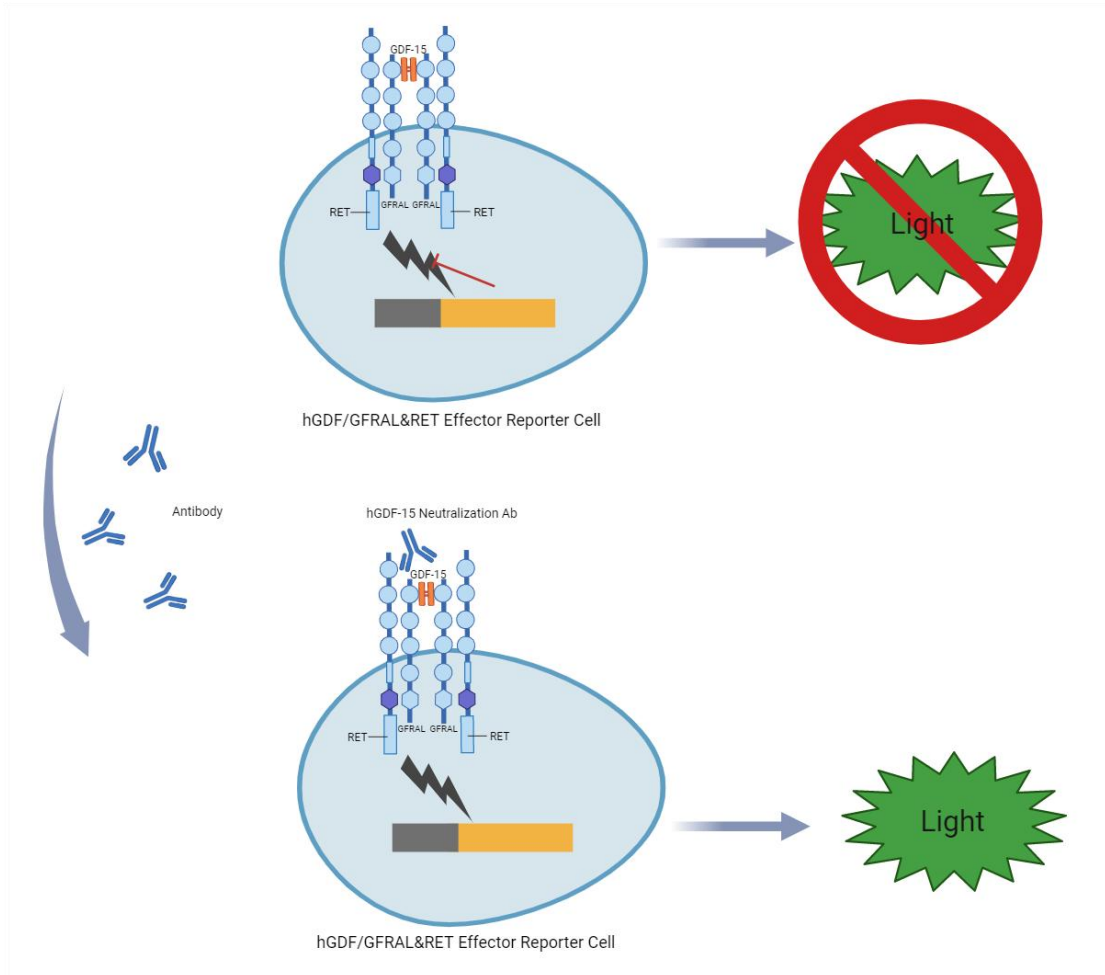


图3: hGDF/GFRAL&RET Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: hGDF/GFRAL&RET

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

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 悬浮

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 hGDF/GFRAL&RET 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
hGDF/GFRAL&RET Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74186M
Recombinant Human GDF-15	/	/
hGDF-15 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 hGDF/GFRAL&RET 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) 调整细胞密度到 $3-6 \times 10^5$ cells/ml, 加入 T25 培养瓶中, 放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中。

5.2 细胞传代

每 1-2 天取细胞悬液计数, 当密度大于 1×10^6 cells/ml 时, 请及时传代或补加新鲜完全培

培养基. 保持细胞密度在 1×10^5 - 1×10^6 cells/ml 之间。

5.3 细胞冻存

取 $4-8 \times 10^6$ 细胞离心后弃上清。加 1ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO), 吹打均匀, 加入细胞冻存管。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 Human GDF-15 Stimulation Assay

Human GDF-15 Stimulation Assay 由报告细胞 hGDF/GFRAL&RET Effector Reporter Cell, Cat.#CBP74186 开展, 本实验中使用 Recombinant Human GDF-15 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 hGDF/GFRAL&RET Effector Reporter Cell 细胞离心去上清, 重悬于新鲜 RPMI-1640+10%FBS 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 RPMI-1640+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 hGDF-15 Inhibition Assay

hGDF-15 Inhibition Assay 由报告细胞 hGDF/GFRAL&RET Effector Reporter Cell，Cat. #CBP74186 开展，本实验中使用 hGDF-15 Neutralizing Antibody 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。实验流程可参考 6.1 的操作规程。

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 GDF-15 in hGDF/GFRAL&RET Effector Reporter Cells (C1)

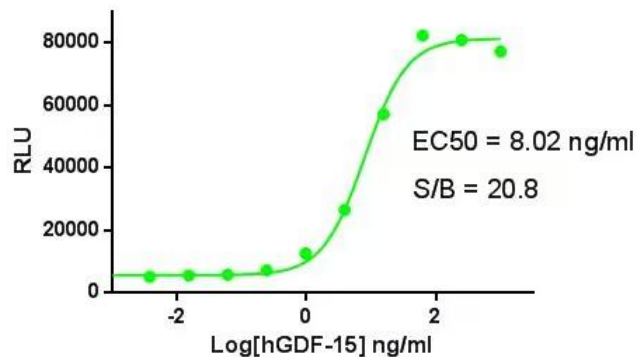


图 5： Human GDF-15 Stimulation Assay 验证结果

Inhibition of hGDF-15-induced Reporter Activity by hGDF-15 Neutralization Ab in GDF-15/hGFRAL&Ret Effector Reporter Cells (Clone1)

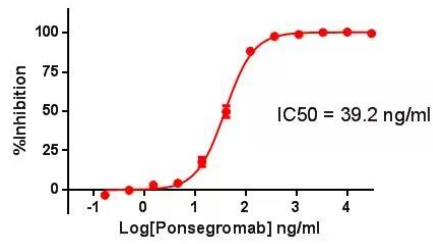


图 6: hGDF-15 Inhibition Assay 验证结果

8. 相关产品

名称	货号
hGDF/GFRAL&RET Effector Reporter Cell	CBP74186