

hGM-CSF Effector Reporter Cell

CBP74149

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 hGM-CSF Stimulation Assay	4
6.2 hGM-CSF Inhibition Assay	4
7. 数据展示	6
8. 相关产品	7

1. 背景信息

GM-CSF (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor)是一种分泌型细胞因子，由多种细胞表达，如粒细胞、树突细胞、T细胞、B细胞等等。GM-CSF受体则表达于髓系细胞如粒细胞和巨噬细胞等，由 α 、 β 两条链组成。GM-CSF与受体结合形成十二聚体复合物，激活下游 JAK-STAT、PI3K、NF κ B 通路。GM-CSF有广泛的生理功能，主要促进粒细胞和巨噬细胞的生成、分化、激活、存活等，是肺泡中的一个关键稳态因子，低水平情况下，用于肺泡巨噬细胞的发育和长期维持，GM-CSF缺失的情况下，产生肺泡蛋白病(PAP)，同时肺部巨噬细胞功能缺陷，增加肺部感染几率。GM-CSF在免疫应答中的作用主要是两类：A.将成熟的髓系细胞极化为促炎表型；B.将祖细胞分化为髓系细胞，扩增和动员到炎症部位。

2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 hGM-CSF 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 GM-CSF。

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。

hGM-CSF Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 hGM-CSF 的信号转导过程，原理见图 1 所示。

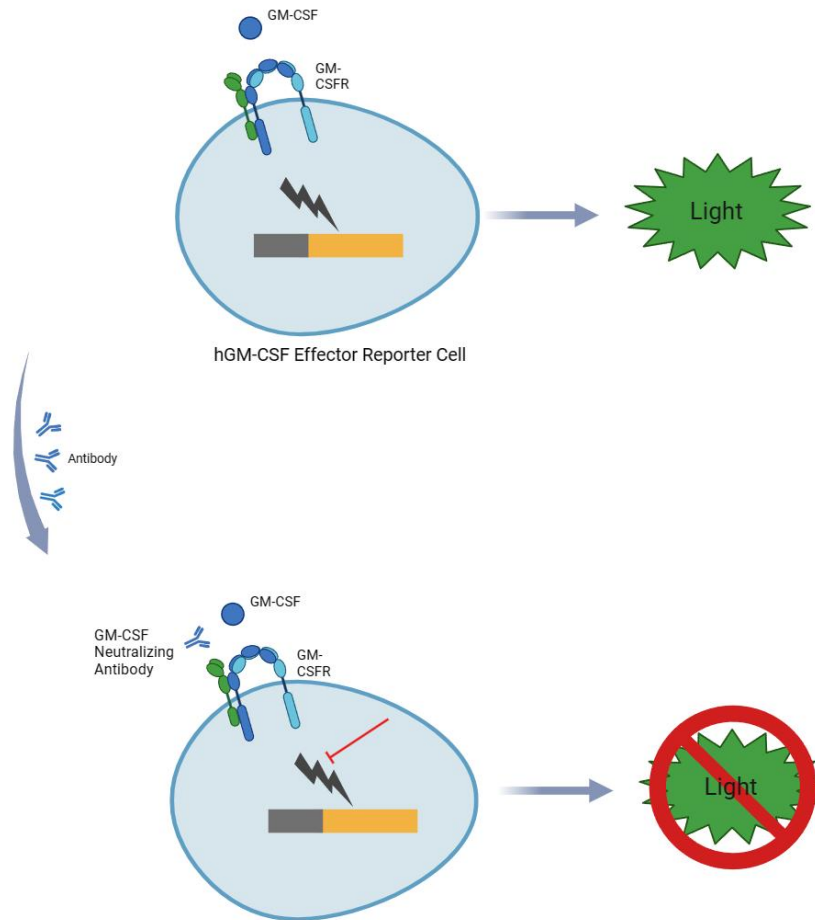


图 1: hGM-CSF Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: hGM-CSF

传代培养基: RPMI-1640+10% FBS+100ug/ml hygromycin+2 ng/ml GM-CSF

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 hGM-CSF 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
hGM-CSF Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74149M
Recombinant hGM-CSF	/	/
hGM-CSF 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 hGM-CSF 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养基. 保持细胞密度在 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 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

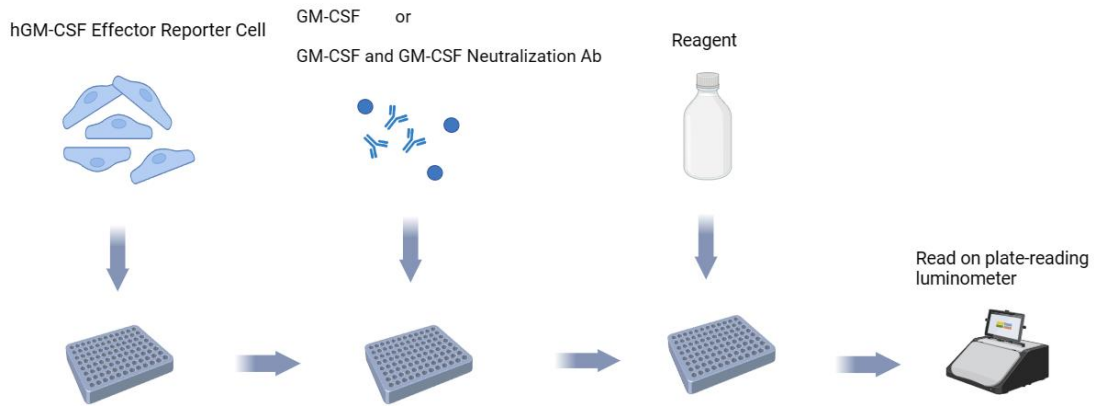


图 2:hGM-CSF Stimulation Assay 流程示意图

6.1 hGM-CSF Stimulation Assay

hGM-CSF Stimulation Assay 由报告细胞 hGM-CSF Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74149 开展, 本实验中使用 Recombinant hGM-CSF 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 hGM-CSF Effector Reporter Cell 细胞离心去上清, 用 DPBS 洗两次, 然后离心去上清, 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) 然后, 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 hGM-CSF Inhibition Assay

hGM-CSF Stimulation Assay 由报告细胞 hGM-CSF Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74149 开展, 本实验中使用 hGM-CSF 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 hGM-CSF Effector Reporter Cell 细胞离心去上清, 用 DPBS 洗两次, 然后离心去上清, 重悬于新鲜 RPMI+10%FBS 培养基中, 细胞密度调整为 6.25×10^5 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) 然后, 用 RPMI+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 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 RPMI+10%FBS 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 GM-CSF 的阻断抗体, 建议加入样品后马上加入配体刺激; 对于 GM-CSF 受体的阻断抗体, 建议加入抗体后, 让抗体与细胞孵育 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 3:96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

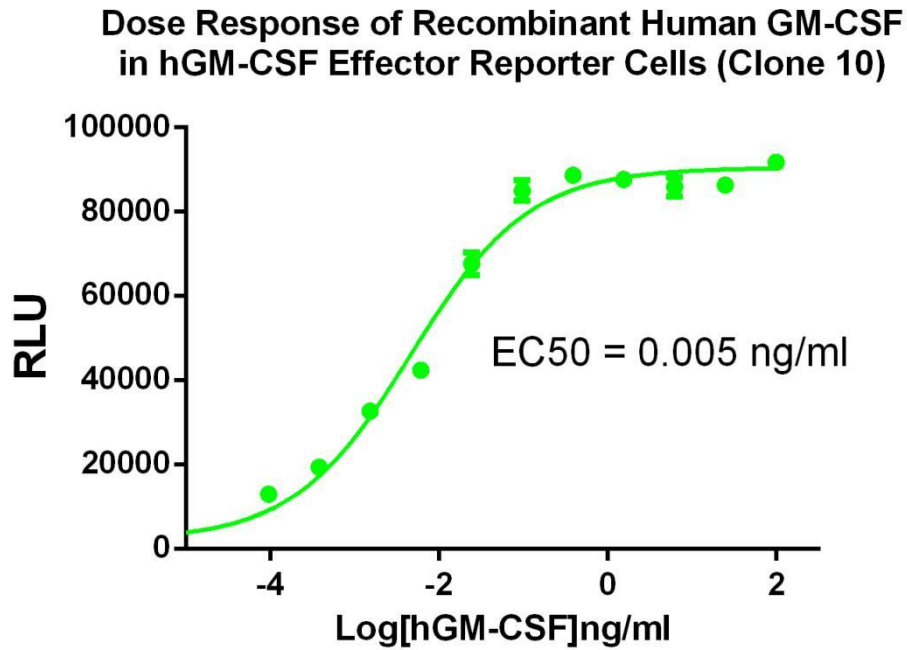


图 4: hGM-CSF Stimulation Assay 验证结果

Inhibition of hGM-CSF-induced Reporter Activity by hGM-CSF Neutralizing Antibody
in hGM-CSF Effector Reporter Cells (Clone10)

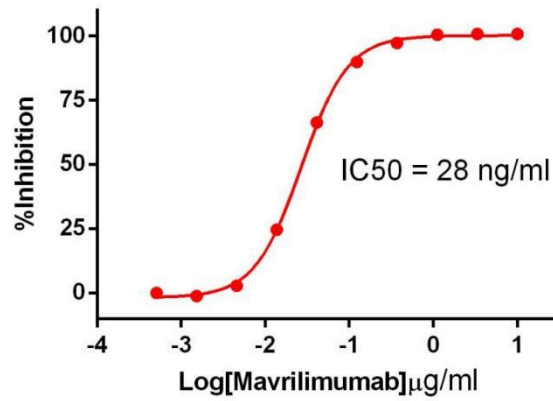


图 5: hGM-CSF Inhibition Assay 验证结果

8. 相关产品

N/A