

Membrane Anchored TNF α Cell (Suspended) CBP74153 操作说明书



4008-750-250

目录

1. 背景信息	2
2. 产品介绍	2
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 ADCC Bioassay	5
7. 数据展示	6
8. 相关产品	7

1. 背景信息

抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用（ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）是指抗体的 Fab 段结合病毒感染的细胞或肿瘤细胞的抗原表位，其 Fc 段与杀伤细胞（NK 细胞、巨噬细胞等）表面的 FcR 结合，介导杀伤细胞直接杀伤靶细胞，它是抗肿瘤的治疗性抗体药物发生作用的一种作用重要机制。

传统用于测定 ADCC/ADCP 的方法主要依赖于相关原代免疫细胞的分离、体外分化，进而测量靶细胞的杀伤或吞噬效应。这些方法高度依赖供体原代细胞，价格昂贵且费时费力，对原代细胞的分离分化过程对实验操作的要求非常高，实验失败风险较大，由于分离分化细胞纯度问题，还存在检测信号低以及不稳定均一的问题。另外因为原代细胞具有不可再生性，每次实验的细胞供体来源可能都不一致，实验结果可重复性较差，可能存在批次差异。由于以上这些因素的影响，在需要高质量控制的药物开发过程中，很难建立稳定可靠的检测方法。

2. 产品介绍

科佰生物推出 Membrane Anchored TNF α Cell (Suspended)报告基因细胞，稳定表达人 TNF α ，见图 1 流式验证 TNF α 表达。

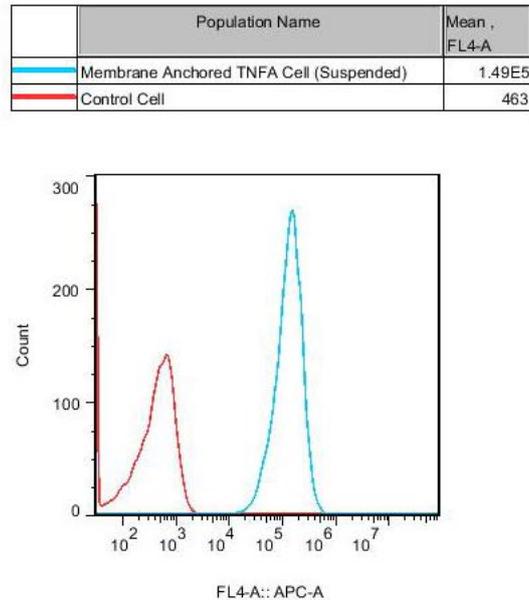


图 1: Membrane Anchored TNF α Cell (Suspended)细胞稳定表达人 TNF α

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。

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

Signaling events upon antibody-dependent cellular cytotoxicity

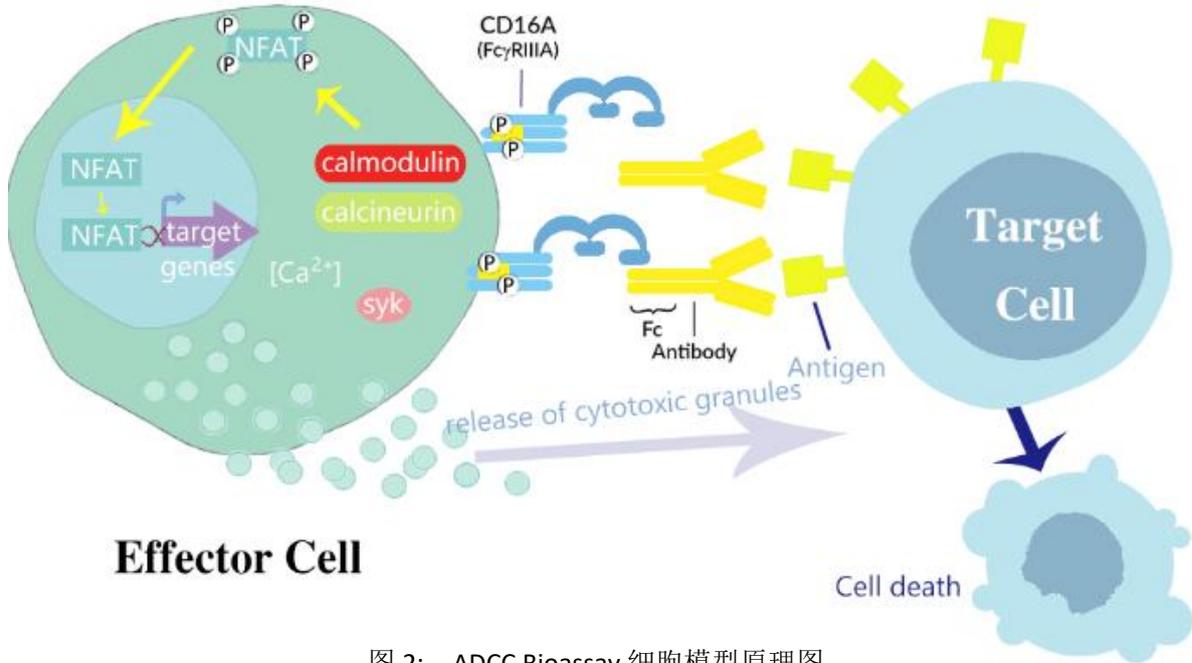


图 2： ADCC Bioassay 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: TNF α

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+1ug/ml puromycin

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 ADCC 信号传导的激活剂或抑制剂的活性检测，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
Membrane Anchored TNF α Cell (Suspended) 完全培养基	Cobioer	CBP74153M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
ADCC Bioassay Effector Cell V variant (High Affinity)- Fc γ -NFAT/Jurkat 细胞	Cobioer	CBP74003
Anti-TNF α mAb (Infliximab)	Abin vivo	B21631112
Anti-TNF α mAb (Adalimumab)	Abin vivo	B7426
Ultra Low IgG FBS	Gibco	1921005PJ
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 PDL1/aAPC/Raji 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

6.1 ADCC Bioassay

ADCC Bioassay 由报告细胞 ADCC Bioassay Effector Cell V variant (High Affinity)-Fc γ -NFAT/Jurkat, Cat. #CBP74002 细胞和靶细胞 Membrane Anchored TNF α Cell (Suspended), Cat. #CBP74153 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-TNF α mAb 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

- 1) 实验前一天取对数生长的 ADCC Bioassay Effector Cell V variant (High Affinity)- Fc γ -NFAT/Jurkat 细胞离心弃上清，重悬于含 10% Ultra Low IgG FBS 的 RPMI1640 培养基培养过夜。
- 2) 取对数生长的 Membrane Anchored TNF α Cell (Suspended)细胞离心弃上清，并用 DPBS 重悬洗涤一次，继续离心弃 DPBS,然后将细胞重悬于含 4% Ultra Low IgG FBS 的 RPMI1640 培养基中，将细胞密度调节至 $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ ，加入 96 孔板中，每孔 50 μl ，另外设置不加 Membrane Anchored TNF α Cell (Suspended) 细胞的培养基对照孔，每孔 50 μl 。
- 3) 用含 4% Ultra Low IgG FBS 的 RPMI1640 培养基对样品进行梯度稀释(稀释浓度及梯度可根据实验需要设置)上述梯度样品为 10^* 浓度样品，将稀释好的 10^* 梯度样品加入步骤 2 的空白中，每孔 11.1 μl ，加完样品的板子继续在 37 度细胞培养箱培养 1 小时。
- 4) 取步骤 1 中的 ADCC Bioassay Effector Cell F variant (Low Affinity)- Fc γ -NFAT/Jurkat 细胞离心弃上清，重悬于含 4% Ultra Low IgG FBS 的 RPMI1640 培养基中将重悬的细胞密度调整为 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ ，然后将细胞加入步骤 3 的 96 孔板中，每孔 50 μl ，放置 37 度培养箱中继续培养 5.5 到 6 小时。
- 5) 将 96 孔板从培养箱中取出，加入 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 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，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。
- 7) (备注：以上实验流程仅用于 TNF α 抗体的 ADCC 效应检测，若将 Membrane Anchored TNF α Cell (Suspended) 细胞用于其它检测应用，请根据待检测优化检测流程和条件)

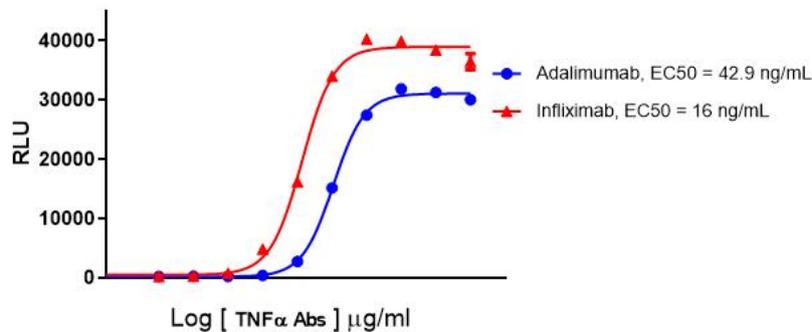
孔板排布：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer	
B	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
C	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
D	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
E	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
F	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
G	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
H	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer

图 3: 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

Dose response of TNF α Abs in ADCC Bioassay Effector Cell (High Affinity/NFAT-Jurkat cells) With Membrane Anchored TNF α Cells (Suspended, Clone 5)



Assay specifics: E:T ratio = 6:1; Membrane Anchored TNF α Cells (Suspended) As Target Cells

图 4: ADCC Bioassay 验证结果 (测试样本: Anti-TNF α mAb)

8. 相关产品

名称	货号
ADCC Bioassay Effector Cell F variant (High Affinity)- Fcγ-NFAT/Jurkat	CBP74002
ADCC Bioassay Effector Cell V variant (High Affinity)-Fcγ-NFAT/Jurkat	CBP74003
Membrane Anchored VEGF Cell	CBP74156
Membrane Anchored TNFα Cell (Suspended)	CBP74152
Membrane Anchored TNFα Cell (Suspended)	CBP74153
Membrane Anchored hRANKL Cell	CBP74160
Mouse ADCC Bioassay Effector Cell	CBP74076
ADCP Bioassay Effector Cell FcγRIa -NFAT/Jurkat	CBP74105
ADCP Bioassay Effector Cell FcγRIIa (H variant) -NFAT/Jurkat	CBP74106
ADCP Bioassay Effector Cell FcγRIIa (R variant) -NFAT/Jurkat	CBP74004
FCGR2A/HEK293	CBP74077
FCGR2B/HEK293	CBP74078
FCGR2A (FcγRIIa) /CHO	CBP74074
FCGR2B (FcγRIIb) /CHO	CBP74075
FCGR2B/TCR Activator/CHO	CBP74096
hFGFR2b Effector Reporter Cell	CBP74196
mouse FCGR2B/CHO	CBP74100
mouse FCGR2B/TCR Activator/CHO	CBP74101
NFAT-Luc/Jurkat	CBP74025