

# SRE-Luc/HEK293

## CBP74030

# 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 .....	1
4. 主要仪器试剂耗材 .....	2
5. 细胞培养 .....	2
5.1 细胞复苏 .....	2
5.2 细胞传代 .....	2
5.3 细胞冻存 .....	2
6. 细胞实验流程 .....	3
6.1 Bio Assay .....	3
7. 数据展示 .....	4
8. 相关产品 .....	5

## 1. 背景信息

hEGF 是由 53 个氨基酸组成的多肽，是类 EGF 大家族的一个成员，是一种多功能的表皮生长因子，是人体内固有的一种活性物质，广泛存在于人体皮肤细胞内的小分子蛋白。hEGF 是通过与其受体特异性结合发挥作用的。hEGF 与其受体结合后，引起受体二聚化，激活激酶而引起自身酪氨酸磷酸化，磷酸化后的酪氨酸为第二信使分子提供结合位点，从而激活一系列下游信号通路发挥生物学作用。比如激活 RTK-Ras-MAPK 信号通路可以促进蛋白质合成，促使细胞从 G1 期进入 S 期；PI3K/PKB 信号通路可以间接促进细胞生长，通过作用 Bad、Caspase 9 前体来阻断细胞凋亡，维持细胞生存，此外还参与细胞迁移以及膜泡转运等生命活动；PKC 信号通路可以促进细胞生长和分化，同时也可以参与神经发育和突触传递等生理过程；JAK-SATA 信号通路可以调控转录，同时各个信号通路之间还存在相互作用。

## 2. 产品介绍

科佰生物推出 SRE-Luc/HEK293 报告基因细胞，在由 SRE 调控并表达 Luc 荧光素酶报告基因的 HEK293 细胞 SRE-Luc/HEK293。

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。

## 3. 细胞基本信息

母细胞: HEK293

表达基因: SRE-Luciferase

传代培养基: DMEM +10%FBS+200ug/ml Hygromycin

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

## 4. 主要仪器试剂耗材

名称	品牌	货号
SRE-Luc/HEK293 完全培养基	Cobioer	CBP74030M
Animal-Free Recombinant Human EGF	PeptoTech	AF-100-15
Opti-MEM™ 减血清培养基	Gibco	51985-034
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
Ultra Luciferase Detection Kit	Cobioer	CBPH0001
Corning BioCoat Poly-D-Lysine Multiwell Plates 96-well	Corning	356651
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 SRE-Luc/HEK293 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% CO<sub>2</sub> 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

### 6.1 Bio Assay

#### 配体刺激实验:

- 1) 消化对数生长的细胞,将消化下来的细胞离心去上清,重悬于 DPBS 洗涤一次,再次离心弃上清,Opti-MEM+0.5%FBS+NEAA+Nap 培养基中,细胞密度调整为  $3 \times 10^5$  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(Corning,356651)中,100ul/孔细胞悬液,37°C 培养箱过夜培养。
- 3) 第二天,用,Opti-MEM+0.5%FBS+NEAA+Nap 培养基对 EGF 进行梯度稀释,样品从最高浓度开始,3 倍稀释 11 个浓度梯度,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,每个浓度设置双复孔或三复孔(备注:不同的配体类型或厂家,批次来源不同可能导致活性有差异,需根据实际情况优化设定样品浓度,稀释倍数,浓度梯度,复孔数等),并设置 0 浓度对照,继续在 37°C 细胞培养箱培养 5.5 到 6 小时。
- 4) 将 96 孔板从培养箱中取出,加入 100 ul/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。

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	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 1: 96 孔板排布建议案例展示

## 7. 数据展示

**Dose Response of Recombinant Human EGF in SRE/Luc HEK293 Cells (C5C16)**

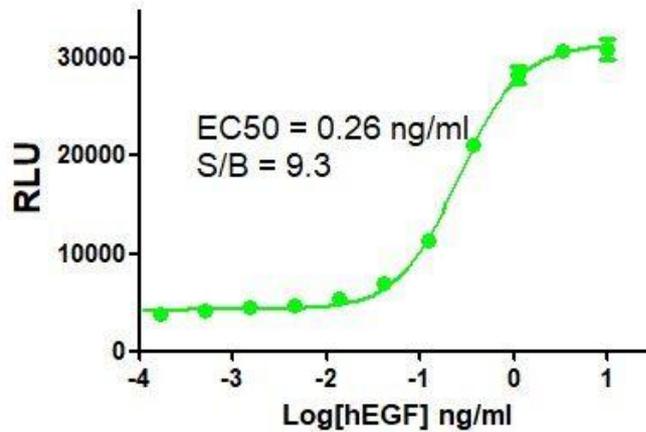


图 2: Bio Assay 验证结果

## 8. 相关产品

名称	货号
CSF1R/SRE-Luc/HEK293	CBP74010
SRE-Luc/HEK293	CBP74030
KLB/SRE-Luc/HEK293	CBP74209