

产品手册

H_CD40(TNFRSF5) Reporter 293 Cell Line

H_CD40(TNFRSF5) Reporter 293 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.2

目录

一、	产品基本信息及组分	3
二、	包装、运输及储存	3
三、	产品描述	4
四、	材料准备	5
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备	5
2.	试剂耗材准备	5
五、	细胞复苏、传代、冻存	6
1.	细胞复苏	6
2.	细胞传代（以 10 cm 皿为例）	6
3.	细胞冻存	6
六、	使用方法（示例）	7
1.	激活剂验证实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	8
	使用许可协议:	9

一、 产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-C03829	H_CD40(TNFRSF5) Reporter 293 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C03829	H_CD40(TNFRSF5) Reporter 293 Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C

二、 包装、运输及储存

1. 细胞系产品干冰运输，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
2. 接触产品请带手套。请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
3. 本产品相关 Assay，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

三、 产品描述

分化簇 40 (Cluster of differentiation 40, 简称 CD40), 是一种分布于抗原呈递细胞 (APC) 的协同刺激因子暨蛋白受体。CD40 与辅助 T 细胞上的 CD154 (CD40L) 结合后, 抗原呈递细胞激活, 产生一系列下游反应。CD40 与 Act1 和 TRAF6 分别结合后, 激活下游报告基因信号。

吉满生物 H_CD40(TNFRSF5) Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系。当 CD40 与 Act1 和 TRAF6 分别结合后, 激活下游报告基因, 从而激活荧光素酶 (Luciferase) 的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果, 因此可用于 CD40 相关药物的体外效果评价。

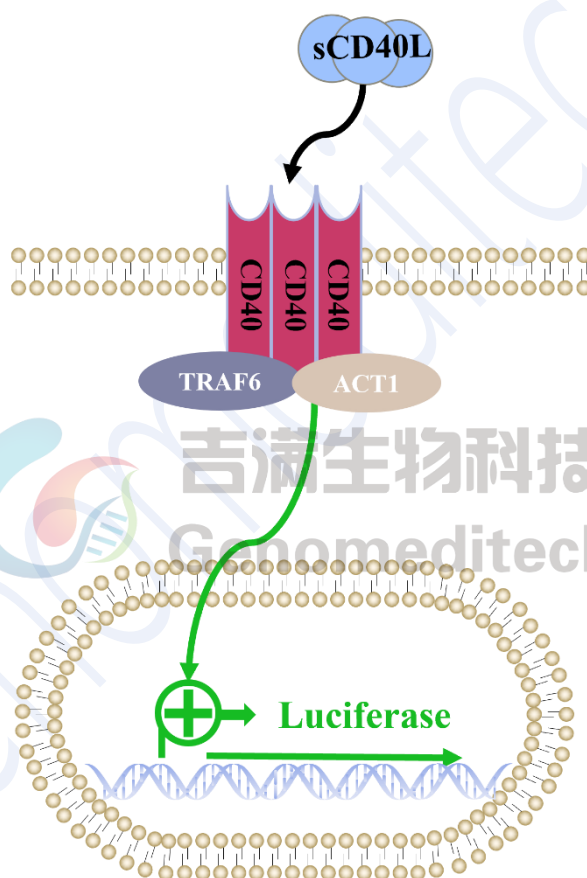


Fig 1.原理示意图

四、 材料准备

1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

细胞复苏培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S+3 µg/mL Blasticidin+1.5 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	DMEM+1% FBS+1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
DMEM	500 mL	gibco/C11995500BT
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Human CD40L Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-84919RP
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	/	Genomeditech/GM-040513

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

五、细胞复苏、传代、冻存

1. 细胞复苏

- 37°C水浴锅预热复苏培养基，加入预热后的复苏培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37°C恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下轻轻摇动解冻，直到刚刚融化（通常 2-3 分钟）。
- 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀， $176 \times g$ ，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 复苏培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞活细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补充复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $3-4 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中。

3. 细胞冻存

- 使用 $176 \times g$ ，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中，-80°C下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

2. 细胞传代（以 10 cm 皿为例）

注：细胞复苏后的 1 至 2 代，使用复苏培养基，待细胞状态稳定后，再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 细胞为上皮细胞，贴壁生长。
- 培养箱中孵育 16-24 h 后，镜下观察细胞贴壁情况，当细胞密度大于 80%，即可进行细胞传代。两次传代后复苏培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 天传代。
- 将皿或培养瓶中的培养液弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液，37°C 消化 30-60 s，显微镜下观察。
- 待细胞变圆，细胞间隙明显，部分细胞刚开始脱离瓶壁时，加 2 mL 左右生长培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来， $176 \times g$ 室温离心 3 min。
- 弃上清，细胞沉淀用生长培养基重悬，根据传代前细胞密度分盘（根据培养皿面积和细胞密度计算，传代后细胞密度为 30-40%）。

注意事项：

- 细胞刚复苏时，死细胞较多，贴壁不明显属于正常情况，2-3 天可以恢复贴壁，传代 2-3 次后贴壁细胞比例升高，细胞正常展开。
- 每次传代后会有 5-10%死细胞，但随着代次升高，细胞恢复速度变快，死细胞比例降低，细胞生长速度会趋于稳定。
- 细胞复苏后及每次观察时建议保留细胞照片，可用于辅助判断细胞状态，在出现异常时及时与吉满销售沟通。
- FBS 血清需 56°C 加热 30 分钟，可灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

六、 使用方法（示例）

1. 激活剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_CD40(TNFRSF5) Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Human CD40L Protein; His Tag（以下简称：CD40L Protein; 16.8 kDa）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围孔加入 $100 \mu\text{L}$ PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	CD40L Protein	PBS	2.00 $\mu\text{g/mL}$	666.67 ng/mL	222.22 ng/mL	74.07 ng/mL	24.69 ng/mL	8.23 ng/mL	2.74 ng/mL	914.49 pg/mL	304.83 pg/mL	0	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 在实验前 16-24 h，将细胞从培养瓶中取出，消化离心收集细胞沉淀，使用适量完全培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以完全培养基调整细胞浓度为 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上班盖，于孵箱中孵育过夜使用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
CD40L Protein	2.5 mg/mL	0.25 mg/mL	取 $2 \mu\text{L}$ 储液 + $18 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 $180 \mu\text{L}$ Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 $120 \mu\text{L}$ Assay Buffer。

- f) 吸取不同体积的待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2 中加入 1.45 μL CD40L Protein），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 60 μL ，加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.45 μL CD40L Protein	加入	180 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 60 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。
- j) 加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100 μL 。
- k) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- l) 使用报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CD40(TNFRSF5) Reporter	0 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	304.83 $\mu\text{g/mL}$
293 Cell Line	220991	10910480	229876

3) 验证结果

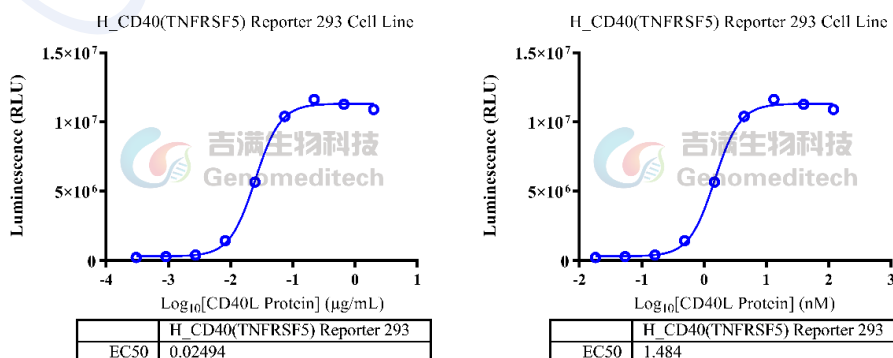


Fig 2. 激活验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

使用许可协议：

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策：

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。