

## 产品手册

### H\_CCR4 Reporter 293 Cell Line

### H\_CCR4 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：V2.8.1

## 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.	H_CCR4 Reporter 293 Cell Line 细胞复苏.....	6
2.	H_CCR4 Reporter 293 Cell Line 细胞传代.....	6
3.	H_CCR4 Reporter 293 Cell Line 细胞冻存.....	7
六、	使用方法.....	8
1.	激活剂验证实验.....	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	10
	使用许可协议: .....	11

## 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-C05129	H_CCR4 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-C05129	H_CCR4 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

CCR4 代表 CC 趋化因子受体 4 型 (CCR4)，也称为 CD194，属于 G 蛋白偶联受体家族。CCR4 由具有 7 个亚跨膜结构域的多肽链组成。它含有 360 个氨基酸，分子量为 41kD。CCR4 主要在各种淋巴细胞和组织中表达。作为一种重要的趋化因子受体，CCR4 与趋化因子配体结合并在人类自身免疫性疾病中发挥作用。

吉满生物 H\_CCR4 Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系，是稳定表达 CCR4 以及 luciferase 的细胞系。当趋化因子与细胞表面表达的 CCR4 相互作用，作为与 G 蛋白偶联的 7 跨膜蛋白，在配体结合后传递细胞信号。趋化因子受体激活 G 蛋白会触发细胞内储存的钙释放，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 CCR4 相关药物的体外效果评价。

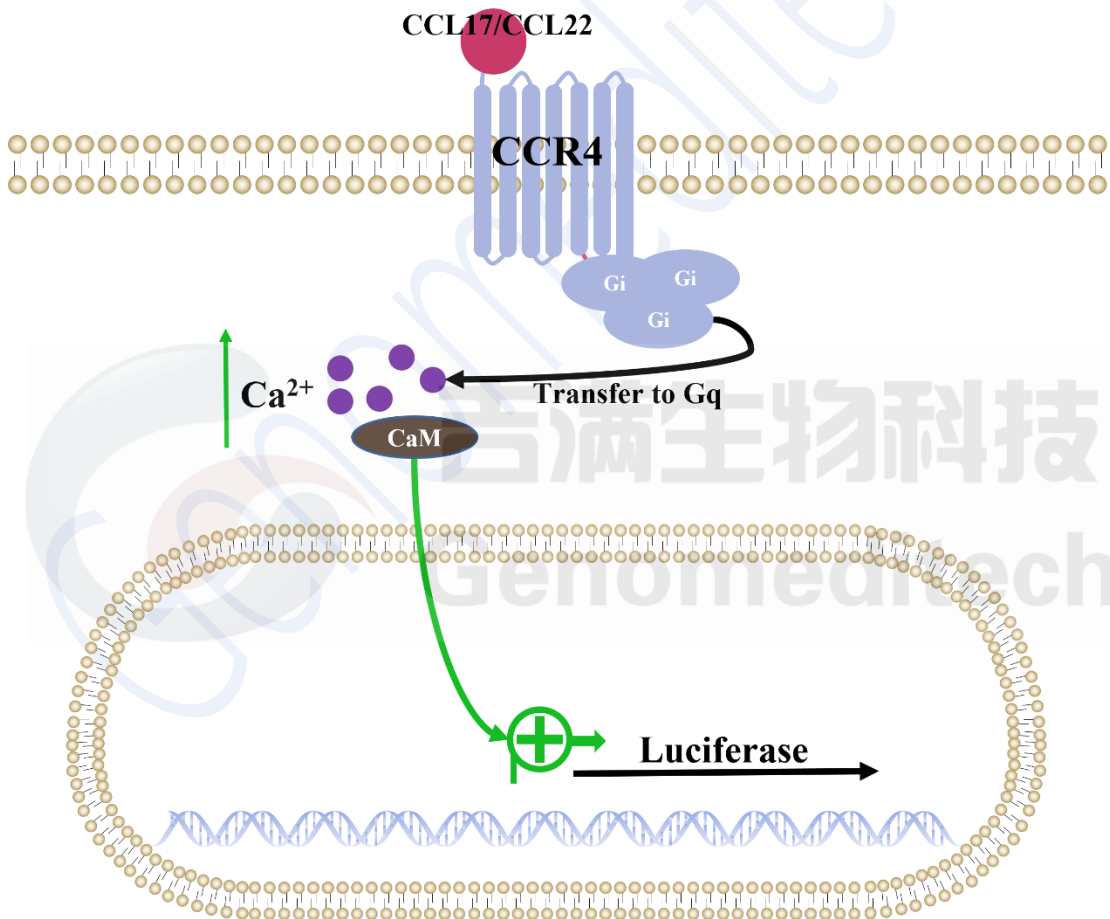


Fig 1.原理示意图

## 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+4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin+400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418+0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
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
Cell Culture Dish	10 cm	NEST/704001
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	50 mL	Promega/E6120
Recombinant Human CCL22/MDC Protein	25 $\mu\text{g}$	R&D SYSTEMS/336-MD-025/CF
Recombinant Human TARC (CCL17)	/	PEPROTECH/300-30

#### 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. H\_CCR4 Reporter 293 Cell Line 细胞复苏

- 细胞冻存密度为  $5 \times 10^6$  cells/mL，冻存管分装 1 mL。
- 在 37°C 水浴锅预热培养基，加入预热完全培养基 5 mL 到 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存的细胞并迅速放入 37°C 恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。
- 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预先加有预热好的 15 mL 离心管中，轻轻混匀，800 rpm，离心 5 min 使细胞沉淀，弃上清。
- 冻存细胞离心后收集沉淀，使用 1 mL 完全培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞。
- 调整活细胞密度到  $2-3 \times 10^5$  cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中，参考体系：10 cm 皿（8-10 mL 悬液）；6 cm 皿/T25 瓶（5 mL 悬液）。后续细胞传代可根据培养皿中细胞聚合度调整。

### 2. H\_CCR4 Reporter 293 Cell Line 细胞传代

- 放入 37°C 恒温培养箱中孵育 24 h，镜下观察细胞贴壁情况。若贴壁率小于 50%，延长观察时间，当细胞密度大于 80%，即可进行细胞传代；若贴壁率大于 80%，可直接进行细胞传代。两次传代后细胞培养基可调整为添加抗生素的完全培养基。
- 细胞消化液：0.25% Trypsin-EDTA，消化时间为：30-60 s。
- 将皿或培养瓶中的培养液用移液管或吸管弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- 弃 PBS，加 1 mL 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。
- 加 2 mL 左右完全培养液混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，800 rpm 室温离心 5 min。
- 弃上清，细胞沉淀用完全培养液重悬，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%）。

---

	培养基	面积	接种细胞量	汇合度 100%	传代细胞量
35mm Dish	2 mL	9.6 cm <sup>2</sup>	0.3 × 10 <sup>6</sup>	7 × 10 <sup>5</sup>	6 × 10 <sup>5</sup>
60 mm Dish	5 mL	28 cm <sup>2</sup>	0.8 × 10 <sup>6</sup>	2 × 10 <sup>6</sup>	1.7 × 10 <sup>6</sup>
100 mm Dish	10 mL	78 cm <sup>2</sup>	2.2 × 10 <sup>6</sup>	5.6 × 10 <sup>6</sup>	4.8 × 10 <sup>6</sup>
T-25 Flask	5 mL	25 cm <sup>2</sup>	0.7 × 10 <sup>6</sup>	1.8 × 10 <sup>6</sup>	1.5 × 10 <sup>6</sup>
T-75 Flask	10 mL	75 cm <sup>2</sup>	2.1 × 10 <sup>6</sup>	5.4 × 10 <sup>6</sup>	4.6 × 10 <sup>6</sup>

---

### 3. H\_CCR4 Reporter 293 Cell Line 细胞冻存

- 细胞冻存液：90% FBS+10% DMSO。
- 使用 1000 rpm，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液重悬细胞，细胞密度调整为 5 × 10<sup>6</sup> cells/mL。
- 每管 1 mL 分装到细胞冻存管中，冻存体积为 1 mL，冻存密度为 5 × 10<sup>6</sup> cells/mL。

拧紧盖子，适当标记后，将细胞冻存管置于梯度降温盒中，在-80°C下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

## 六、 使用方法

### 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\_CCR4 Reporter 293 Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  Cells/孔。使用两种激活剂：Recombinant Human TARC (CCL17)(8 kDa)（以下简称为 Human CCL17 Protein）起始终浓度(Conc.1)为  $1 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.1-Conc.9 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照；Recombinant Human CCL22/MDC Protein(8 kDa)（以下简称为 Human CCL22 Protein）起始终浓度(Conc.1)为  $1 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.1-Conc.9 分别排布在 C2-C10，C11 为 0 浓度对照。周围为  $100 \mu\text{L}$  PBS，以防止边孔蒸发。

孔板布局：

	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	PBS	1 $\mu\text{g/ml}$	333.33 $\text{ng/ml}$	111.11 $\text{ng/ml}$	37.04 $\text{ng/ml}$	12.35 $\text{ng/ml}$	4.12 $\text{ng/ml}$	1.37 $\text{ng/ml}$	457.25 $\text{pg/ml}$	152.42 $\text{pg/ml}$	0	PBS
C	PBS	1 $\mu\text{g/ml}$	333.33 $\text{ng/ml}$	111.11 $\text{ng/ml}$	37.04 $\text{ng/ml}$	12.35 $\text{ng/ml}$	4.12 $\text{ng/ml}$	1.37 $\text{ng/ml}$	457.25 $\text{pg/ml}$	152.42 $\text{pg/ml}$	0	PBS
D	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E												
F												
G												
H												

#### 1) 加样步骤

- 以 Human CCL17 Protein 为例描述加样步骤，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  $1.5 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加  $100 \mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔。周围的孔加  $100 \mu\text{L}$  PBS。盖板上盖，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-B11）。



## d) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human CCL17 Protein	100 µg/mL	/	直接使用储液
Human CCL22 Protein	100 µg/mL	/	直接使用储液

e) 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 163.4 µL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 110 µL 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 1.65 µL Human CCL17 Protein），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 55 µL，加入次孔										对照组	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1.65 µL Human CCL17 Protein 加入	163.4 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	
1.65 µL Human CCL22 Protein 加入	163.4 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	

g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 55 µL，加入到第 2 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，每孔吸弃 100 µL 培养基。

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 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16 h。

l) 使用 ONE-Glo™ Luciferase Assay System，检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CCR4 Reporter 293 Cell Line+Human CCL17 Protein	PBS Control	1 $\mu\text{g/mL}$	152.42 $\text{pg/mL}$
	6419	31463	6565
H_CCR4 Reporter 293 Cell Line+ Human CCL22 Protein	PBS Control	1 $\mu\text{g/mL}$	152.42 $\text{pg/mL}$
	7312	41550	6845

## 3) 验证结果

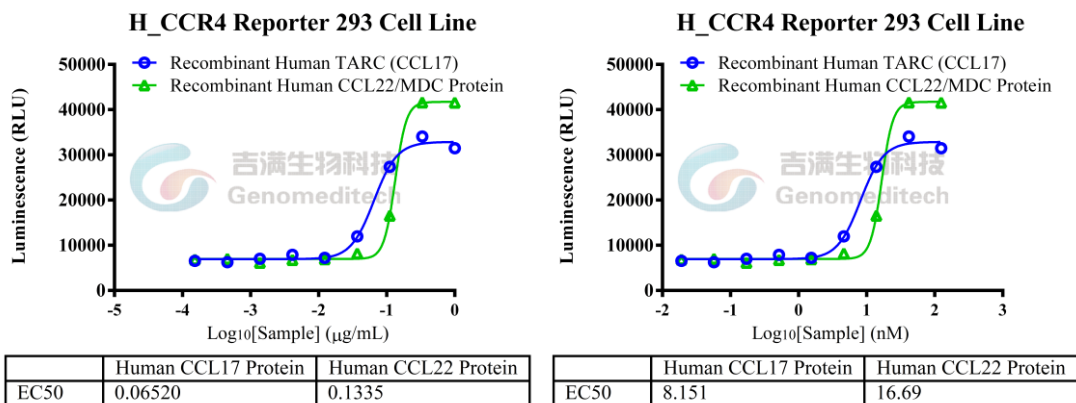


Fig 2. 激活验证结果

(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:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech