

产品手册

Tango-H_CXCR6 CHO-K1 Cell Line

Tango-H_CXCR6 CHO-K1 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.	Tango-H_CXCR6 CHO-K1 Cell Line 细胞复苏.....	6
2.	Tango-H_CXCR6 CHO-K1 Cell Line 细胞传代.....	6
3.	Tango-H_CXCR6 CHO-K1 Cell Line 细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	7
1.	药物激活验证实验.....	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-C14346	Tango-H_CXCR6 CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C14346	Tango-H_CXCR6 CHO-K1 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

G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 家族是人类中最庞大的膜蛋白家族,也是很多药物的重要靶点, GPCR 家族中有 800 多个成员,其中近 400 个可以考虑作为药物靶标。靶向 GPCR 的药物占有 FDA 批准药物的 34%,主要适应症为高血压、糖尿病、肥胖、过敏和阿尔茨海默病,以及几种中枢神经系统疾病。

GPCR 激活包括两类信号通路, G 蛋白依赖的信号通路和非 G 蛋白依赖的信号通路。G 蛋白依赖的信号通路中, GPCR 与胞内 G 蛋白 (Gi/Go、Gs、Gq 和 G12/G13) 偶联,其信号的激活和抑制,可以通过检测 GPCR 介导的第二信使如钙流、环腺苷酸(cAMP)等。非 G 蛋白依赖的信号通路,核心为 GPCR 诱导 β -arrestin 易位,这一过程独立于 G 蛋白受体信号,也可用于孤儿受体,可以通过 β -arrestin 检测非 G 蛋白依赖的信号通路激活。

CXCL16 是 CXCR6 的配体,作用于调控癌症转移和侵袭。CXCL16 和 CXCR6 可能标记在炎症环境中出现的癌症,并通过对癌细胞生长的直接影响和通过诱导肿瘤相关白细胞的迁移和增殖来介导炎症的促肿瘤发生作用。

Tango-H_CXCR6 CHO-K1 Cell Line 细胞系以 CHO-K1 为工具细胞,采用慢病毒感染的方式,依靠 Tango 技术构建 Tango CXCR6 报告基因的细胞系,当 CXCL16 激活 CXCR6 Arrestin 通路时, Arrestin 携带蛋白酶切下转录激活元件,转录激活元件移位到细胞核中,激活荧光素酶报告基因, Luciferase 报告基因读值即代表信号通路的激活效果,因此可用于靶向 CXCL16/CXCR6 功能性抗体的活性检测。

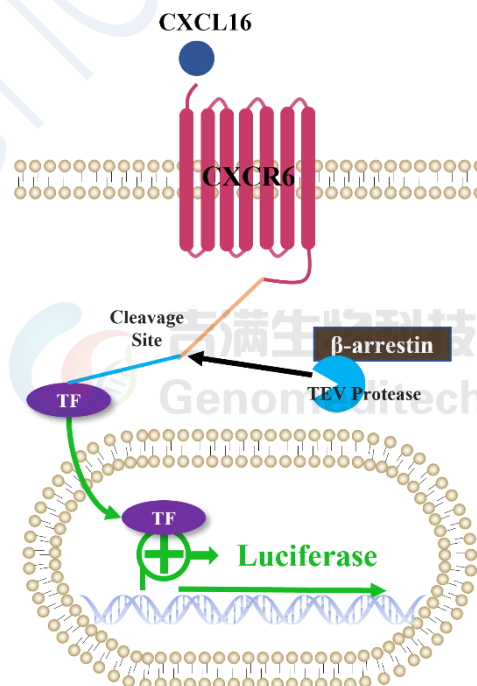


Fig 1. 原理示意图

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:	F12K+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	F12K+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin+100 µg/mL Hygromycin+4 µg/mL Puromycin
细胞冻存培养基:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	F12K+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
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
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	96-well	Corning/3912
Not Treated Microplate		
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C
Human CXCL16 / SR-PSOX Protein (His Tag)	/	Sino Biological/10834-H08H

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. Tango-H_CXCR6 CHO-K1 Cell Line 细胞复苏

- 37°C水浴锅预热培养基，加入预热后的完全培养基 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步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀，1000 rpm，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 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，活细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补加完全培养基的形式，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。

2. Tango-H_CXCR6 CHO-K1 Cell Line 细胞传代

- 当细胞密度大于 60%时，即可进行传代。推荐细胞传代比例为 1:4-1:5，2-3 天传代传代。
- 将皿或培养瓶中的培养基弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液润洗一遍，吸弃，再次吸取 1 mL 消化液，37°C 消化 2-3 min，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 左右完全培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，1000 rpm 室温离心 3 min。
- 弃上清，细胞沉淀用完全培养基重悬，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 20-30%）。

3. Tango-H_CXCR6 CHO-K1 Cell Line 细胞冻存

- 使用 1000 rpm，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。

六、使用方法

1. 药物激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 Tango-H_CXCR6 CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Human CXCL16 / SR-PSOX Protein (His Tag)（以下简称 hCXCL16; 20.5 kDa）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ ，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 μL 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	hCXCL16	PBS	15 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	1.67 $\mu\text{g/mL}$	555.56 ng/mL	185.19 ng/mL	61.73 ng/mL	20.58 ng/mL	6.86 ng/mL	2.29 ng/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 1×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上市盖，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
hCXCL16	0.2 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 152.6 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 12.4 μL hCXCL16），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 55 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	12.4 μL hCXCL16	加入	152.6 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 12.4 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，每孔吸弃 90 μL 培养基。
- j) 加入步骤 h 准备好的梯度稀释液，每孔 100 μL。
- k) 盖上班盖，于 37 °C CO₂ 培养箱中培养 16 h。
- l) 使用 GMOne-step 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。

Tango-H_CXCR6 CHO-K1 Cell Line	0	15 μg/mL	2.29 ng/mL
	597245	3199279	694463

3) 验证结果

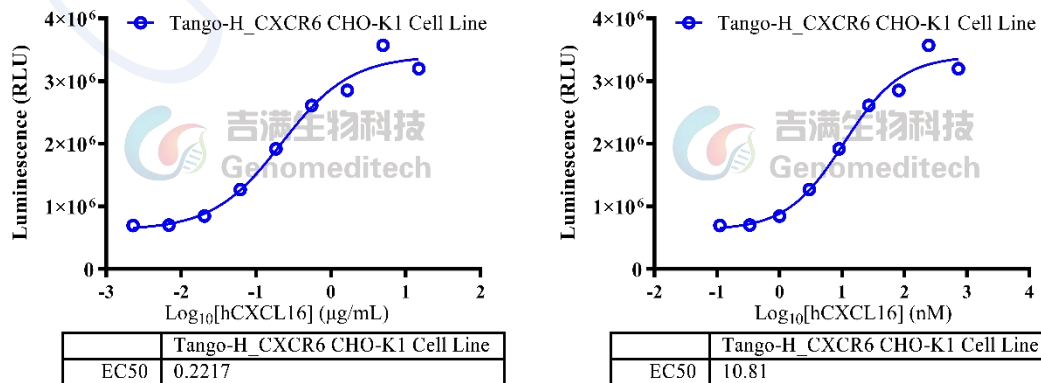


Fig 2. hCXCL16 激活验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

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