

产品手册

RANK Reporter 293 Cell Line

RANK 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：V2.9.240524

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.....	6
3.	细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	7
1.	激活验证实验——Human RANKL Protein.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	抗体阻断实验——Anti-RANKL.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	11
3)	验证结果.....	11
附录 1	稳定性验证.....	12
使用许可协议:	13

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-C19909	RANK 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-C19909	RANK 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

核因子 κ B 受体激活剂(RANK), 也称为 TRANCE 受体或 TNFRSF11A, 是肿瘤坏死因子受体(TNFR) 分子亚家族的成员。核因子 κ B 配体受体激活剂(RANKL), 也称为肿瘤坏死因子配体超家族成员 11 (TNFSF11)、TNF 相关激活诱导细胞因子(TRANCE)、骨保护素配体(OPGL) 和破骨细胞分化因子(ODF)), 是人类中由 TNFSF11 基因编码的蛋白质。RANK 在骨骼肌、胸腺、肝脏、结肠、小肠、肾上腺、破骨细胞、乳腺上皮细胞、前列腺、血管细胞和胰腺中组成型表达。

吉满生物 RANK Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系, 是基于 RANK/RANKL 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。该细胞稳定表达 RANK 基因及 Luciferase 报告基因, 通过添加 RANKL 蛋白, 可激活下游信号通路。通过添加阻断型抗体 Denosumab, 可以阻断 RANK 与 RANKL 的结合, 抑制下游信号。Luciferase 读值即代表信号通路的激活和阻断效果, 因此可用于 RANK 和 RANKL 相关抗体药物的体外效果评价。

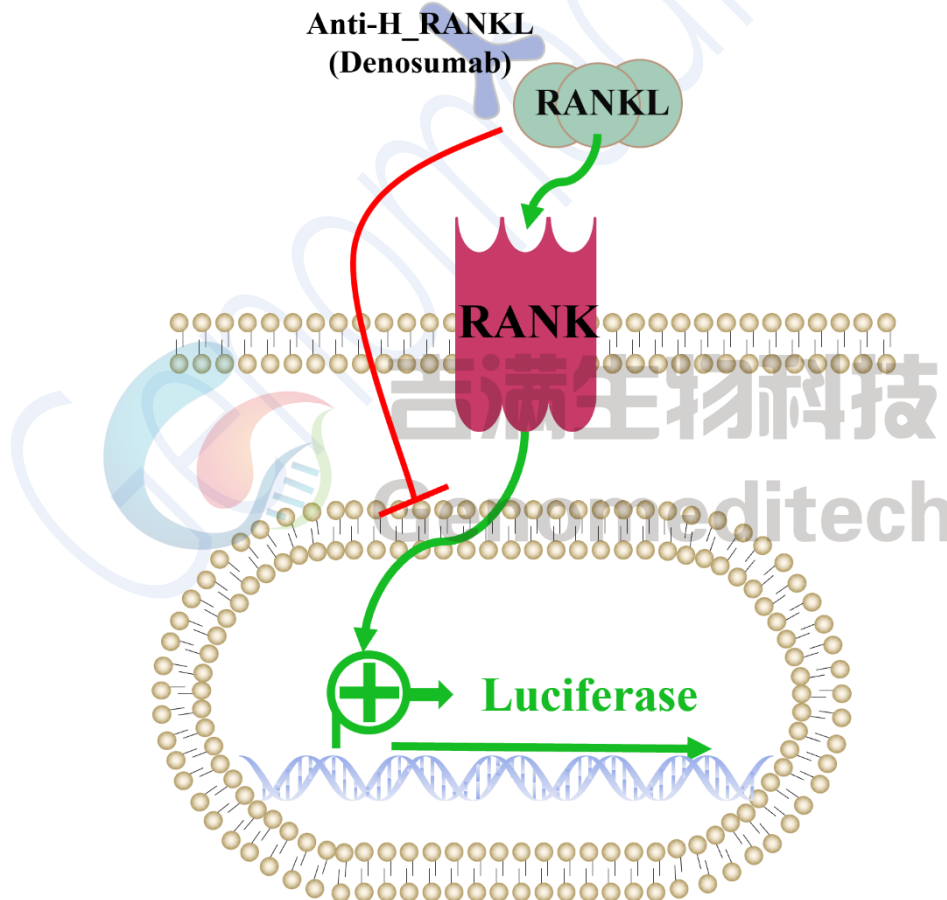


Fig 1. 产品细胞原理图

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 µg/mL Blasticidin+0.75 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(P.S)	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen/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
96 well White Flat Bottom Polystyrene	96-well	Corning/3912
Not Treated Microplate		
Human RANKL / OPGL / TNFSF11 / CD254 Protein	50 µg	Sino Biological/11682-HNCH
Anti-H_RANKL Antibody(Denosumab)	hIgG2 /	Genomeditech/GM-77688AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C

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。
- 通过补加复苏培养基的形式，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。

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

注：细胞复苏后的 1 至 2 代，使用复苏培养基，待细胞状态稳定后开始细胞维持和繁殖，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。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，死细胞较多，属于正常现象，经调整会有明显好转，状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定。

六、 使用方法

1. 激活验证实验——Human RANKL Protein

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 RANK Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Human RANKL / OPGL / TNFSF11 / CD254 Protein (20.5 kDa) (以下简称 Human RANKL) 作为阳性药物, Conc.01 浓度为 250 ng/mL, 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 别排布在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μ 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	Human RANKL Protein	250 ng/mL	62.5 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 pg/mL	15.26 pg/mL	3.81 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 μ L 细胞/孔至中间孔, 周围的孔加 100 μ L PBS。盖上板盖, 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。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Human RANKL	0.25 mg/mL	0.025 mg/mL	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer

- 96 孔 V 中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 145.2 μ L Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 110 μ L Assay Buffer。
- 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 1.47 μ L Human RANKL), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 36.67 μ L, 加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.47 μ L Human RANKL 加入	145.2 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 36.67 μ L, 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 梯度稀释孔 (B11)。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出, 每孔吸弃 100 μ L 培养基。
- j) 加入步骤 h 准备好的梯度稀释液, 每孔 100 μ L。
- 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。

RANK Reporter 293 Cell Line	0 ng/mL	250 ng/mL	3.81 pg/mL
	5788729	50209224	5426397

3) 验证结果

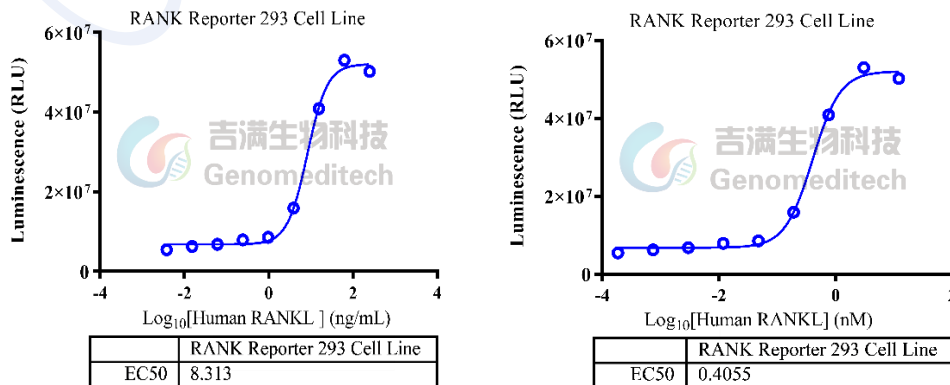


Fig 2.Human RANKL Protein 激活验证结果

(右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

2. 抗体阻断实验——Anti-RANKL

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 RANK Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。使用 Human RANKL Protein 激活，终浓度为 200 ng/mL，Anti-H_RANKL hIgG2 Antibody(Denosumab) (150 kDa；以下简称为 Anti-RANKL) 作为阳性抗体，起始终浓度 (Conc.01) 为 30 $\mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围为 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	Anti-RANKL	30 $\mu\text{g/mL}$	7.5 $\mu\text{g/mL}$	1.88 $\mu\text{g/mL}$	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.3 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 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 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上报板盖，于孵箱中孵育过夜使用。
- 使用 2 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 在 1 个 96 孔 V 底板中，加入 $2 \times$ 激活剂 (2.2 μL 0.25 mg/mL Human RANKL Protein 加入到 1372.9 μL Assay Buffer 中，混匀)，52 μL 每孔。具体排布如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Human RANKL Protein	52 μL	52 μL	52 μL	52 μL	52 μL	52 μL	52 μL	52 μL	52 μL	52 μL	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- d) 在另一块 96 孔 V 底板中，进行药物稀释。
- e) 每个待测药物，使用一行。
- f) 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-RANKL	2.316 mg/mL	/	直接使用储液

- g) 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 71.4 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 μ L Assay Buffer。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.3 μ L，加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.9 μ L Anti-RANKL	加入	71.4 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

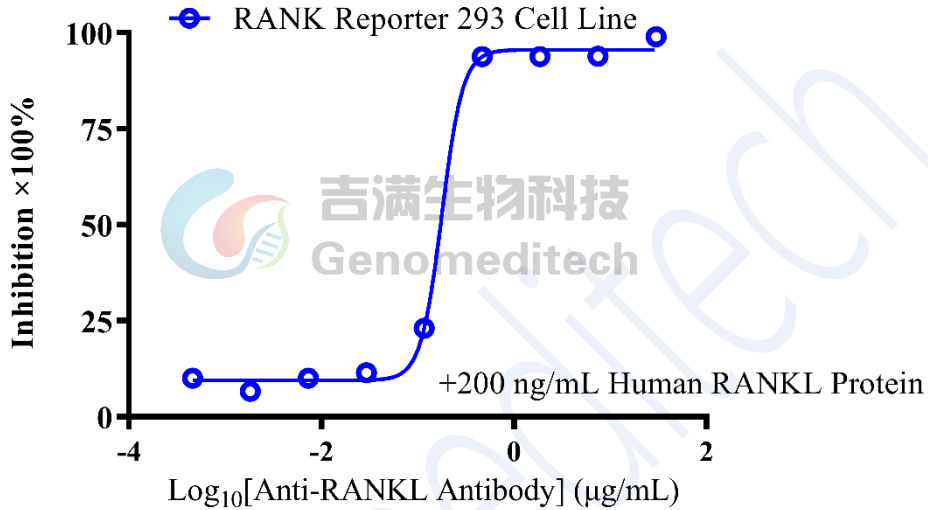
- h) 吸取不同体积的待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2 中加入 1.9 μ L Anti-RANKL），混匀。
- i) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.3 μ L，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- j) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- k) 将步骤 j 梯度稀释液分别加入到步骤 c 准备好的激活剂孔板中，52 μ L 每孔，混合孵育 1 h。
- l) 1 h 后，将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100 μ L 培养基，加入步骤 k 混合孵育后的激活剂与抗体稀释液，每孔 100 μ L。
- m) 继续培养箱中孵育 15 h。
- n) 使用 GMOne-Step 报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

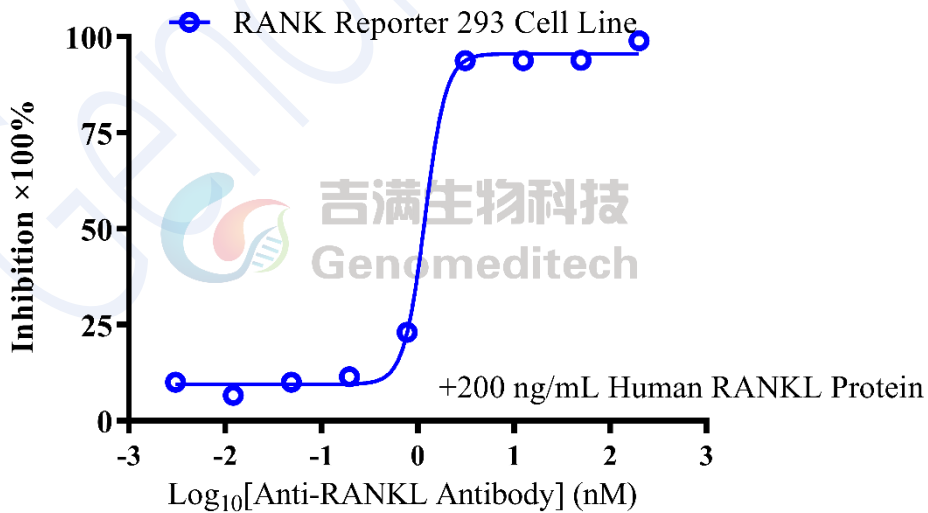
参考报告基因检测说明书。

RANK Reporter 293 Cell Line +Anti-RANKL	RANKL+ 0 $\mu\text{g/mL}$ Anti-RANKL-	RANKL+ 30 $\mu\text{g/mL}$ Anti-RANKL-	RANKL+457.76 pg/mL Anti-RANKL-
	25399021	6902989	23522436

3) 验证结果



	RANK Reporter 293 Cell Line
IC50	0.1787



	RANK Reporter 293 Cell Line
IC50	1.191

Fig 3. Anti-RANKL 抑制验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1 稳定性验证

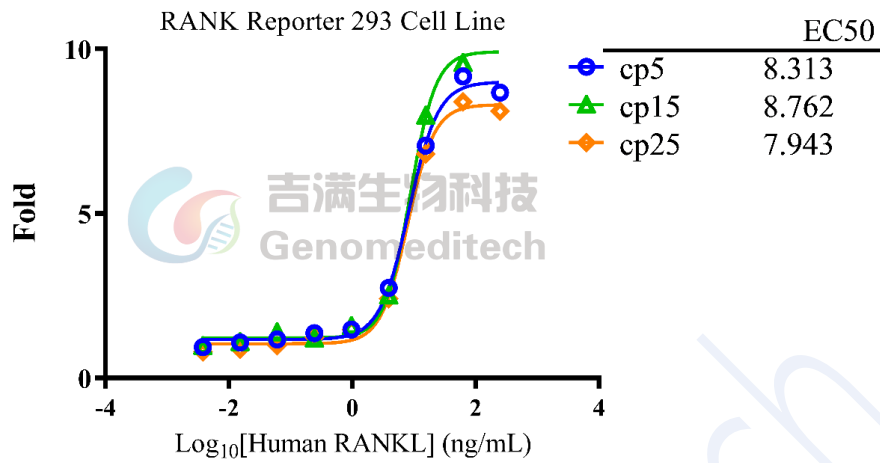


Fig 4 . RANK Reporter 293 Cell Line 稳定性验证结果

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