Genomeditech (Shanghai) Co., Ltd.
Order: +86 021-50432825/50432826
Email: service@genomeditech.com

产品手册

# Tango-H_CXCR5 CHO-K1 Cell Line

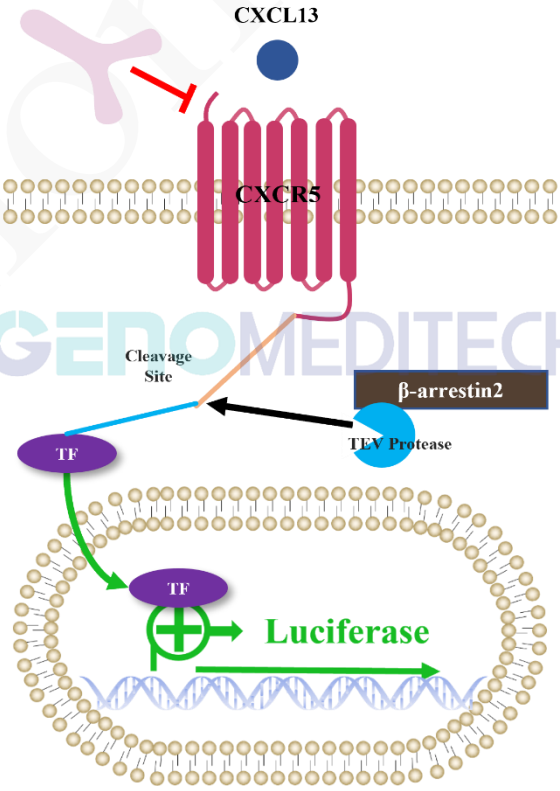
货号: GM-C45288

版本号：4.0.26.1112

CXCR5（C-X-C 趋化因子受体 5，CD185/BLR1）属于 G 蛋白偶联受体超家族中的趋化因子受体家族，是调控 B 细胞迁移、淋巴滤泡形成及生发中心反应的关键受体，由 CXCR5 基因编码，广泛表达于 B 细胞、滤泡辅助性 T 细胞（Tfh）、部分 CD4+/CD8+ T 细胞、NKT 细胞及皮肤归巢 T 细胞等。靶向 CXCR5/CXCL13 轴的生物药和小分子药物研发进展迅速，已有多款候选药物进入临床，适应症包括 B 细胞非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、类风湿关节炎、干燥综合征、炎症性肠病及多发性硬化等。

CXCR5 激活包括 G 蛋白依赖和非 G 蛋白依赖两类信号通路。G 蛋白依赖通路主要偶联 Gi/o 蛋白，可通过检测钙流、cAMP 抑制及 MAPK 磷酸化等第二信使变化来反映其激活或抑制；非 G 蛋白依赖通路的核心是 CXCR5 诱导 β-arrestin 易位，该过程独立于 G 蛋白信号，介导受体内吞与偏向性信号传导，可通过 β-arrestin 招募实验特异性检测。

吉满生物的 Tango-H_CXCR5 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 CXCR5 报告基因的细胞系。当配体 CXCL13 激活 CXCR5 Arrestin 通路时，β-arrestin 携带的 TEV 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；此外，使用阻断型的抗体或拮抗剂可以阻断这一信号的传导，因此该细胞系可用于评估 CXCR5 相关药物（如抗 CXCL13 抗体、抗 CXCR5 抗体、CXCR5 拮抗肽及小分子抑制剂）的体外作用。




本公司产品仅供科研用途，严禁用于人体治疗！

## 规格参数

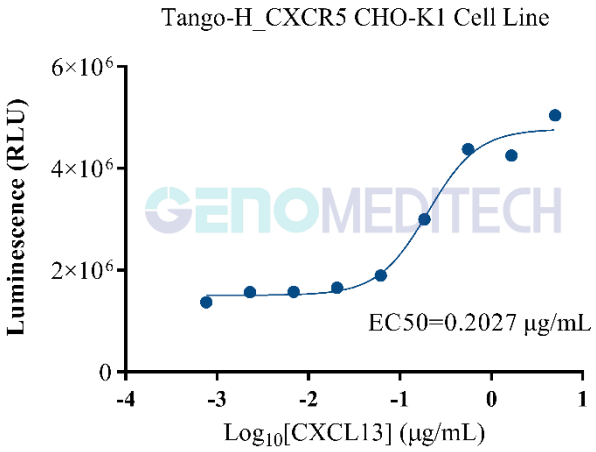
| | |
|---|---|
| **数量** | 5E6 Cells per vial,1 mL |
| **产品形式** | 1 支冻存细胞 |
| **储运条件** | 干冰运输，－196°C 以下长期储存 |
| **复苏培养基** | F12K+10% FBS+1% P.S |
| **生长培养基** | F12K+10% FBS+1% P.S+4 μg/mL Blasticidin+100 μg/mL Hygromycin+4 μg/mL Puromycin |
| **培养备注** | 无 |
| **细胞冻存液** | 90% FBS+10% DMSO |
| **生长特性** | 贴壁 |
| **培养条件** | 37°C, 5% $CO_2$ |
| **支原体检测** | 该细胞系已通过支原体检测，结果为阴性。 |
| **生物安全等级** | Biosafety Level 2 |
| **备注** | 建议尽早扩增该细胞，并冻存至少 10 支，以便后续使用。 |

## 实验材料与仪器

| 名称 | **Manufacturer/Catalogue No.** |
|---|---|
| F12K | BOSTER/PYG0036 |
| Fetal Bovine Serum | ExCell/FSP500 |
| Pen/Strep | Thermo/15140-122 |
| Blasticidin | Genomeditech/GM-040404 |
| Hygromycin | Genomeditech/GM-040403 |
| Puromycin | Genomeditech/GM-040401 |
| 96 well round cell culture plate | PakGent/CL-PT096 |
| 96-well White Opaque Plate | Thermo/236108 |
| 96-well U-bottom Plate | Saining/1014010 |
| GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit | Genomeditech/GM-040513 |
| PE Rabbit anti-Human CD185/CXCR5 mAb (A26188) | abclonal/A26188 |
| Countess 3 Automated Cell Counter | ThermoFisher/A49891 |
| NovoCyte Flow Cytometer | Agilent/NovoCyte 2060R |

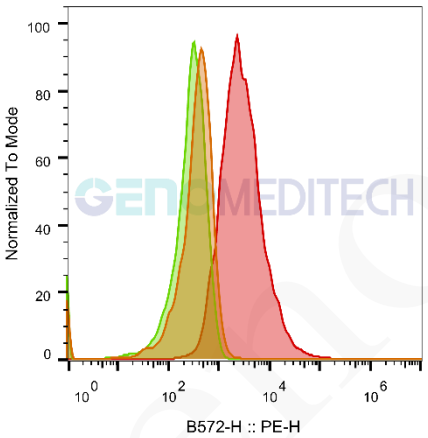
# 验证结果

## 信号通路




BCA-1/CXCL13, Human 激活验证。Tango-H_CXCR5 CHO-K1 细胞系（GM-C45288）按 1E4 细胞/孔接种于 96 孔板，加入梯度稀释的 BCA-1/CXCL13, Human (Genscript/Z02826-20)，于 assay buffer（F12K+1% FBS+1 %P.S）中孵育 16 小时后，采用 Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) 检测萤火虫荧光素酶活性，最大诱导倍数约为 [3.4]，数据以药物质量浓度表示。[protocol]

## 表达




| SampleID | Geometric Mean : B572-H |
|---|---|
| CHO-K1 PE Rabbit anti-Human CXCR5 Ab | 314 |
| Tango-H_CXCR5 CHO-K1 PE Rabbit anti-Mouse_IgG Ab | 236 |
| Tango-H_CXCR5 CHO-K1 PE Rabbit anti-Human CXCR5 Ab | 2841 |

CXCR5 流式表达验证。采用流式细胞术，用 PE Rabbit anti-Human CD185/CXCR5 mAb (A26188) (abclonal/A26188）检测 Tango-H_CXCR5 CHO-K1 细胞系（GM-C45288）的 CXCR5 表达。

## 细胞复苏

复苏培养基：F12K+10% FBS+1% P.S

为确保最高存活率，应在收到冻存细胞后立即解冻并复苏培养。如果在收到细胞后需要继续储存，将其置于液氮罐中，严禁储存在-70° C，因为在-70° C 下储存会导致活性丧失。

a) 37℃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。

b) 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37℃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）。

c) 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 × g，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。

d) 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≥ 3E6 cells/mL。

e) 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 2-3E5 cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中。

## 细胞冻存

细胞冻存液：90% FBS+10% DMSO

a) 使用 176 × g，3 min 离心收集细胞。

b) 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5E6 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℃下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

## 细胞传代

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。

a) 此细胞呈梭状，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 60%，即可进行细胞传代。

b) 将皿或培养瓶中的培养液弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。

c) 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液，37° C 消化 2-3 min，显微镜下观察。

d) 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 × g 室温离心 3 min。

e) 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 20-30%）。

细胞传代比例为 1:4-1:5，2-3 天传代。

## 培养备注

a) 细胞状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定，细胞形态均匀，胞体健壮。

# 实验方案

## 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 Tango-H_CXCR5 CHO-K1 Cell Line 细胞量为 $1 \times 10^4$ cells/孔。本次实验使用 BCA-1/CXCL13, Human（以下简称 CXCL13）作为阳性药物，Conc.01 浓度终为 5 μg/mL，3 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 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 | CXCL13 | PBS | 5.00 μg/mL | 1.67 μg/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 | 762.08 pg/mL | 0 | PBS |
| C | | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS |
| D | | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | | |

### 加样步骤

a) 在实验前 16-24 h，将细胞从培养瓶中取出，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 $1 \times 10^5$ cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。

b) 使用无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。

c) 对于待测样品，使用一行（如 B 行）。

d) 母液配置

| 药物名称 | 储液 | 母液 | 配置方法 |
|---|---|---|---|
| CXCL13 | 0.25 mg/mL | / | 直接使用储液 |

e) 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 180 μL 的 Assay buffer，B3-B11 加入 120 μL 的 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 3.67 μL CXCL13）。

| 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 | 3.67 μL CXCL13 | 180 μL | 120 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（如 B2）中吸取 60 μL 液体，加入到第二个梯度稀孔中（如 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 孵育过夜的细胞孔板取出，吸弃上清 100 μL。

j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 100 μL。

k) 盖上检测板盖，于 37°C $CO_2$ 培养箱中培养 16 h。

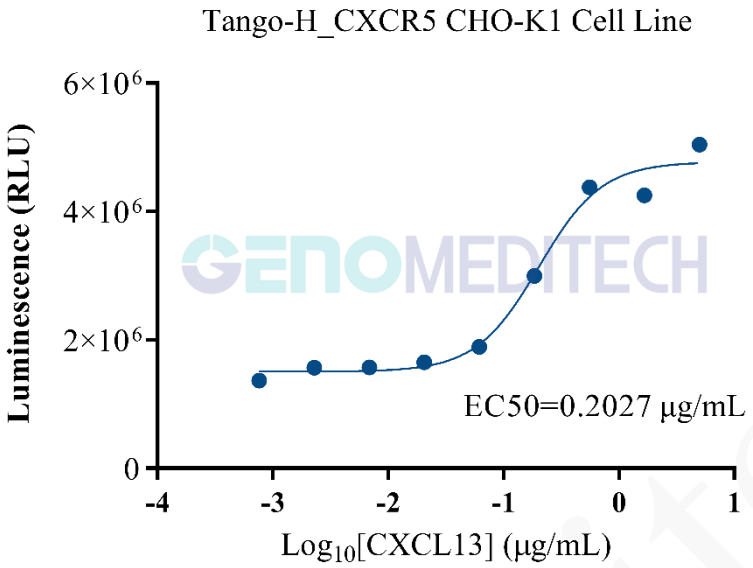
l) 收样检测 Luciferase。

## 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

| | | | |
|---|---|---|---|
| Tango-H_CXCR5 CHO-K1 Cell Line | 0 μg/mL | 5.00 μg/mL | 762.08 pg/mL |
| | 1503246 | 5040772 | 1369952 |

**验证结果**




## 相关产品

| CXCL13:CXCR5 | |
|---|---|
| H_CXCR5 Gq Reporter CHO-K1 Cell Line | H_CXCR5 Gqi5 Reporter CHO-K1 Cell Line |
| Cynomolgus_CXCR5 CHO-K1 Cell Line | Cynomolgus_CXCR5 HEK-293 Cell Line |
| H_CXCR5 CHO-K1 Cell Line | H_CXCR5 HEK-293 Cell Line |
| Mouse_CXCR5 HEK-293 Cell Line | H_CXCR5 BaF3 Cell Line |
| Anti-CXCR5 hIgG1 Antibody(h11G2) | |

## 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。