

产品手册

H_TrkB Reporter CHO-K1 Cell Line

H_TrkB Reporter 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：V2.12.1

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.	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.	蛋白验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
2.	抗体阻断实验.....	10
加样步骤.....		10
1)	报告基因检测.....	11
2)	验证结果.....	12
附录 1	功能验证结果：.....	13
附录 2	流式验证结果.....	13
相关产品	14
使用许可协议：	14

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-C28366	H_TrkB Reporter 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-C28366	H_TrkB Reporter 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

原肌球蛋白受体激酶 B (TrkB, Tropomyosin Receptor Kinase B)，是一种在人体中由 NTRK2 基因编码的蛋白质。TrkB 蛋白属于受体酪氨酸激酶 (RTK) 家族中 Trk 亚族成员，主要在中枢及外周神经系统的神经元表面高表达，尤以海马体、大脑皮层及基底前脑等区域最为富集。它作为脑源性神经营养因子 (BDNF) 和神经营养因子-4/5 (NT-4/5) 的高亲和力受体，是介导神经营养信号、维持神经元存活与突触可塑性的关键分子，正日益成为抑郁症、阿尔茨海默病及神经退行性疾病等领域的重要受体，并具有显著的干预潜力和治疗靶点价值。

TrkB 通过其胞内段酪氨酸激酶催化域介导信号转导。当受体与其配体 BDNF 或 NT-4/5 结合后，发生二聚化并引发自身酪氨酸残基自磷酸化。磷酸化的 TrkB 招募并激活多种下游信号适配蛋白，进而启动三条关键信号通路：磷脂酶 C γ (PLC γ) 通路、PI3K/AKT 通路和 Ras/MAPK 通路。上述通路协同作用，强烈诱导 CREB 等转录因子活化，促进突触可塑性相关蛋白的表达，驱动神经元的存活、分化与突触重塑。

吉满生物 H_TrkB Reporter CHO-K1 Cell Line 报告基因细胞系，是基于 PLC γ -Ca²⁺ 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。通过信号通路的激活，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 TrkB 相关药物的体外效果评价。

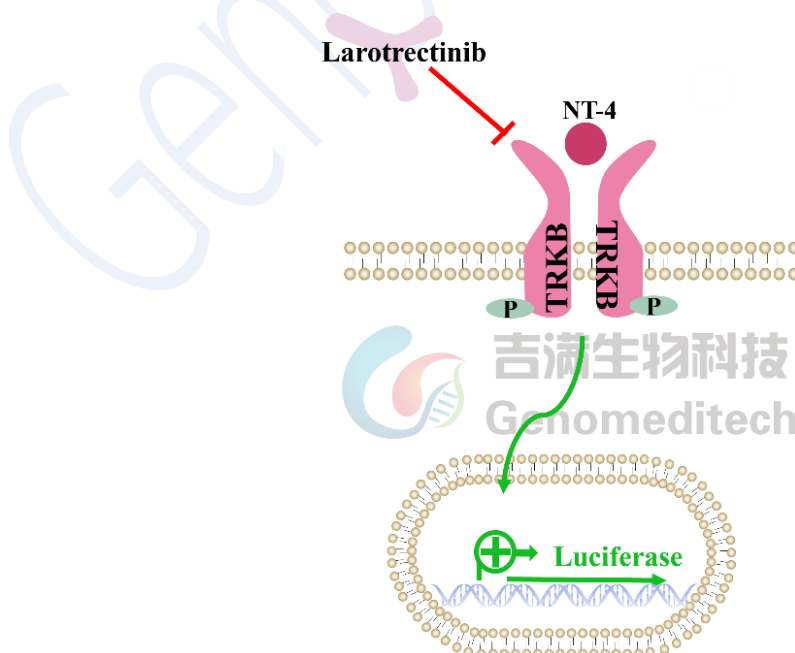


Fig 1.原理示意图

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:	F12K+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	F12K+10% FBS+1% P.S+4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin+4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin
细胞冻存液:	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.
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
96 well round cell culture plate	96-well	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	96-well	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	96-well	Saining/1014010
Anti-TrkB hIgG4 Antibody (H4H9816P2)	/	Genomeditech/GM-88117AB
Neurotrophin-4 蛋白, Human (HEK293)	10 μg	MCE/HY-P702537
Larotrectinib	1 mg	MCE/HY-12866
Selitrectinib	1 mg	MCE/HY-101977
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	Genomeditech/GM-040513C

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 $2-3 \times 10^5$ 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（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。

- 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。推荐细胞传代比例为 1:4-1:5，2-3 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 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 20-30%）。

注意事项：

- 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。
- 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. 蛋白验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TrkB Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Neurotrophin-4 蛋白, Human (HEK293) (14 kDa; 以下简称 Neurotrophin-4) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 10 nM，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 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		
B	Neurotrophin-4	PBS	10.00 nM	3.33 nM	1.11 nM	370.37 pM	123.46 pM	41.15 pM	13.72 pM	4.57 pM	1.52 pM	0	PBS
C		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 μ L 细胞/孔至中间 10 个孔。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 U 底板准备药物稀释。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Neurotrophin-4	7.14 μ M	714 nM	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer

- 96 孔 U 孔板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔分别加入 180 μ L Assay Buffer；B3-B10 孔，分别加入 120 μ L Assay Buffer。

- e) 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 2.56 μL Neurotrophin-4），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	2.56 μL Neurotrophin-4	加入	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													

- f) 从第一个梯度稀释孔 B2 中分别吸取 60 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3 中，充分混匀。
- g) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- h) 将步骤 1 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100 μL 培养基。
- a) 加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100 μL 。
- b) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 7 h。
- c) 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TrkB Reporter CHO-K1 Cell Line	0.Conc	10.00 nM	1.52 pM
	56699	2836747	58439

3) 验证结果

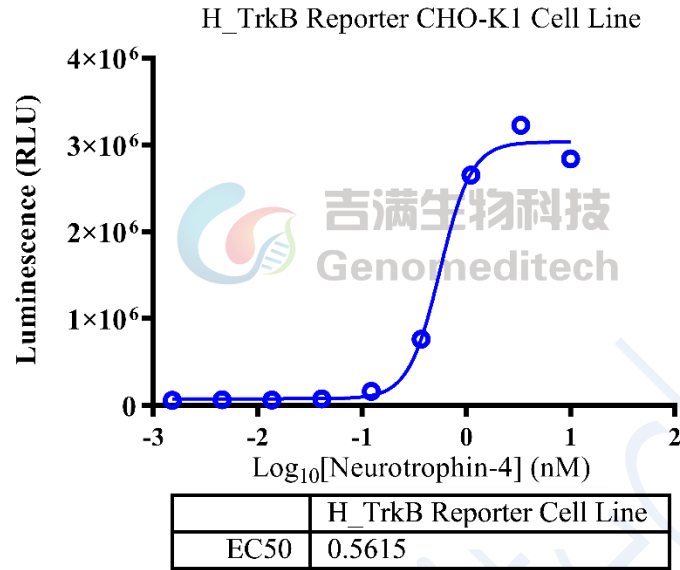


Fig 2. Response to Neurotrophin-4 protein. H_TrkB Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C28366) at a concentration of 1E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Neurotrophin-4 Protein (MCE/ HY-P702537) in assay buffer (F12K + 1% FBS + 1% P.S) for 7 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [50.0]. Data are shown by drug mass concentration.

2. 抗体阻断实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TrkB Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验分别使用 Neurotrophin-4 蛋白, Human (HEK293) (以下简称 Neurotrophin-4) 作为激活药物 (定浓 1 nM)，Larotrectinib 作为 block 抗体 (428.44 kDa)。Conc.01 终浓度分别为 1 μ M，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.9 分别排布在 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	Larotrectinib	1.00 μ M	333.33 nM	111.11 nM	37.04 nM	12.35 nM	4.12 nM	1.37 nM	457.25 pM	152.42 pM	0	PBS
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D												
E												
F												
G												
H												

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 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 U 底板准备药物稀释。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Larotrectinib	10 mM	100 nM	取 2 μ L 储液 + 198 μ L Assay Buffer

- 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 加入 90 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 60 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 加入 1.84 μ L Larotrectinib），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 30 μ L, 加入次孔											对照组
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.84 μ L Larotrectinib	加入	90 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 30 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 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。加入步骤 h 梯度稀释好的抗体, 每孔 50 μ L, 盖上盖板, 放入培养箱中孵育 1 h。
- j) 配置激活药物 Neurotrophin-4 (2 \times 激活浓度), 2 nM Neurotrophin-4 (3.71 μ L Neurotrophin-4 母液加入到 1320 μ L Assay Buffer 中, 混匀后使用)。
- k) 1 h 后, 将步骤 i 细胞孔板取出, 加入步骤 j 准备好的激活药物, 每孔 50 μ L。
- l) 盖上板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- m) 收样, 转至 96 孔白底板上机, 检测 Luciferase。

1) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TrkB Reporter CHO-K1 Cell Line	1 nM Neurotrophin-4+0 μ M Larotrectinib	1 nM Neurotrophin-4+1 μ M Larotrectinib	1 nM Neurotrophin-4+152.42 pM Larotrectinib
	544861	15599	599509

2) 验证结果

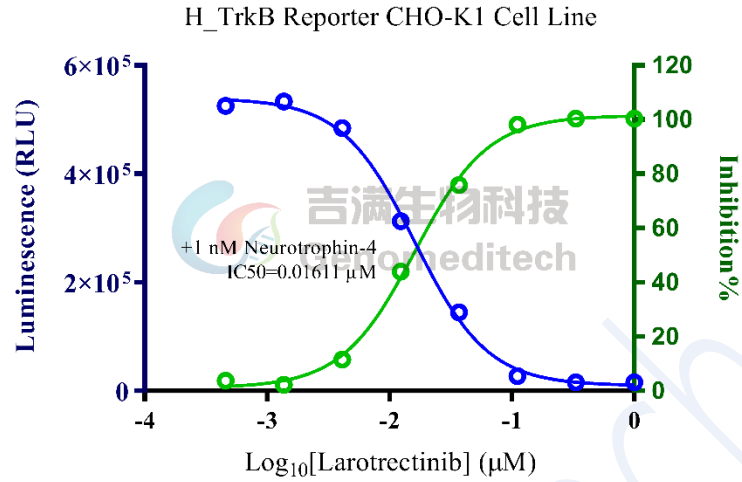


Fig 3. Inhibition of Neurotrophin-4, Human (HEK293) protein-induced reporter activity by Larotrectinib. Serial dilutions of the Larotrectinib(MCE/HY-12866) was incubated with 1E4 cells/well of the H_TrkB Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C28366) in a 96-well plate for 1 hour in assay buffer (F12K +1% FBS+1% P.S). Subsequently, the Neurotrophin-4, Human (HEK293) Protein (MCE/HY-P702537) was added to each well at a final concentration of 1 nM, and the coculture proceeded for an additional 6 hours. Firefly luciferase activity is then measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech)(left Y-axis, relative luminescence units), with inhibition percentages shown on the right Y-axis.

附录 1 功能验证结果:

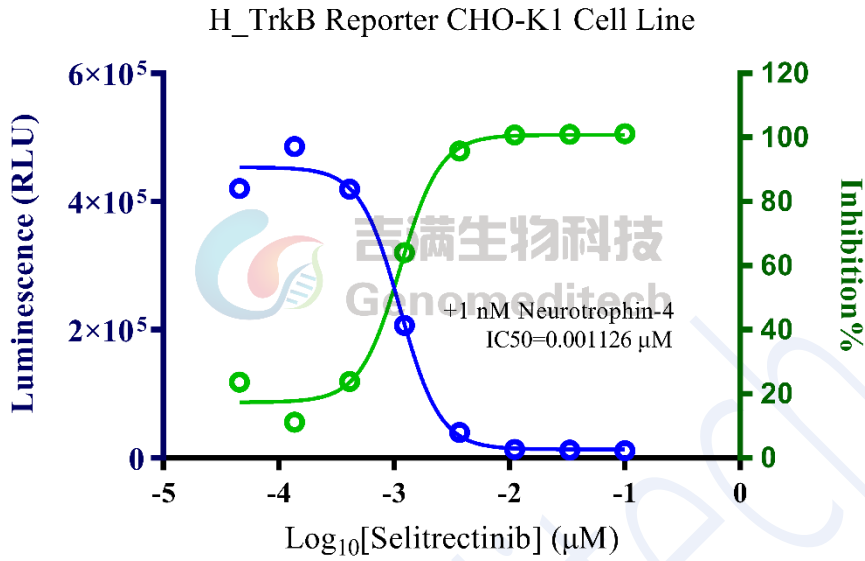


Fig 3. Inhibition of Neurotrophin-4, Human (HEK293) protein-induced reporter activity by Selitrectinib. Serial dilutions of the Selitrectinib(MCE/HY-101977) was incubated with 1E4 cells/well of the H_TrkB Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C28366) in a 96-well plate for 1 hour in assay buffer (F12K +1% FBS+1% P.S). Subsequently, the Neurotrophin-4, Human (HEK293) Protein (MCE/HY-P702537) was added to each well at a final concentration of 1 nM, and the coculture proceeded for an additional 6 hours. Firefly luciferase activity is then measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech)(left Y-axis, relative luminescence units), with inhibition percentages shown on the right Y-axis.

附录 2 流式验证结果

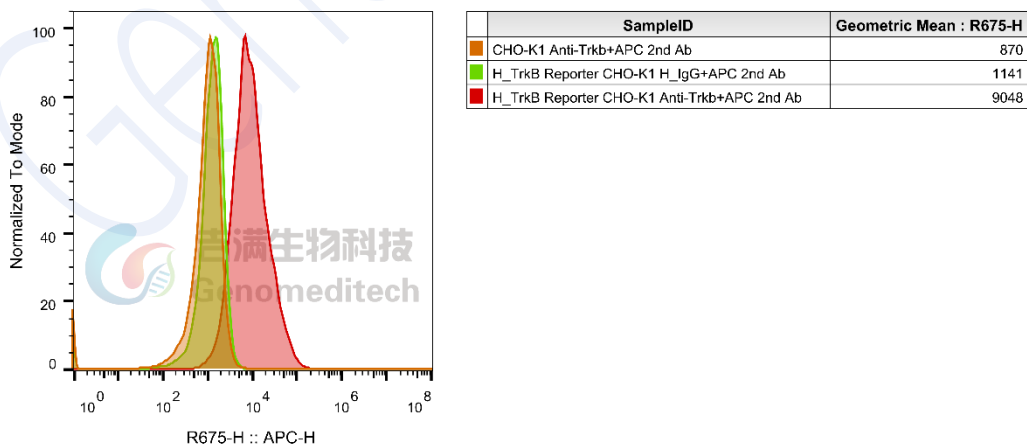


Fig 4. H_TrkB Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C28366) was determined by flow cytometry using Anti-TrkB hIgG4 Antibody (H4H9816P2)(Cat. GM-88117AB).

相关产品

TrkB	
Anti-TrkB hIgG4 Antibody (H4H9816P2)	

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。