

产品手册

H_TSLP Reporter Cell Line

H_TSLP Reporter 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.2

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.	激活剂验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	抗体 Block 验证实验 (Anti-TSLPR)	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	10
	附录 1 流式检测结果.....	11
	附录 2 稳定性验证结果.....	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-C15572	H_TSLP Reporter Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C15572	H_TSLP Reporter 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

胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 是一种细胞因子家族的蛋白质。它通过激活抗原呈递细胞在 T 细胞群的成熟中发挥重要作用。TSLP 主要由非造血细胞产生，如成纤维细胞、上皮细胞和不同类型的基质或基质样细胞。TSLP 与胸腺基质淋巴细胞受体 CRLF2 (TSLPR) 和 IL-7R α 链形成三元信号复合物，激活下游信号。

吉满生物 H_TSLP Reporter Cell Line 报告基因细胞系，是一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 TSLP 与 TSLPR 结合后，二聚体增强 IL-7R α 的募集，形成细胞外三元复合物，激活下游信号，从而导致荧光素酶 (Luciferase) 的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 TSLP 相关药物的体外效果评价。

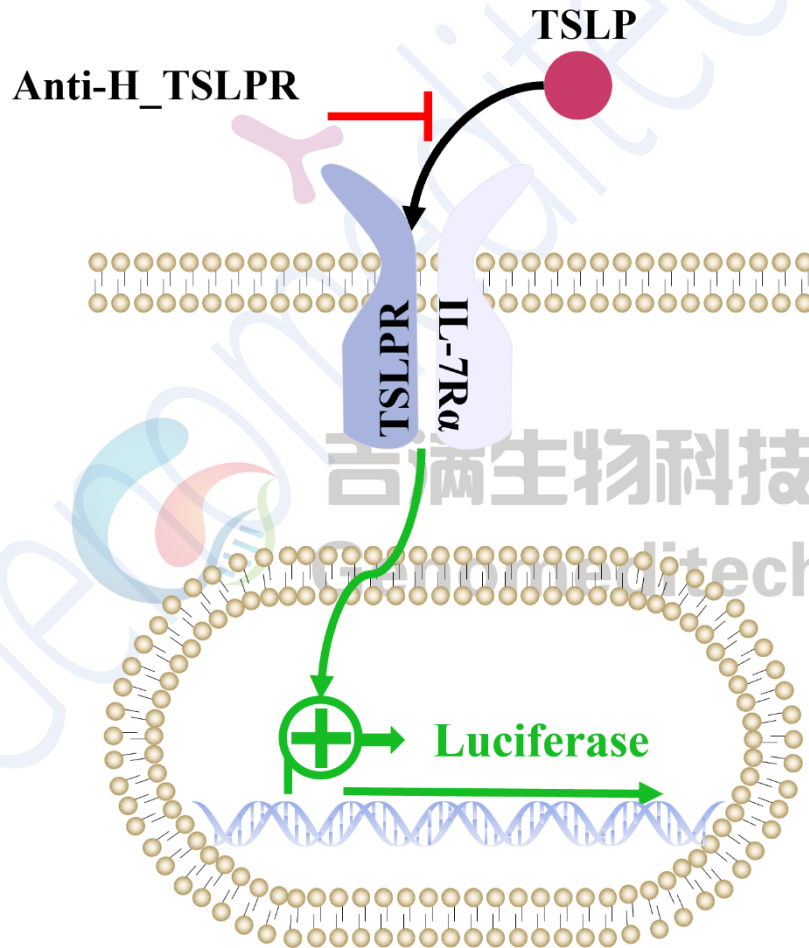


Fig 1.原理示意图

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:	RPMI 1640+10% FBS+ 1% P.S+8 ng/mL mouse IL-3
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+ 1% P.S+8 ng/mL mouse IL-3+0.25 µg/mL Puromycin+5 µg/mL Blasticidin+50 µg/mL G418
细胞冻存培养基:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640+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
mouse IL-3	10 µg	近岸蛋白/CP39
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Vivacell/C3010-0500
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 Not Treated	96-well	Corning/3912
Microplate		
Recombinant Human TSLP Protein	10 µg	R&D SYSTEMS/1398-TS
Recombinant Human TSLP(Cat.No.:CK16)	10 µg	Novoprotein/ CK16
Anti-H_TSLPR hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-31018AB
Passive Lysis 5X Buffer	30 mL	Promega/E1941
Firely Luciferase Assay Reagent	100 mL	Genomeditech/G0483M002
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不断摇动至融化（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 3min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 复苏培养基重悬细胞沉淀，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。
- 调整活细胞密度到 $3-5 \times 10^5$ cells/mL，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL，培养面积 25 cm²），竖瓶培养。

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，再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 细胞为小鼠原 B 细胞，悬浮生长。
- 首次复苏后，约 48-72 h 可进行第一次传代，此次传代后细胞培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加复苏培养基，瓶体改为横向放置。
- 推荐细胞接种密度在 $3.5-4.5 \times 10^5$ cells/mL，当细胞浓度达到 $1-1.2 \times 10^6$ cells/mL 时进行传代，1 传 3-1 传 5，2-3 天传代，不要让其浓度超 1.4×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养，也可通过计数控制细胞传代密度。
- 该细胞为悬浮细胞，传代时推荐使用【半换液法】对细胞状态较为有利。传代时可以直接向培养瓶中添加强生长培养基，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。

注意事项：

- 细胞倍增率稳定后再用于检测或冻存，一般在 7-10 天左右。常规的稳定倍增率是 24 ± 8 小时。
- 首次传代时注意营养，不处理时务必隔天适当补加复苏培养基。

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_TSLP Reporter Cell Line 细胞量为 1×10^5 Cells/孔。使用激活剂：TSLP(15 kDa)起始终浓度(Conc.01)为 $5 \mu\text{g/mL}$ ，5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 $100 \mu\text{L}$ 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	TSLP	PBS	5 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	200 ng/mL	40 ng/mL	8 ng/mL	1.6 ng/mL	320 pg/mL	64 pg/mL	12.8 pg/mL	0 pg/mL	PBS
C		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 1 h，将细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用 Assay Buffer 清洗 2 遍后，再次重悬，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 2×10^6 cells/mL。以排枪加 $50 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖板上板盖，于孵箱中孵育待用。
- 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）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
TSLP	$100 \mu\text{g/mL}$	/	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 $61.88 \mu\text{L}$ Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 $55 \mu\text{L}$ 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 $6.88 \mu\text{L}$ TSLP），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 13.8 μL ，加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
6.88 μL TSLP 加入		61.88 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 13.8 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 h 里稀释好的药物每孔吸取 50 μL 加入到步骤 a 准备好的细胞悬液里，盖上报板盖，于孵箱中孵育 24 h。
- j) 使用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。

H_TSLP Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	12.8 pg/mL
	184566	7771665	238271

3) 验证结果

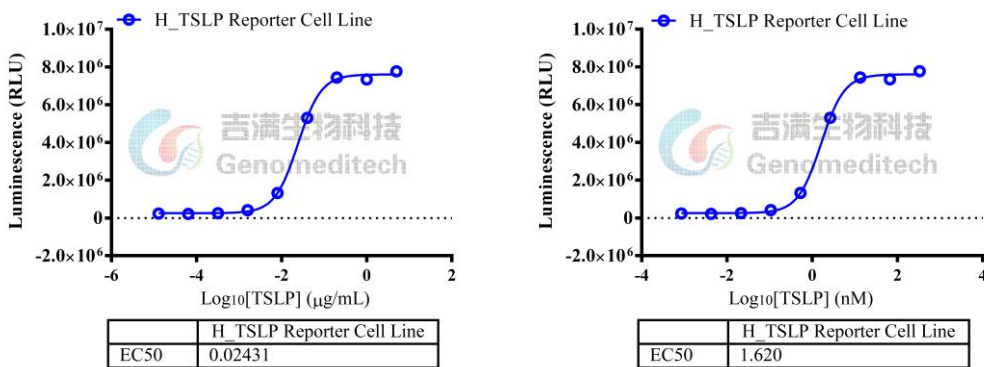


Fig 2.TSLP 激活验证结果

(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 Block 验证实验 (Anti-TSLPR)

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 H_TSLP Reporter Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。使用 TSLP(15 kDa)终浓度为 57.7 ng/mL(EC80=57.8 ng/mL), Anti-H_TSLPR hIgG1 Antibody (150 kDa) (以下简称为 Anti-TSLPR) 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	Anti-TSLPR	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 1 h, 将细胞从培养瓶中取出, 离心收集细胞沉淀, 使用 Assay Buffer 清洗 2 遍后, 再次重悬, 检测细胞活力并计数, 再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 3×10^6 cells/mL。以排枪加 33 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育待用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 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

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-TSLPR	1.4 mg/mL	/	直接使用储液
TSLP	100 $\mu\text{g/mL}$	/	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 45.26 μL Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 36.3 μL Assay Buffer。
- 吸取 3.14 μL 待测样品母液, 加入到第一个梯度稀释孔中 (如 B2), 混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 12.1 μL ，加入次孔										对照组	
A		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B													
C	3.14 μL Anti-TSLPR	加入	45.26 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 12.1 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)，B11 为不加抗体的对照。
- i) 将稀释好的抗体每孔吸取 33 μL 加入到步骤 a 准备好的细胞孔板中，孵育 1 h。
- j) 孵育的同时配置激活剂 (3 \times 激活浓度)，取 1.19 μL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TSLP 加入到 679.43 μL Assay Buffer 中，混匀后使用。
- k) 1 h 后，将步骤 j 配置的激活剂加入到步骤 i 孵育过的孔板中，每孔 33 μL ，混匀后盖上检测盖板，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中继续孵育 23 h。
- l) 收样使用报告基因试剂盒检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TSLP Reporter Cell Line+Anti-TSLPR	TSLP + No Ab Control	TSLP + 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anti-TSLPR	TSLP + 457.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anti-TSLPR
	1811780	178172	1831714

3) 验证结果

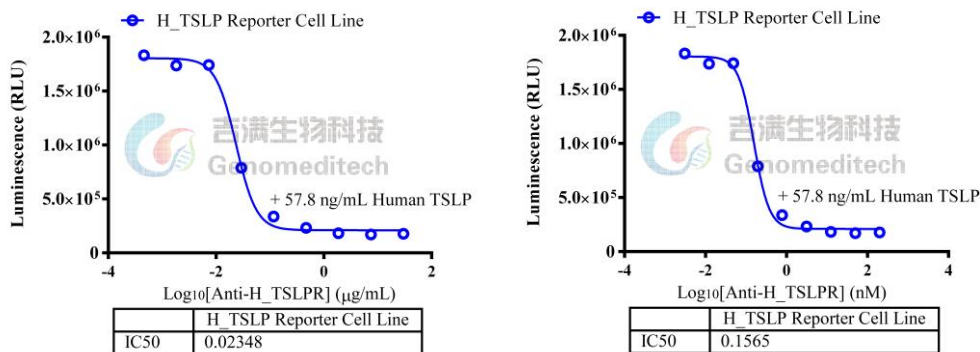


Fig 3.TSLP 激活，Anti-TSLPR Block 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1 流式检测结果

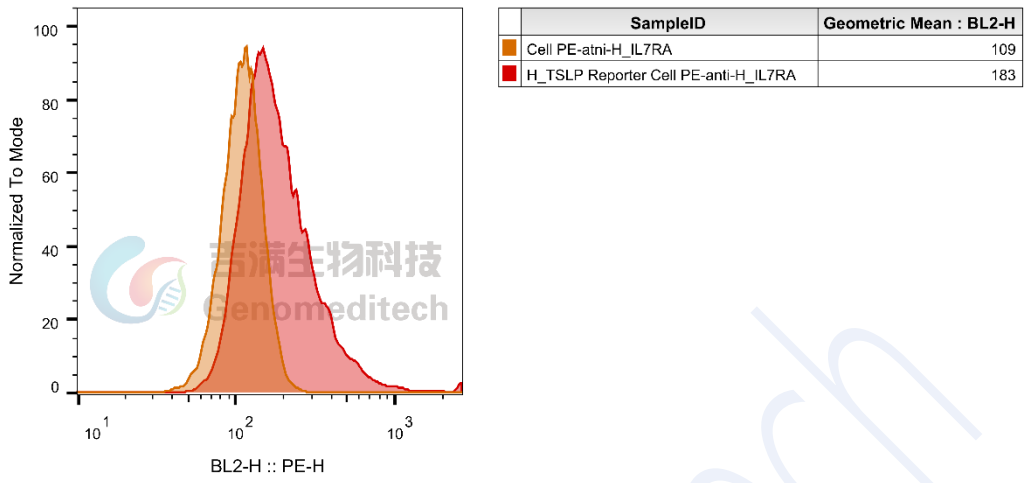


Fig 4.使用 PE anti-human CD127 (IL-7R α) Antibody 抗体流式检测结果

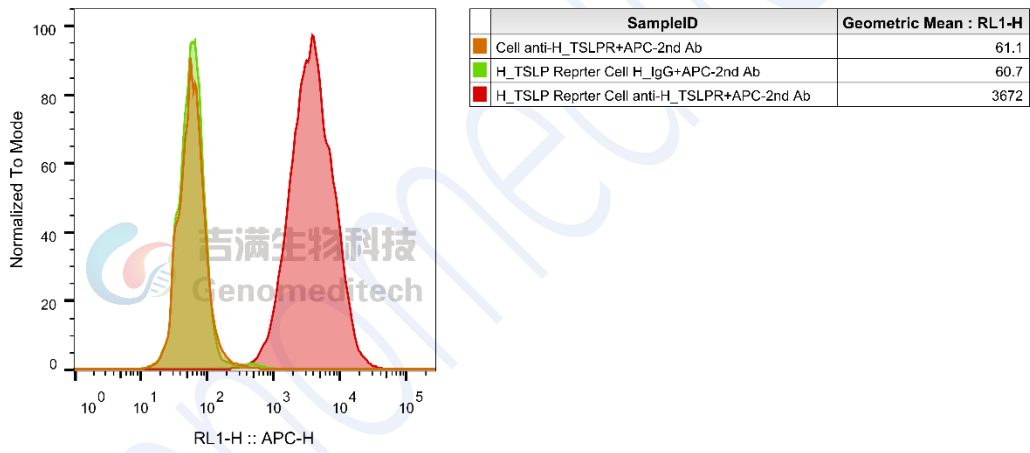


Fig 5.使用 Anti-H_TSLPR hIgG1 Antibody 抗体流式检测结果

附录 2 稳定性验证结果

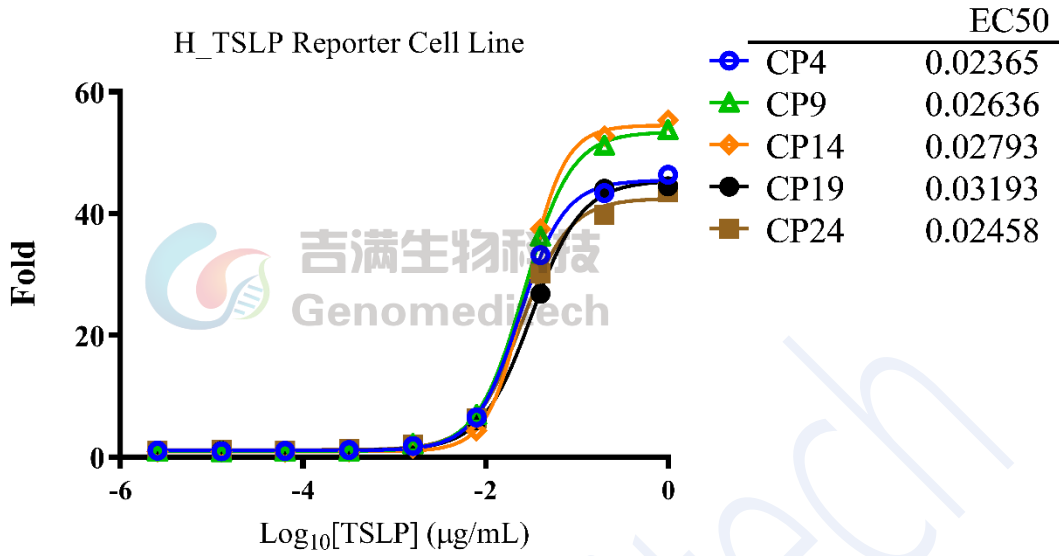


Fig 6. H_TSLP Reporter Cell Line (GM-C15572) 的 CP4、CP9、CP14、CP19、CP24 代次使用
 Recombinant Human TSLP(novoprotein/Cat. No.:CK16)验证结果

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