

产品手册

H_IL18 Reporter 293 Cell Line

H_IL18 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：V2.9.2

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.	抑制验证实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	11
3)	验证结果.....	11
	附录 1 传代稳定性.....	12
	附录 2 流式验证结果.....	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-C21147	H_IL18 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-C21147	H_IL18 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

白细胞介素 18 (IL18, 也称为干扰素- γ 诱导因子) 是一种在人体中由 IL18 基因编码的蛋白质。该基因编码的蛋白质是一种促炎细胞因子。许多细胞类型, 包括造血细胞和非造血细胞等多种类型细胞都具有产生 IL-18 的潜力。

游离 IL-18 与特定的异二聚体细胞表面受体结合, 该受体是 IL-1 受体/Toll 样受体超家族的成员, 由两个亚基 IL-18R α (IL-18R α 1) 和 IL-18R β (IL-18RAP) 组成, 两者均具有一个包含 Toll/IL-1R 结构域 (TIR) 的细胞内部分。IL-18 与 IL-18R α 的相互作用。通过 TIR 结构域稳定了其 与 IL-18R β 的连接。并通过这个结构域募集 MyD88 衔接蛋白。募集 IL-1 受体激活激酶 (IRAK) 启动信号转导。IRAK 自磷酸化并从受体复合物中解离, 随后与 TRAF6 相互作用, 最终激活下游信号通路。

吉满生物 H_IL18 Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系, 是基于 IL18 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 IL-18 与异二聚体受体结合后, 募集 MyD88 衔接蛋白, MyD88 衔接蛋白募集 IRAK, 与 traf6 结合, 激活下游信号通路, 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 IL-18 相关药物的体外效果评价。

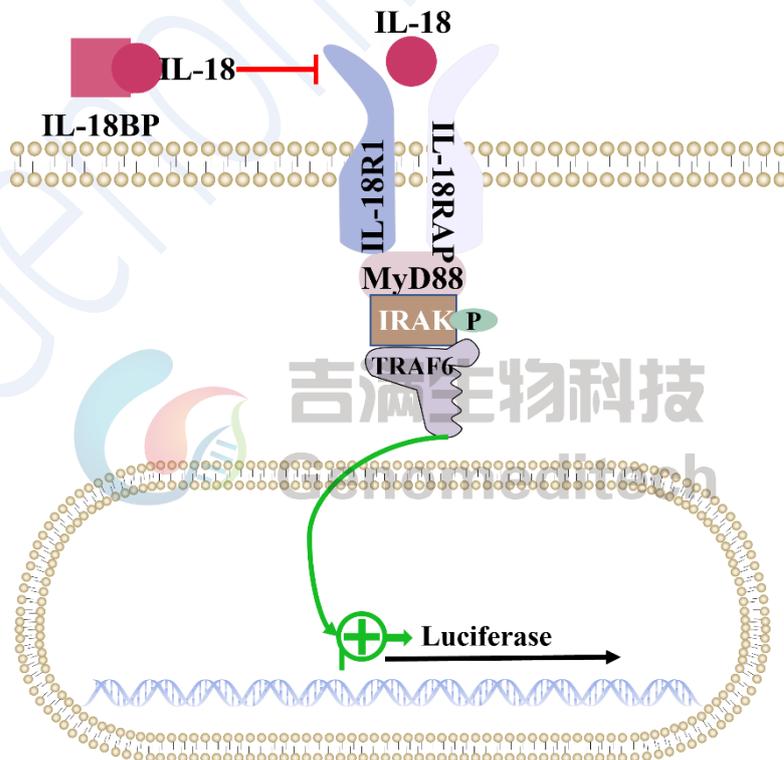


Fig 1.IL18 信号通路图

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:	EMEM+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	EMEM+10% FBS+1% P.S+3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin+400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418+1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	EMEM+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
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
EMEM	500 mL	ATCC/30-2003
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 IL-18 Protein	100 μg	KACTUS/IL1-HE018
Recombinant Human IL-18 BPa Fc Chimera Protein	100 μg	R&D SYSTEMS/119-BP-100
IL18R1 Antibody (APC), Mouse MAb	/	Sino Biologicala/11102-MM17-A
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 × 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 3-4 × 10⁵ 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 × 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 × 10⁶ 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。两次传代后复苏培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。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 × 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

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_IL18 Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Human IL-18 Protein (18.2 kDa)（以下简称为 Human IL-18）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.13 分别排布在 B2-C4，C5 为 0 浓度对照。周围孔加入 $100 \mu\text{L}$ 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 IL-18	20 $\mu\text{g/mL}$	6.67 $\mu\text{g/mL}$	2.22 $\mu\text{g/mL}$	740.74 ng/mL	246.91 ng/mL	82.3 ng/mL	27.43 ng/mL	9.14 ng/mL	3.05 ng/mL	1.02 ng/mL	PBS
C	Human IL-18	338.7 pg/mL	112.9 pg/mL	37.63 pg/mL	0	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D		PBS	PBS	PBS								
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 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ 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，使用两行（如 B2-C5）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-18	1 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 $161.7 \mu\text{L}$ Assay Buffer，B3-C5 孔，加入 $110 \mu\text{L}$ 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 $3.3 \mu\text{L}$ Human IL-18），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 55 μ L, 加入次孔											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	3.3 μ L Human IL-18	加入	161.7 μ L	110 μ L									
C	从 B11 中取 55 μ L	加入	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L							
D						对照孔							
E													
F													
G													
H													

- 7) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 55 μ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 充分混匀。
- 8) 以此类推, 直至第 13 个梯度稀释孔 (C4)。
- 9) 将步骤 1 孵育过夜的孔板取出, 每孔吸弃 100 μ L 培养基。
- 10) 加入之前准备好的梯度稀释液, 每孔 100 μ L。
- 11) 盖上班盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 16 h。
- 12) 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_IL18 Reporter 293 Cell Line	PBS Control	20 μ g/mL	37.63 pg/mL
	39717	3256565	59038

3) 验证结果

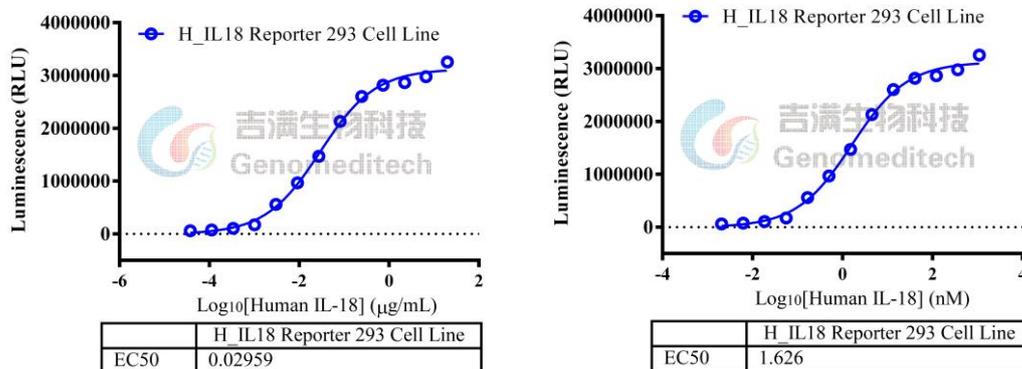


Fig 2. Human IL-18 Protein 激活验证结果 (使用 Passive Lysis 5X Buffer(Promega/E1941)&Firely Luciferase Assay Reagent(Genomeditech/G0483M002)检测)
(右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

2. 抑制验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_IL18 Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。使用 Human IL18 Protein (18.2 kDa) 激活，终浓度为 0.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，Human IL-18 BP (44.2 kDa) 起始终浓度(Conc.01)为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，5 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.10 分别排布在 B2-B11，B12 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	Human IL-18 BP	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	600 ng/mL	120 ng/mL	24 ng/mL	4.8 ng/mL	960 pg/mL	192 pg/mL	38.4 pg/mL	7.68 pg/mL	0
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 μL 1 mg/mL Human IL-18 Protein 加入到 4.76 mL 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	0.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Human IL-18	52 μL										
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- 在另一块 96 孔 V 底板中，进行药物稀释。

- 5) 每个待测药物，使用一行。
- 6) 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-18 BP	1 mg/mL	/	直接使用储液

- 7) 96 孔 V 中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 66.7 μL Assay Buffer, B3-B12 孔, 加入 55 μL Assay Buffer。

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
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	2.06 μL Human IL-18 BP	加入 66.7 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- 8) 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 2.06 μL Human IL-18 BP), 混匀。
- 9) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 13.8 μL , 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 充分混匀。
- 10) 以此类推, 直至第 10 个梯度稀释孔 (B11)。
- 11) 将梯度稀释液分别加入到步骤 3 准备好的激活剂孔板中, 52 μL 每孔, 混合孵育 1 h。
- 12) 1 h 后, 将步骤 1 孵育过夜的孔板取出, 每孔吸弃 100 μL 培养基, 加入步骤 11 混合孵育后的激活剂与药物稀释液, 每孔 100 μL 。
- 13) 继续培养箱中孵育 15 h。
- 14) 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_IL18 Reporter 293 Cell Line+Human IL-18 BP	IL-18+ 0 $\mu\text{g/mL}$ IL18 BP	IL-18+15 $\mu\text{g/mL}$ IL18 BP	IL-18+7.68 pg/mL IL18 BP
	17190503	701810	16531328

3) 验证结果

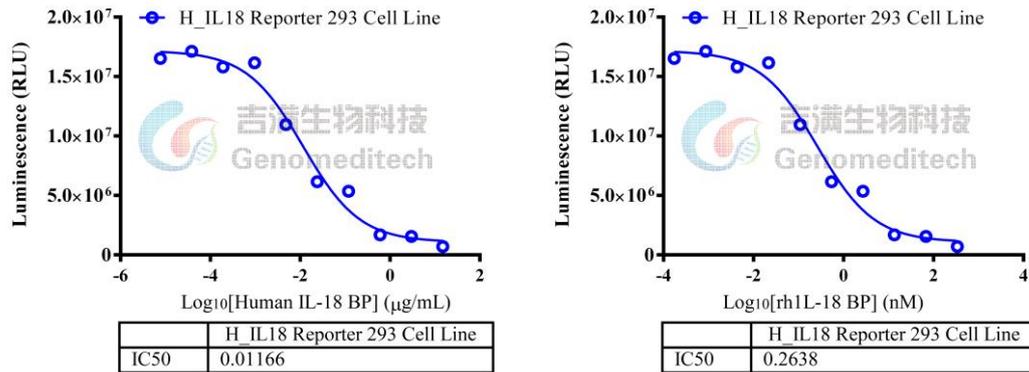


Fig 3.Human IL-18 BP 抑制验证结果（使用 Passive Lysis 5X Buffer(Promega/E1941)&Firely Luciferase Assay

Reagent(Genomeditech/G0483M002)检测）

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

附录 1 传代稳定性

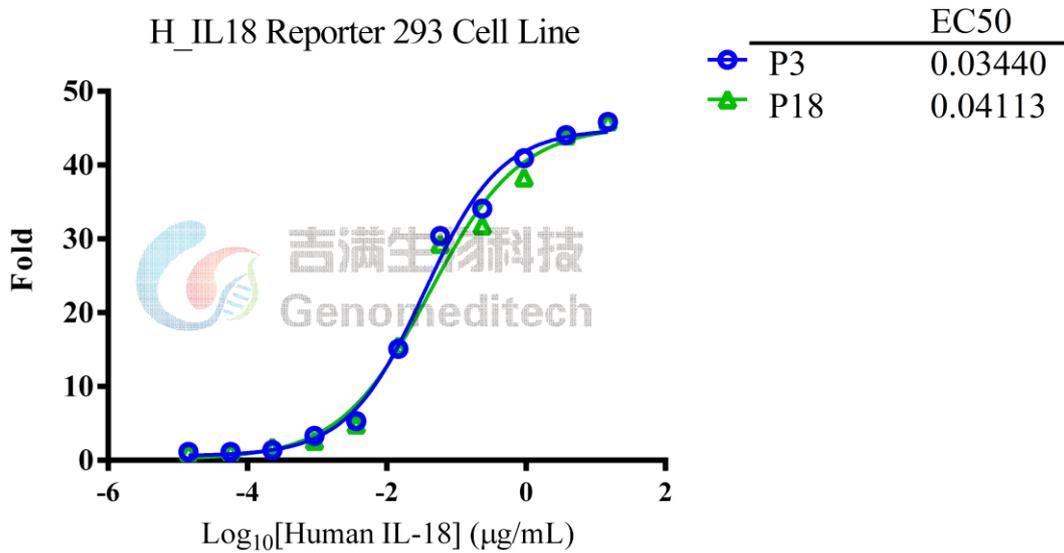


Fig 4.使用 Human IL-18 Protein 激活验证结果 (P3-P18, 纵坐标按倍率换算) (使用 Passive Lysis 5X Buffer(Promega/E1941)&Firely Luciferase Assay Reagent(Genomeditech/G0483M002)检测)

附录 2 流式验证结果

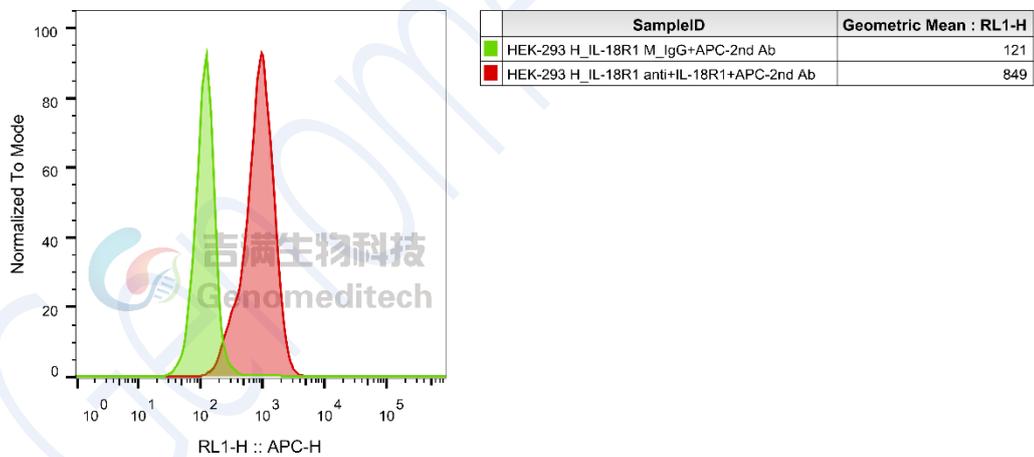


Fig 5. H_IL-18 Reporter HEK 293 Cell Line 使用 IL18R1 Antibody (APC), Mouse Mab 抗体流式验证 IL-18R1 的表达

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