

产品手册

IL-4 Reporter Cell Line

IL-4 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：V2.9.240524

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（以 10 cm 皿为例） | 6 |
| 3. | 细胞冻存 | 6 |
| 六、 | 使用方法 | 7 |
| 1. | 激动剂激活实验 | 7 |
| 1) | 加样步骤 | 7 |
| 2) | 报告基因检测 | 8 |
| 3) | 验证结果 | 9 |
| 2. | Block 验证实验-Anti-IL4R | 10 |
| 1) | 加样步骤 | 10 |
| 2) | 报告基因检测 | 11 |
| 3) | 验证结果 | 11 |
| 附录 1 | 流式结果 | 12 |
| 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-C26301 | IL-4 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-C26301 | IL-4 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

白介素-4 (IL-4) 是一种细胞因子，对 Th0 分化为 Th2 细胞至关重要，后者具有抗炎特性。此外 IL-4 主要 Th2 细胞分泌，因此形成了 Th2 细胞环路。IL-4 的其他重要功能包括促进 B 细胞的增殖和分化，以及诱导免疫球蛋白 E 抗体的合成，因此该抗体在过敏反应中起到重要作用。此外，IL-4 诱导巨噬细胞极化为抗炎 M2 表型，这有助于减少病理性炎症的发生。信号主要通过 IL-4 与 IL-4R α 和 γ c 结合，激活下游信号通路。

吉满生物 IL-4 Reporter Cell Line 报告基因细胞系，此细胞不表达人 IL-13RA1 和 IL-13RA2 受体，因此可特异性识别人 IL-4 而不识别人 IL-13。当人 IL-4 与受体结合后激活下游信号通路，从而激活荧光素酶 (Luciferase) 的表达。该细胞可用于 IL-4 相关药物的体外效果评价。

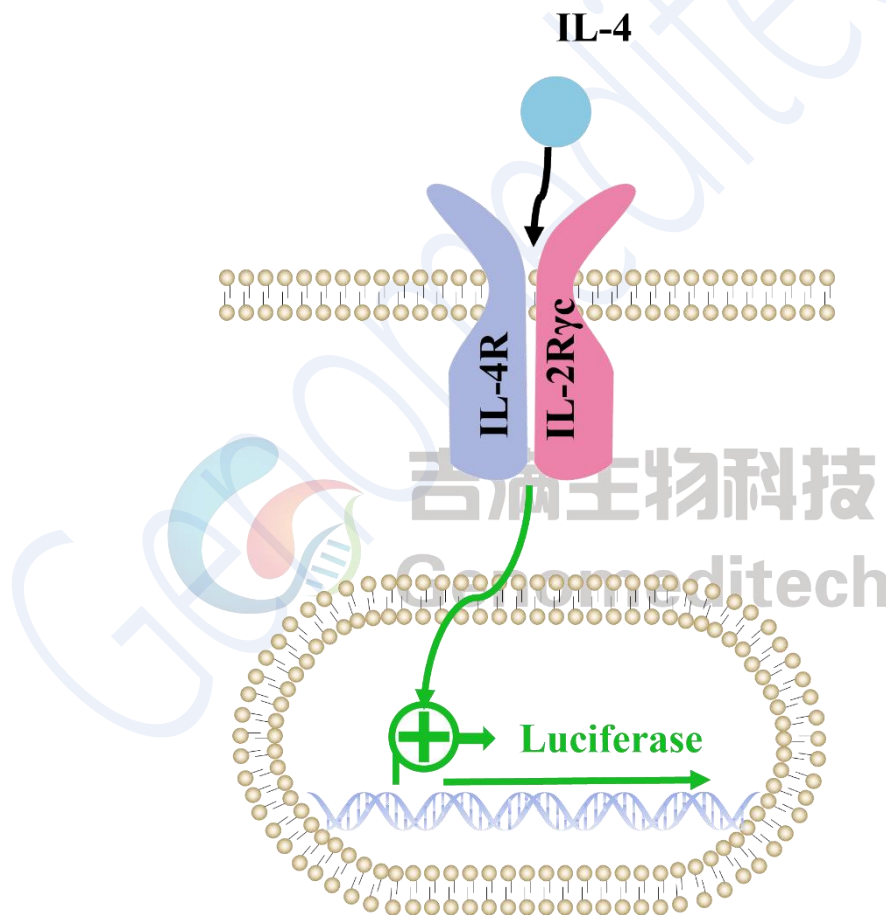


Fig 1.原理示意图

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 µg/mL Blasticidin+200 µg/mL G418+4 µg/mL Puromycin+50 µg/mL Zeocin |
| 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. |
|--|---------------|--------------------------------|
| Puromycin | 25 mg | Genomeditech/GM-040401-1 |
| Blasticidin | 10 mg | Genomeditech/GM-040404-1 |
| G418 | 1 g | Genomeditech/GM-040402-1 |
| Zeocin | 100 mg | Genomeditech/GM-040407-100MG |
| Fetal Bovine Serum | 500 mL | Cegrogen biotech/A0500-3010 |
| F12K | 500 mL | BOSTER/PYG0036 |
| 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 Microplate | 96-well | Corning/3912 |
| GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit | 1000T | Genomeditech/GM-040503C |
| Human IL4 / Interleukin-4 Protein | / | Sino Biological/GMP-11846-HNAE |
| Human IL13 Protein | / | Sino Biological/10369-HNAC |
| Anti-IL-4R hIgG1 Antibody(12B5) | / | Genomeditech/GM-46268AB |
| Anti-CD132(IL2RG) Antibody(REGN7257) | hIgG4 / | Genomeditech/GM-52334AB |
| Anti-IL13RA2 hIgG1 Antibody | / | Genomeditech/GM-29004AB |
| PE anti-human CD213a1 (IL-13Rα1) Antibody | / | Biologend/360403 |
| Anti-IL4R hIgG4 Antibody (Dupilumab) | / | Genomeditech/GM-53165AB |

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 $2-3 \times 10^5$ 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 × 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 × 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。

六、使用方法

1. 激动剂激活实验

操作步骤可调整优化,对于本实验,推荐 IL-4 Reporter Cell Line(Genomeditech/#GM-C26301) 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。本次实验使用 Human IL4/Interleukin-4 Protein (15.6 KDa; 以下简称 Human IL-4)、Human IL13 Protein (12.5 KDa; 以下简称 Human IL-13) 作为阳性药物, Conc.01 终浓度为 200 ng/mL, 4 倍梯度稀释, 11 个梯度。Human IL-4 的 Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11, B12 为 0 浓度对照; Human IL-13 的 Conc.01-Conc.11 分别排布在 C1-C11, C12 为 0 浓度对照。周围为 100 μ 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 | Human IL-4 200 ng/mL | 50 ng/mL | 12.5 ng/mL | 3.13 ng/mL | 781.25 pg/mL | 195.31 pg/mL | 48.83 pg/mL | 12.21 pg/mL | 3.05 pg/mL | 762.94 fg/mL | 190.73 fg/mL | 0 |
| C | Human IL-13 200 ng/mL | 50 ng/mL | 12.5 ng/mL | 3.13 ng/mL | 781.25 pg/mL | 195.31 pg/mL | 48.83 pg/mL | 12.21 pg/mL | 3.05 pg/mL | 762.94 fg/mL | 190.73 fg/mL | 0 |
| D | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | 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, 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, 于孵育箱中孵育过夜。
- 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 B1-B12、C1-C12)。
- 母液配置

| 药物名称 | 储液 | 母液 | 配置方法 |
|-------------|------------|----|--------|
| Human IL-4 | 0.01 mg/mL | / | 直接使用储液 |
| Human IL-13 | 0.01 mg/mL | / | 直接使用储液 |

- e) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1、C1 孔加入 143.73 μL Assay Buffer，B2-B12、C2-C12 孔，加入 110 μL 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 B1、C1 中分别加入 2.93 μL Human IL-4、2.93 μL Human IL-13），混匀。

| 母液吸取 | | 梯度稀释孔，依次从前孔吸取 36.67 μL ，加入次孔 | | | | | | | | | | | 对照组 |
|------|-------------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | | |
| B | 2.93 μL Human IL-4 | 143.73 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL |
| C | 2.93 μL Human IL-4 | 143.73 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL | 110 μL |
| D | | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | | |

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B1 中吸取 36.67 μL ，加入到第 2 个梯度稀释孔 B2，充分混匀。以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11）。
- h) 从第 1 个梯度稀释孔 C1 中吸取 36.67 μL ，加入到第 2 个梯度稀释孔 C2，充分混匀。以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（C11）。
- i) 将步骤 a 准备的细胞孔板取出，弃上清 100 μL 。
- j) 分别加入步骤 g、h 准备好的梯度稀释液，每孔 100 μL 。
- k) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 7 h。
- l) 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。

| | | | |
|-------------------------------------|---------|-----------|--------------|
| IL-4 Reporter Cell Line+Human IL-4 | 0 ng/mL | 200 ng/mL | 190.73 fg/mL |
| | 42261 | 450482 | 62741 |
| IL-4 Reporter Cell Line+Human IL-13 | 0 ng/mL | 200 ng/mL | 190.73 fg/mL |
| | 43050 | 43424 | 52343 |

3) 验证结果

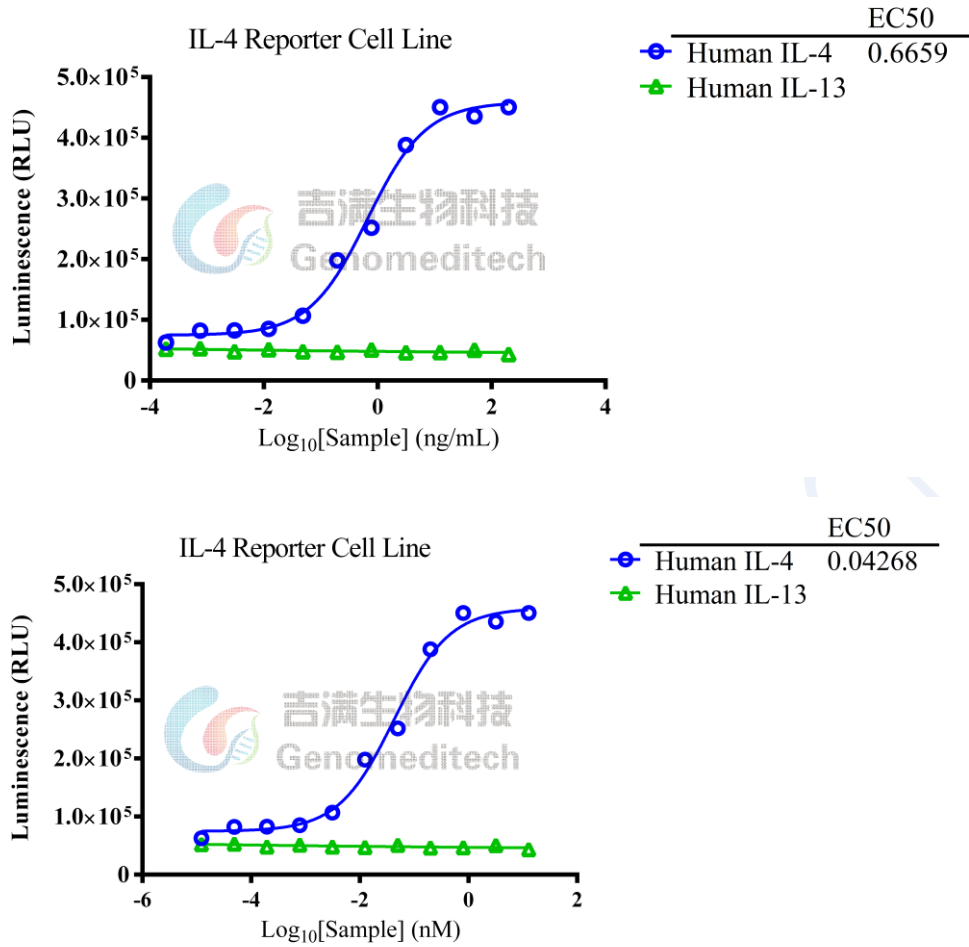


Fig 2 功能验证结果

(上下图对应药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

2. Block 验证实验-Anti-IL4R

操作步骤可调整优化,对于本实验,推荐 IL-4 Reporter Cell Line(Genomeditech/#GM-C26301)细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。本次实验使用 Anti-IL4R hIgG4 Antibody (15 KDa; 以下简称 Anti-IL4R)作为阳性药物, Conc.01 终浓度为 $30 \mu\text{g/mL}$, 4 倍梯度稀释, 9 个梯度。Conc.01-Conc.9 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 | Anti-IL4R | 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, 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, 于孵育箱中孵育过夜。
- 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 |
|-----------|------------|----|--------|
| Anti-IL4R | 3.16 mg/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 $71.94 \mu\text{L}$ 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 $1.39 \mu\text{L}$ Anti-IL4R), 混匀。

| | | | | | | | | | | | | |
|------|------------------------------------|----|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----|
| 母液吸取 | 梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.33 μ L, 加入次孔 | | | | | | | | | | 对照组 | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | 1.39 μ L Anti-IL4R | 加入 | 71.94 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 | | | | | | | | | | | | |

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.33 μ L, 加入到第 2 个梯度稀释孔 B3, 充分混匀。以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- h) 将步骤 a 准备的细胞孔板取出, 每孔吸弃 100 μ L 培养基。
- i) 加入步骤 g 准备好的梯度稀释液, 每孔 50 μ L, 放入培养箱孵育 1 h。
- j) 取出培养箱中的细胞孔板; 每孔加入浓度为 1.6 ng/mL 的 IL-4 蛋白 50 μ L。
- k) 盖上班盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- l) 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。

| | | | |
|-------------------------|---------|---------------|--------------|
| IL-4 Reporter Cell Line | 0 ng/mL | 30 μ g/ml | 457.76 pg/ml |
| | 511971 | 59360 | 572634 |

3) 验证结果

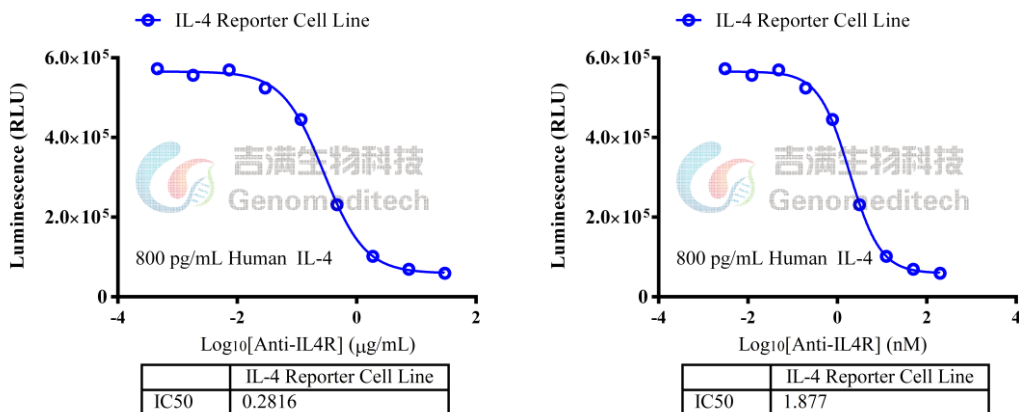


Fig 3.block 功能验证结果

(右图对应药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1 流式结果

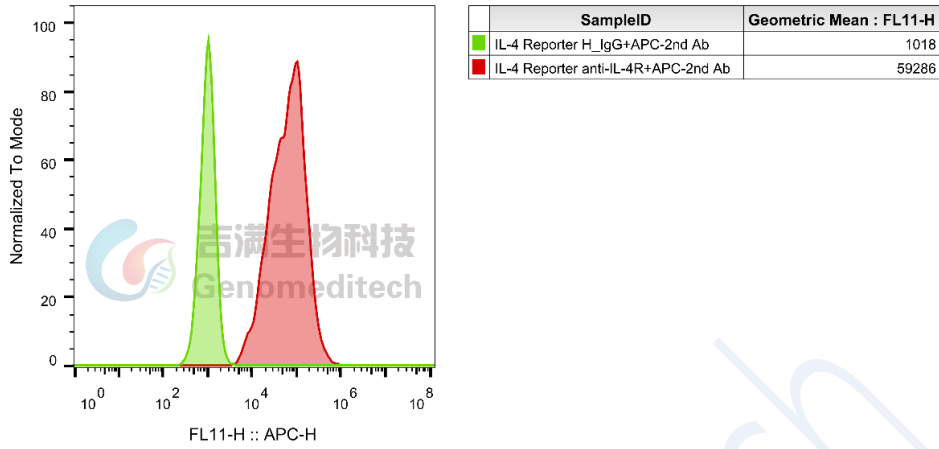


Fig 4.使用 Anti-IL-4R hIgG1 Antibody(12B5) (Genomeditech/GM-46268AB)验证功能细胞表达 IL-4R

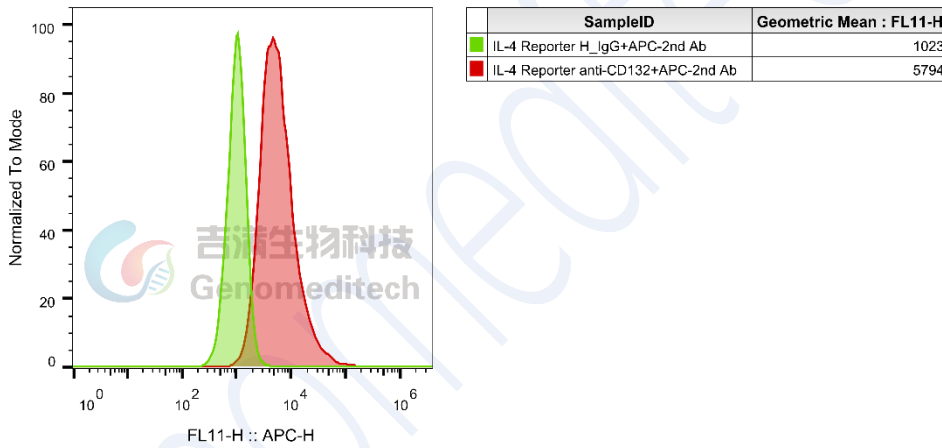


Fig 5.使用 Anti-CD132(IL2RG) hIgG4 Antibody(REGN-7257) (Genomeditech/GM-52334AB)验证功能细胞表达 CD132

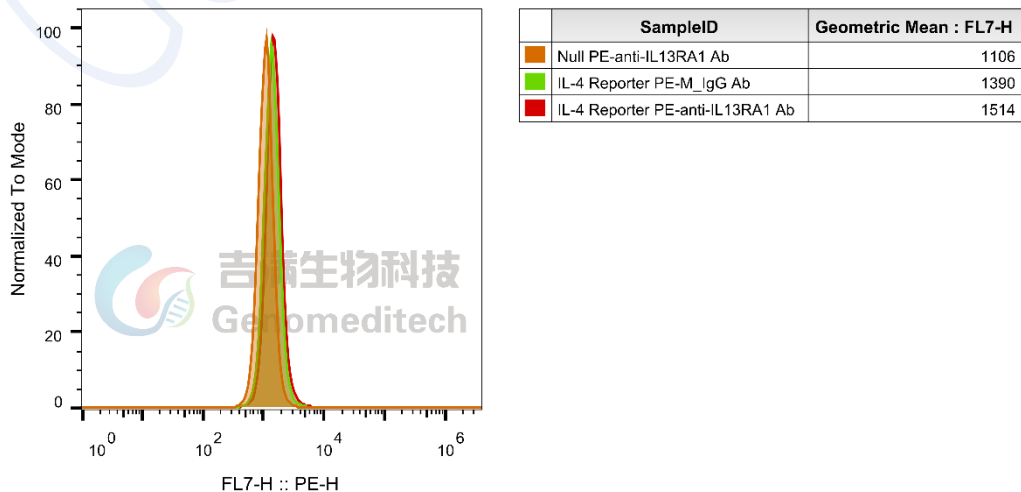


Fig 6.使用 PE anti-human CD213a1 (IL-13R α 1) Antibody (Biolegend/360403)验证功能细胞不表达 IL-13RA1

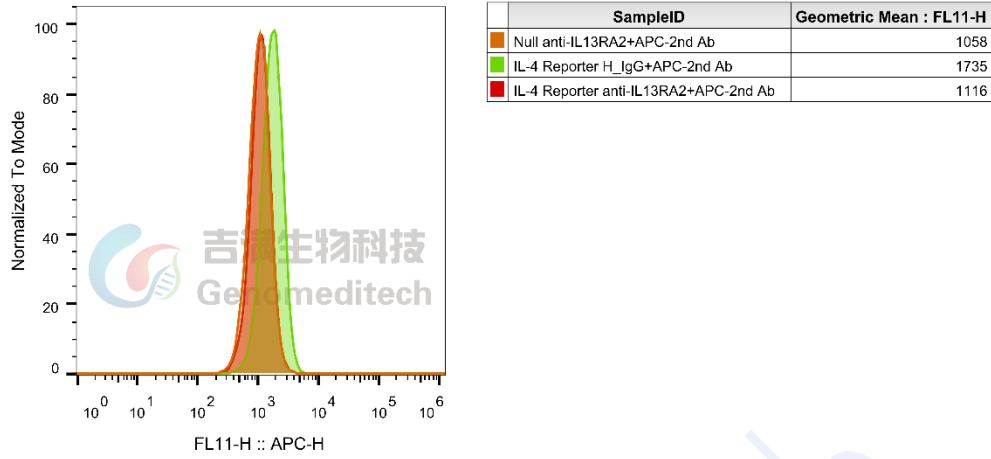


Fig 7.使用 Anti-IL13RA2 hIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-29004AB)验证此功能细胞不表达 IL13RA2

Genomeditech

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