

产品手册

H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line

H_CD25 CD122 CD132 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：V2.12.1

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.....	6
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备	6
2.	试剂耗材准备	6
五、	细胞复苏、传代、冻存.....	7
1.	细胞复苏	7
2.	细胞传代（以 10 cm 皿为例）	7
3.	细胞冻存	7
六、	使用方法（示例）	8
1.	蛋白激活验证实验	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	10
附录 1	IL-15 功能验证结果	11
附录 2	流式验证结果.....	11
相关产品		13
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-C43769	H_CD25 CD122 CD132 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-C43769	H_CD25 CD122 CD132 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-2 (IL-2) 是肿瘤浸润淋巴细胞的关键生长因子, 主要由活化的 T 细胞表达, 其发生在 T 细胞受体识别同源抗原时。虽然 IL-2 促进活化效应细胞和幼稚 T 细胞的增殖和存活, 但它也激活调节性 T 细胞 (Tregs)。IL-2 的活性主要通过与其淋巴细胞表面的 IL-2 受体结合并传导信号到胞内, IL-2 受体是由 α 、 β 、 γ 三个亚基组成的异聚体 (IL-2R α /CD25, IL-2R β /CD122, IL-2R γ /CD132)。IL-2R γ /CD132 在所有淋巴细胞上表达, 而 IL-2R β /CD122 在自然杀伤 (NK) 和 CD8 记忆 T 细胞上组成型表达, 并且可以在抗原识别后在幼稚 T 细胞上诱导。IL-2R γ /CD132 和 IL-2R β /CD122 能够进行细胞内信号传导的亚基, 而 IL-2R α /CD25 不参与信号传导。低浓度的 IL-2 优先结合在 Treg 上组成型表达的高亲和力三元复合物受体 (IL2R $\alpha\beta\gamma$), 因此低剂量 IL-2 可激活 Treg 来诱导免疫耐受, 用于治疗 1 型糖尿病, 红斑狼疮等自身免疫性疾病的治疗。高浓度的 IL-2 饱和 Treg 之后会结合比如 NK 细胞和 CD8+T 细胞上组成型表达的中等亲和力的二元复合物受体 (IL2R $\beta\gamma$), 激活 NK 细胞和 CD8+T 细胞, 增加抗癌活性。而在 IL-2R α /CD25 亚基单独存在时, 其与 IL-2 的亲和力只有三元复合物受体 (IL2R $\alpha\beta\gamma$) 的百分之一。因此不同的研发公司根据不同的应用场景进行了不同设计方法的探索, 包括 PEG 化修饰、融合 Fc、突变体设计、双特异性抗体设计、联合免疫检查点抗体用药等策略。

吉满生物开发了不表达 IL-2R α /CD25 受体的 H_CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line/GM-C27707 报告基因细胞系与高表达 IL-2R α /CD25 受体的 H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line/GM-C43769 报告基因细胞系, 当 IL-2 结合受体后, 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-2 及其受体相关药物等的体外效果评价。

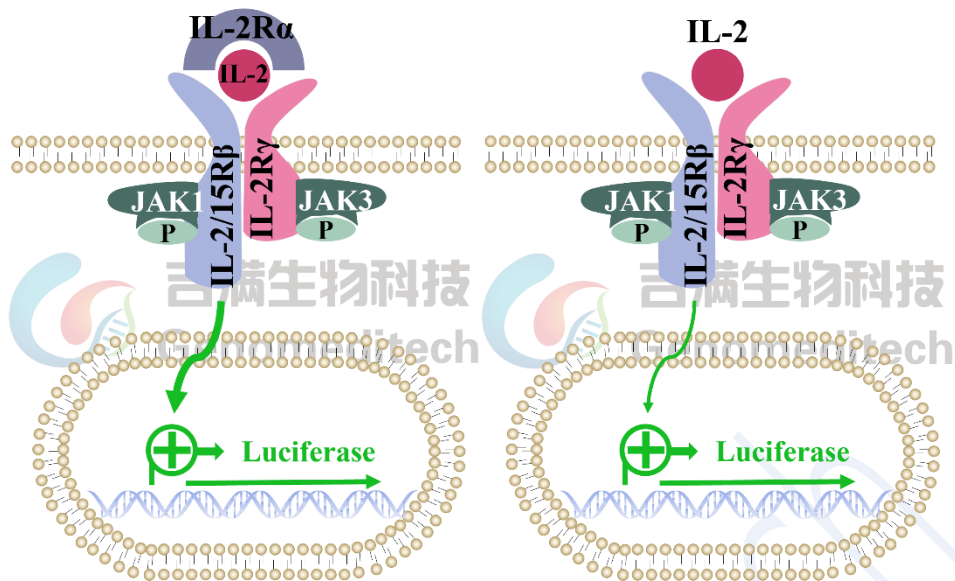


Fig 1. 左图 H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line 原理示意图；右图 H_CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line 原理示意图

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:	DMEM+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin+150 µg/mL Bleomycin+125 µg/mL Hygromycin+0.75 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	DMEM+1% FBS+1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
DMEM	500 mL	gibco/C11995500BT
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
Bleomycin	100 mg	Genomeditech/GM-040407
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
96 well round cell culture plate	Plate	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	Plate	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	Plate	Saining/1014010
Recombinant Human IL-2	/	Novoprotein/C013
Recombinant Human IL-15	/	SinoBiological/10360-H07E
Anti-CD25 hIgG1 Antibody(Basiliximab)	/	Genomeditech/GM-52329AB
Anti-CD122 hIgG1 Antibody(HuABC-2)	/	Genomeditech/GM-52319AB
Anti-CD132(IL2RG) hIgG4 Antibody(REGN7257)	/	Genomeditech/GM-52334AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	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

注：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℃，因为在-70℃下储存会导致活性丧失。

- 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。
- 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）。
- 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 5 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℃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。

- 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，当细胞密度达到 80%，需要进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，3 天传代。注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- 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℃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， $176 \times g$ 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 30-40%）。

注意事项：

- 细胞刚复苏，会有一定比例的死细胞，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。
- 注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- FBS 需 56℃水浴 30 分钟，可热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. 蛋白激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line 和 H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human IL-2（15.5 kDa；以下简称 Human IL-2）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 100 ng/mL，4 倍梯度稀释，将 H_CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line 和 H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line 分别接种于 96 孔板的 B 行和 C 行，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，C2-C10，B11、C11 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	Human IL-2	PBS	100.00 ng/mL	25.00 ng/mL	6.25 ng/mL	1.56 ng/mL	390.63 pg/mL	97.66 pg/mL	24.41 pg/mL	6.10 pg/mL	1.53 pg/mL	0	PBS
C	Human IL-2	PBS	100.00 ng/mL	25.00 ng/mL	6.25 ng/mL	1.56 ng/mL	390.63 pg/mL	97.66 pg/mL	24.41 pg/mL	6.10 pg/mL	1.53 pg/mL	0	PBS
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，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 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。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10、C2-C10）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-2	100 μ g/mL	10 μ g/mL	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer

- e) 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 160 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 120 μ L Assay Buffer；C2 孔加入 160 μ L Assay Buffer，C3-C11 孔，加入 120 μ L 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 和 C2 中分别加入 1.62 μ L Human IL-2），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 40 μ L，加入次孔										对照组	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.62 μ L Human IL-2	加入	160 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	
C	1.62 μ L Human IL-2	加入	160 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 40 μ L，加入到第二个梯度稀释孔 B3，从第一个梯度稀释孔 C2 中吸取 40 μ L，加入到第二个梯度稀释孔 C3 充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10、C10）。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。
- j) 加入梯度稀释好的药物，100 μ L 每孔。
- k) 盖上班盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- l) 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_CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line	0.00 μ g/mL	1.53 pg/mL	100.00 ng/mL
	41920	48962	2051940
H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line	0.00 μ g/mL	1.53 pg/mL	100.00 ng/mL
	122630	182492	4746043

3) 验证结果

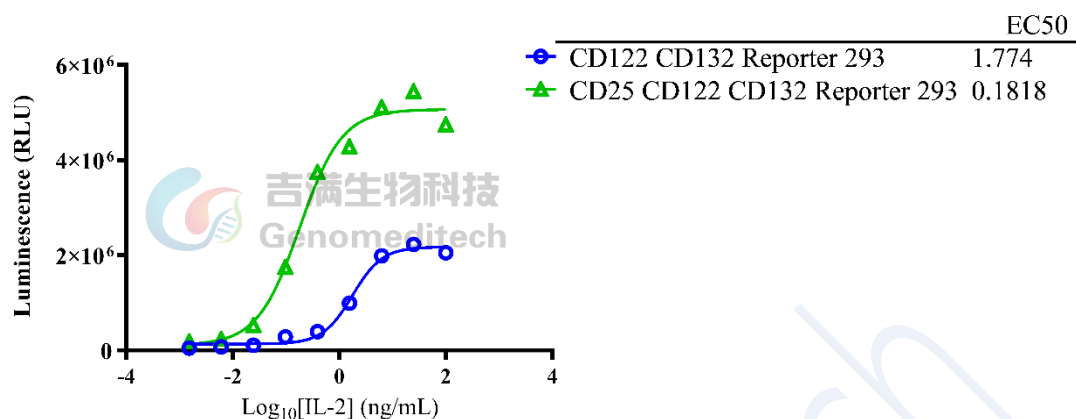


Fig 2. Response to Recombinant Human IL-2. H_CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C27707) and H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C43769) were seeded at a density of 1.5E4 cells per well in a 96-well plate and incubated overnight. The next day, serial dilutions of the Human IL-2 (Novoprotein/C013) were added to the pre-seeded cells. The mixture was incubated for an additional 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [48.9] and [44.4].. Data are shown by drug mass concentration.

附录 1 IL-15 功能验证结果

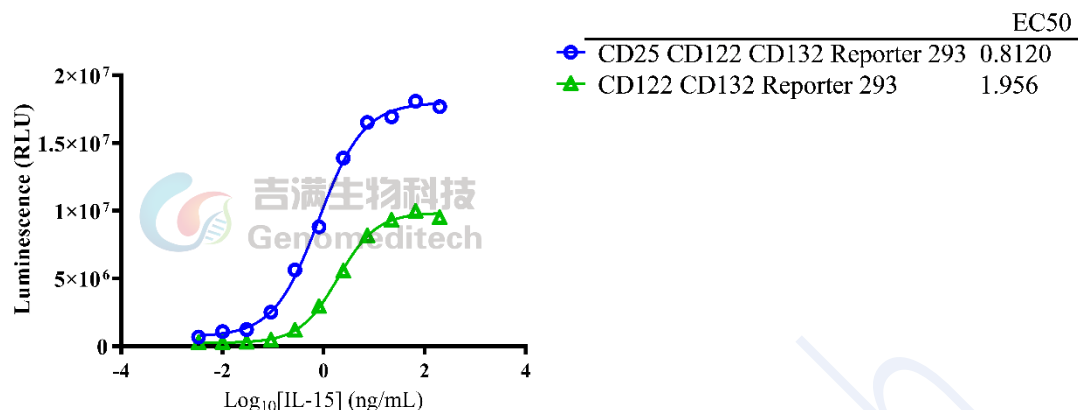


Fig 4. Response to Recombinant Human IL-15. H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C43769) and H_CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C27707) were seeded at a density of 1.5E4 cells per well in a 96-well plate and incubated overnight. The next day, serial dilutions of the Human IL-15 (SinoBiological/10360-H07E) were added to the pre-seeded cells. The mixture was incubated for an additional 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [30.7] and [44.2]. Data are shown by drug mass concentration.

附录 2 流式验证结果

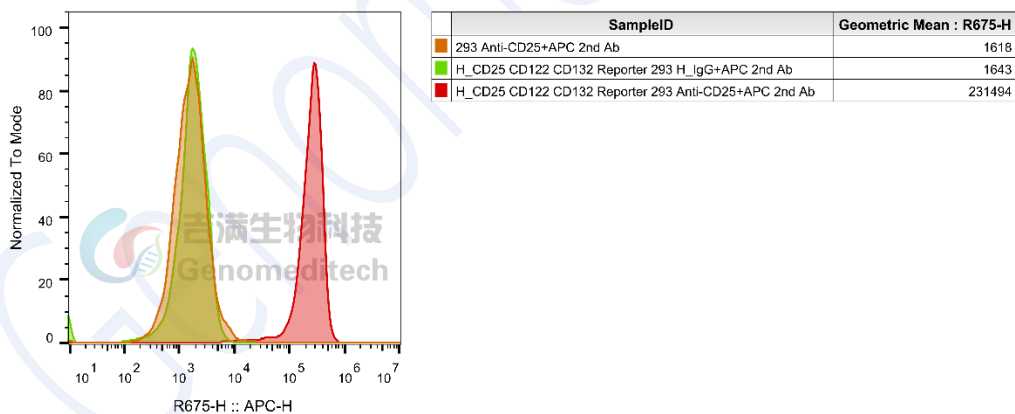


Fig 5. H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C43769) was determined by flow cytometry using Anti-CD25 hIgG1 Antibody(Basiliximab)(Cat. GM-52329AB).

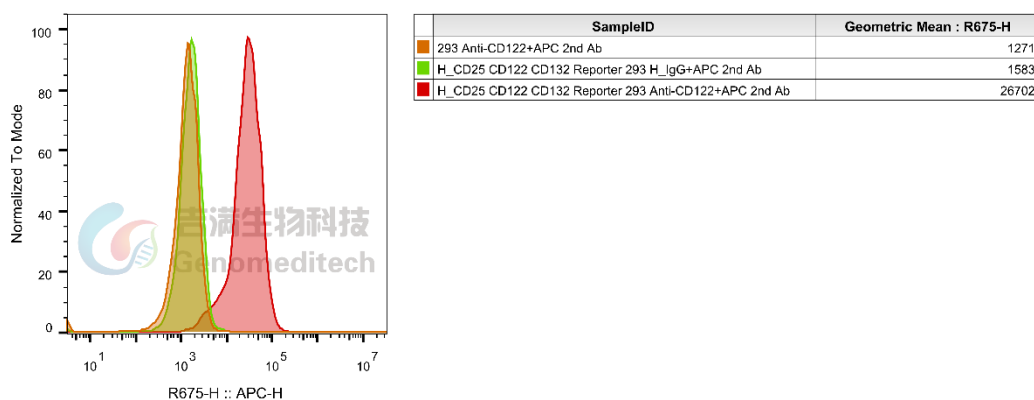


Fig 6. H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C43769) was determined by flow cytometry using Anti-CD122 hIgG1 Antibody(HuABC-2)(Cat. GM-52319AB).

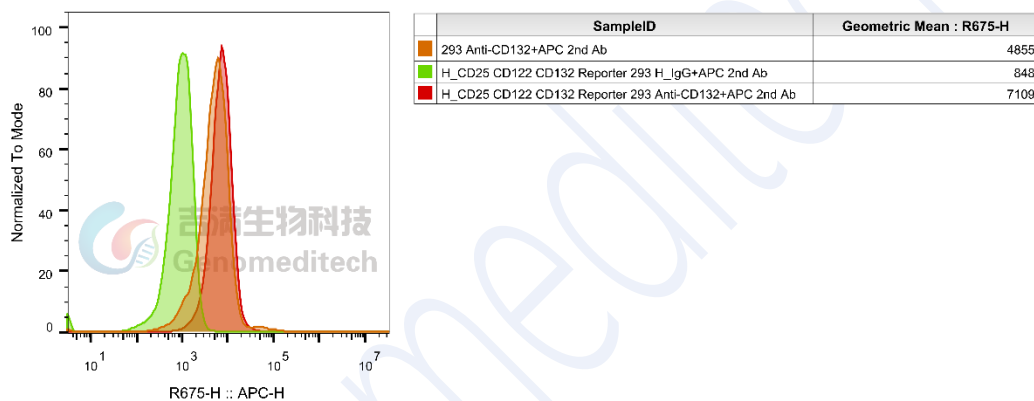


Fig 7. H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C43769) was determined by flow cytometry using Anti-CD132(IL2RG) hIgG4 Antibody(REGN7257)(Cat. GM-52334AB).

相关产品

IL-2	
H_CD215(IL15RA) HEK-293 Cell Line	Anti-IL2 hIgG1 Antibody (imneskibart)
Cynomolgus_CD122 HEK-293 Cell Line	Anti-CD122 hIgG1 Antibody(HuABC-2)
H_CD122 HEK-293 Cell Line	Anti-CD25 hIgG1 Antibody(Basiliximab)
H_CD122 CHO-K1 Cell Line	Anti-CD132(IL2RG) hIgG4 Antibody(REGN7257)
H_CD122 CD132 CHO-K1 Cell Line	Anti-mouse CD25 RIgG1 Antibody(PC-61.5.3)
H_IL15 Reporter Cell Line	Anti-mouse CD25 mIgG2a Antibody(PC-61.5.3)
Cynomolgus_CD25 HEK-293 Cell Line	Human IL-2 Protein; His Tag
H_CD25 CHO-K1 Cell Line	Human IL-2RA Protein; His Tag
H_CD25 HEK-293 Cell Line	Cynomolgus IL-2RA Protein; His Tag
H_IL2 Reporter DDX35TM Cell Line	Human IL-2RB Protein; His Tag
H_IL2 Reporter Cell Line	Cynomolgus IL-2RB Protein; His Tag
H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat(hPD1 OE) Cell Line	Human IL-2RG Protein; His Tag
H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line	Cynomolgus IL-2RA Protein; hFc Tag
H_CD122 CD132 Reporter Cell Line	

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。