

产品手册

H_IL-5RA TF-1 Cell Line

H_IL-5RA TF-1 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.2

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（示例）	7
1.	细胞增殖实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	9
附录 1	流式验证	10
相关产品		11
使用许可协议：		12

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-C46352	H_IL-5RA TF-1 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C46352	H_IL-5RA TF-1 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

IL-5 是一种 115 个氨基酸（在人类中，在小鼠中为 133 个）长的 TH2 细胞因子，它是造血家族的一部分。与该细胞因子家族的其他成员（即白细胞介素 3 和 GM-CSF）不同，这种糖蛋白的活性形式是同型二聚体。IL-5 受体（IL-5R）属于 I 型细胞因子受体家族，是由两条多肽链组成的异二聚体，一个 α 亚基与 IL-5 结合并赋予受体细胞因子特异性，另一个 β 亚基，包含信号转导域且不与 IL-5 结合。

长期以来，IL-5 与多种过敏性疾病的病因有关，包括过敏性鼻炎和哮喘，特别是过敏性哮喘病理学，人们普遍推测嗜酸性粒细胞在该疾病的病理学中具有重要作用。Mepolizumab 是一种人源化单克隆抗体，靶向 IL-5，通过高亲和力结合循环中的人 IL-5，空间位阻阻断 IL-5 与 IL-5R α 结合，从而抑制 IL-5R α / β c 复合物形成及下游 JAK2-STAT5 信号激活。临床用于重度嗜酸性粒细胞性哮喘、EGPA、HES、CRSwNP 等嗜酸性炎症疾病

IL-5RA（CD125）是 IL-5 受体的 α 亚基，负责特异性识别并结合 IL-5，但其胞内段无独立信号转导能力，必须与信号亚基 β c（CD131）组装成异源二聚体方能启动下游信号。野生型 TF-1 细胞虽内源性表达 β c，但缺乏 IL-5RA 表达，故无法依赖 IL-5 增殖。

吉满生物 H_IL-5RA TF-1 Cell Line 通过慢病毒介导在 TF-1 细胞中稳定过表达 IL-5RA，使其膜表面形成完整的 IL-5R α / β c 功能复合物，从而将 IL-5 转化为可驱动细胞存活与增殖的有效刺激信号，因此可适用于 IL-5/IL-5R α 靶向药物的活性评价。

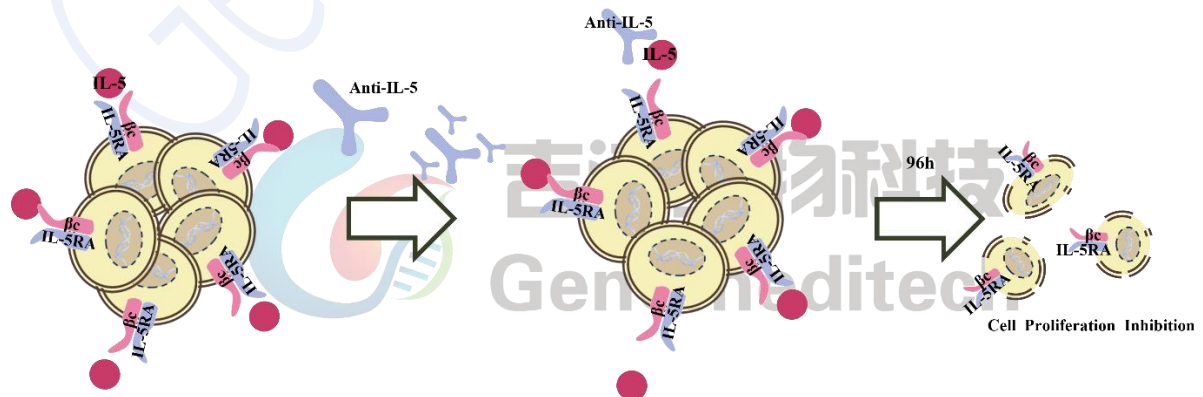


Fig 1. 信号通路图

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:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+2 ng/mL GM-CSF
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+2 ng/mL GM-CSF+0.25 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	500 mL	Thermo/15140-122
GM-CSF	10 ug	novoprotein/C003
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
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
Human IL-5 Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-88539RP
Anti-IL-5R hIgG1 Antibody(Benralizumab)	/	Genomeditech/GM-46851AB
GMTiter™ Luminescent Cell Viability Assay	1000T	Genomeditech/GM-040504C

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。在生物安全柜中将冻存管中的细胞悬液转移到第一步准备的离心管中，轻轻混匀， $176 \times g$ ，离心 5 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $4-6 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，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 3×10^6 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：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。

- 此细胞为人红系白血病细胞，淋巴瘤细胞，悬浮生长。
- 悬浮液中的大、单个、圆形细胞。细胞脱落大量积聚在培养物中的细胞质颗粒，注意不要与细菌混淆。
- 当细胞密度达到 $1-1.2 \times 10^6$ cells/mL，1 传 2-1 传 3，务必隔天传代，传代务必全量离心换液处理，不要让其密度超 1.2×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养，可通过计数控制细胞传代密度。较为有利。传代时可以直接向培养瓶中添加生长培养基，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：

- 为减少细胞质颗粒的出现，当细胞密度达到 $1-1.2 \times 10^6$ cells/mL 时，务必每隔一天进行传代。传代时需进行全量离心并更换培养液，确保合适的细胞密度和细胞因子浓度，否则可能会促进不依赖因子的亚克隆生长。
- 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. 细胞增殖实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐目的细胞 H_IL-5RA TF-1 Cell Line 细胞量为 5000 cells/孔。使用 Human IL-5 Protein; His Tag（14.0 kDa； 以下简称为 Human IL-5）作为增殖药物。起始浓度(Conc.01)为 140 ng/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 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-5	PBS	140 ng/mL	35 ng/mL	8.75 ng/mL	2.19 ng/mL	546.88 pg/mL	136.72 pg/mL	34.18 pg/mL	8.54 pg/mL	2.14 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 1-2 h，将细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，以 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，使用 Assay Buffer 洗涤细胞 3 遍，去除培养基中的 GM-CSF。再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 1×10^5 cells/mL。以排枪加 50 μ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖上班盖，于孵箱中孵育待用。
- 使用 1 个无菌 96 孔板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B11）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-5	1.53 mg/mL	15.3 μ g/mL	取 2 μ L 储液+198 μ L Assay Buffer

- 96 孔板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 80 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 60 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 中加入 1.49 μL Human IL-5），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 20 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.49 μL Human IL-5	加入	80 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 20 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）。
- i) 将步骤 a 孵育的细胞孔板取出。
- j) 加入梯度稀释好的药物，50 μL 每孔。
- k) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 96 h。
- l) 使用细胞活力检测试剂盒检测。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_IL-5RA TF-1 Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	140 ng/mL	2.14 pg/mL
	2319774	17786295	2030669

3) 验证结果

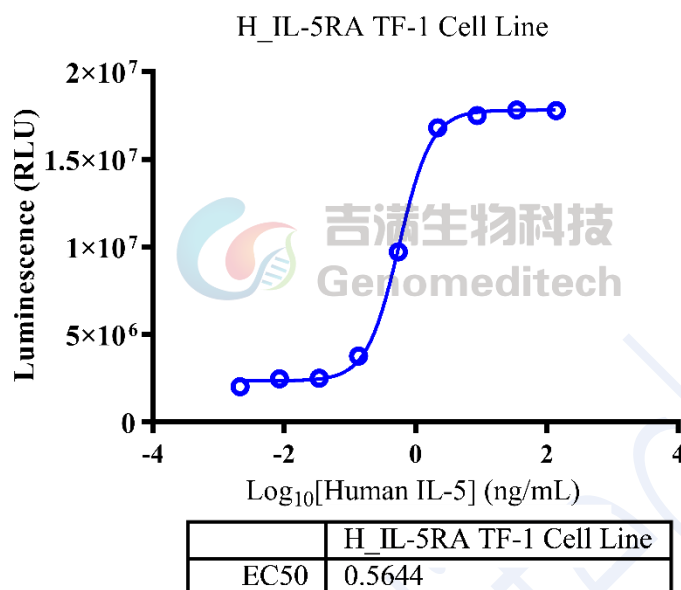


Fig 2. Cell proliferation assay. The H_IL-5RA TF-1 Cell Line (Cat. GM-C46352) at a density of 5000 cells/well (96-well format) was treated with serial dilutions of Human IL-5 Protein; His Tag (Cat. GM-88539RP) in assay buffer (RPMI 1640+10% FBS+1% P.S) for 96 hours. The firefly luciferase activity was measured the GMTiter™ Luminescent Cell Viability Assay (Cat. GM-040504).

附录 1 流式验证

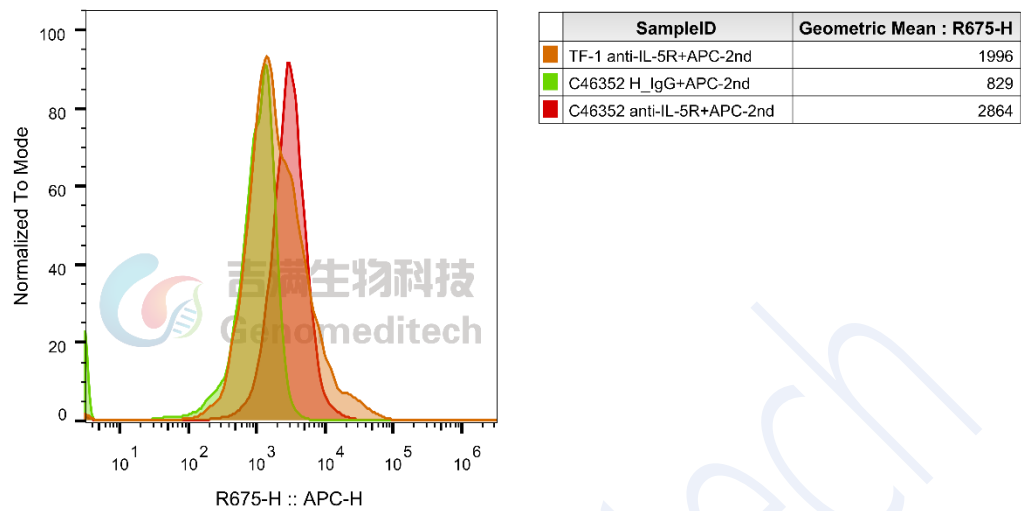


Fig 3. H_IL-5RA TF-1 Cell Line (Cat. GM-C46352) was determined by flow cytometry using Anti-IL-5R hIgG1 Antibody(Benralizumab)(Cat. GM-46851AB).

相关产品

IL-4/IL-13	
IL-4 Reporter Cell Line	IL-4/IL-13 Reporter 293 Cell Line
IL-4/IL-13 Reporter 293 DDX35TM Cell Line	Cynomolgus_IL4R CHO-K1 Cell Line
H_IL4R CHO-K1 Cell Line	H_IL4R CHO-K1 Cell Line (Low Expression)
H_IL4R HEK-293 Cell Line	Mouse_IL4R CHO-K1 Cell Line
Anti-IL13 hIgG4 Reference Antibody (Lebribo)	Anti-IL-4R hIgG1 Antibody(12B5)
Anti-IL4R hIgG4 Antibody(Dupilumab)	Anti-IL4R hIgG4 Reference Antibody (Dupbio)
Anti-IL-4R×IL31 hIgG4 Reference Antibody (PRO2198)	Anti-Mouse IL-4RA mIgG1 Antibody
Biotinylated Human IL-4R alpha Protein; Avi-His Tag	Cynomolgus IL-13 Protein; His Tag
Cynomolgus IL-4 Protein; His Tag	Cynomolgus IL-4R alpha Protein; His Tag
Human IL-13 Protein; His Tag	Human IL-13RA1 Protein; hFc Tag
Human IL-13RA1 Protein; His Tag	Human IL-4 Protein; His Tag
Human IL-4R alpha Protein; hFc Tag	Human IL-4R alpha Protein; His Tag
Human IL-4R alpha Protein; mFc Tag	Mouse IL-13 Protein; His Tag
Mouse IL-4R alpha Protein; His Tag	Rat IL-4R alpha Protein; His Tag
TSLP:TSLPR	
H_TSLP Reporter 293 Cell Line	H_TSLP Reporter Cell Line
H_TSLPR CHO-K1 Cell Line	H_TSLPR IL7RA BaF3 Cell Line
Anti-H_TSLPR hIgG1 Antibody	Anti-TSLP hIgG2 Antibody(Tezepelumab)
Anti-TSLP hIgG2 Reference Antibody (Tezbio)	
Biotinylated Human TSLP Protein; His-Avi Tag	Cynomolgus TSLP Protein; His Tag
Human TSLP Protein; hFc Tag	Human TSLP Protein; His Tag
Human TSLPR Protein; hFc Tag	Human TSLPR Protein; His Tag
IL-5	
H_IL-5 Reporter 293 Cell Line	Cynomolgus_IL-5RA HEK-293 Cell Line
H_IL-5RA CHO-K1 Cell Line	H_IL-5RA HEK-293 Cell Line
Anti-IL5 hIgG4 Antibody(Reslizumab)	Anti-IL-5R hIgG1 Antibody(Benralizumab)
Human IL-5 Protein; hFc Tag	Human IL-5 Protein; His Tag

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。