

产品手册

H_TSLPR IL7RA BaF3 Cell Line

H_TSLPR IL7RA BaF3 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.3

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. | Assay 实验..... | 7 |
| 1) | 加样步骤..... | 7 |
| 2) | 功能检测..... | 8 |
| 3) | 验证结果..... | 9 |
| 附录： | 流式验证结果..... | 10 |
| 相关产品..... | | 11 |
| 使用许可协议：..... | | 11 |

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-C15622 | H_TSLPR IL7RA BaF3 Cell Line | 5E6 Cells/mL |

组成成分

| 产品编号 | 产品名称 | 规格 | 数量 | 储存 |
|-----------|------------------------------|--------------|-----|--------|
| GM-C15622 | H_TSLPR IL7RA BaF3 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。

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传递信号。TSLP 引导的复合体通过提高受体表面稳定性与信号时空持续性，强化树突状细胞、上皮细胞与辅助性 T 细胞（尤其 Th2/Tfh 样程序）的功能极化，促进 IL-4/IL-5/IL-13 等 II 型炎症因子的产生，并与屏障组织炎症、过敏反应和哮喘等病理过程密切相关。

天然的 BaF3 细胞是小鼠的前 B 淋巴细胞，其存活依赖于小鼠 IL-3。H_TSLPR IL7RA BaF3 Cell Line 在 BaF3 细胞系中组成型表达人 TSLPR 和人 IL-7R α 基因后，细胞可不只依赖小鼠 IL-3，也依赖人 TSLP 增殖。这种“生存依赖”的特性，使得该细胞系成为检测 TSLP 活性及其中和抑制剂的非常灵敏且特异的工具。

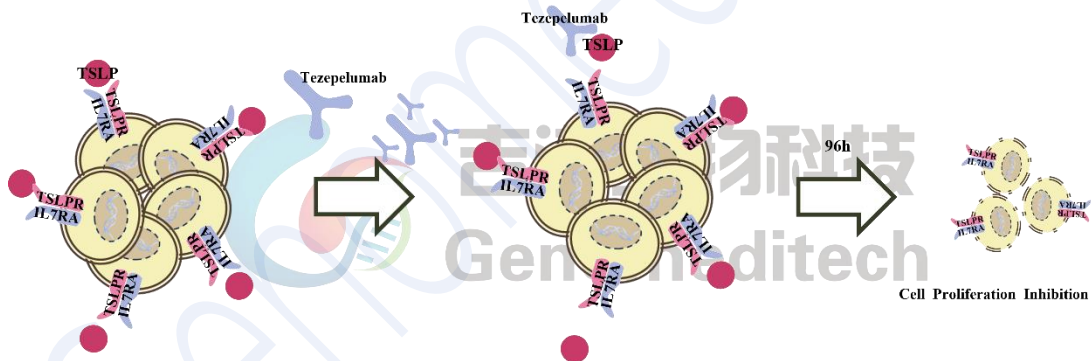


Fig 1. 示意图

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+200 ng/mL TSLP |
| 细胞生长培养基: | RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+200 ng/mL TSLP+400 μg/mL G418+1 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(P.S) | 100 mL | Thermo/15140-122 |
| Human TSLP Protein; His Tag | / | Genomeditech/GM-87654RP |
| G418 | 1 g | Genomeditech/ GM-040402-1 |
| Puromycin | 25 mg | Genomeditech/GM-040401-1 |
| 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 |
| Anti-TSLP hIgG2 Reference Antibody (Tezbio) | / | Genomeditech/GM-87344MAB |
| PE anti-human TSLPR (TSLP-R) Antibody | 25 tests | Biologend/322805 |
| Anti-H_IL-7Rα hIgG4 Antibody(lusvertikimab) | / | Genomeditech/GM-32425AB |
| GMTiter™ Luminescent Cell Viability Assay | 1000T | Genomeditech/GM-040504 |

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 5 min，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 cm^2 ），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。
- FBS 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. Assay 实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TSLPR IL7RA BaF3 Cell Line 细胞量为 1×10^3 cells/孔。本次实验分别使用 Anti-TSLP hIgG2 Reference Antibody (Tezbio) (150 kDa)（以下简称 Tezepelumab）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围孔加入 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 | Tezepelumab | 100.00 $\mu\text{g/mL}$ | 33.33 $\mu\text{g/mL}$ | 11.11 $\mu\text{g/mL}$ | 3.70 $\mu\text{g/mL}$ | 1.23 $\mu\text{g/mL}$ | 411.52 ng/mL | 137.17 ng/mL | 45.72 ng/mL | 15.24 ng/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；使用 Assay Buffer 清洗细胞 3 遍后，再使用 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 3×10^4 cells/mL。用排枪加 33.3 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖板上盖，于孵箱中孵育备用。
- 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。
- 准备母液

| 药物名称 | 储液 | 母液 | 配置方法 |
|--------------------|------------|------------|--|
| Tezepelumab | 8.67 mg/mL | / | 直接使用储液 |
| Human TSLP Protein | 1.2 mg/mL | 0.12 mg/mL | 取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer |

- 96 孔板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 59.4 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 39.6 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 B2 中加入 2.15 μL Tezepelumab），混匀。

| 母液吸取 | | 梯度稀释孔，依次从前孔吸取 19.8 μL ，加入次孔 | | | | | | | | | | 对照孔 |
|------|-----------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | 2.15 μL Tezepelumab | 加入 | 59.4 μL | 39.6 μL | 39.6 μL | 39.6 μL | 39.6 μL | 39.6 μL | 39.6 μL | 39.6 μL | 39.6 μL | 39.6 μL |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 19.8 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) 配置 3 倍终浓度 90 ng/mL 的 TSLP 蛋白（取 4.5 μL 加入到 5940 μL Assay Buffer 中）。
- j) 然后向药物梯度孔板（步骤 h）中各加入 33 μL 浓度为 90 ng/ml 的 TSLP 蛋白，孵育 1h。
- k) 将步骤 a 孵育的孔板取出。
- l) 加入步骤 j 准备好的混合药物，每孔 66 μL 。
- m) 盖上班盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 96 h。
- n) 使用 GMTiter™ 细胞活力检测试剂盒检测。

2) 功能检测

| | | | |
|--|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| H_TSLPR IL7RA BaF3 Cell Line + 30 ng/mL TSLP | 0 $\mu\text{g/mL}$ Tezepelumab | 100 $\mu\text{g/mL}$ Tezepelumab | 15.24 ng/mL Tezepelumab |
| | 15955045 | 311490 | 15502501 |

3) 验证结果

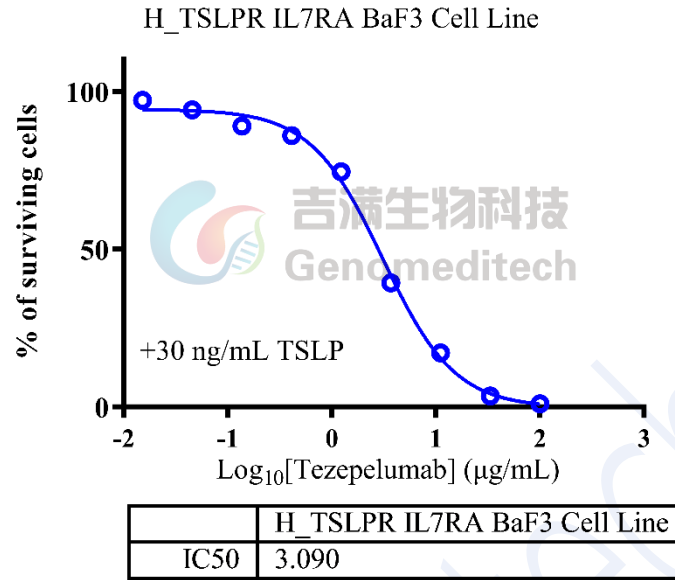


Fig 2. Cell proliferation assay. The H_TSLPR IL7RA BaF3 Cell Line (Cat. GM-C15622) at a concentration of 1E3 cells/well (96-well format) was treated with serial dilutions of Anti-TSLP hIgG2 Reference Antibody (Tezbio)(Cat. GM-87344MAB) in assay buffer (RPMI 1640+10% FBS+1% P.S) for 96 hours. The firefly luciferase activity was measured using the GMTiter™ Luminescent Cell Viability Assay (Cat. GM-040504).

附录：流式验证结果

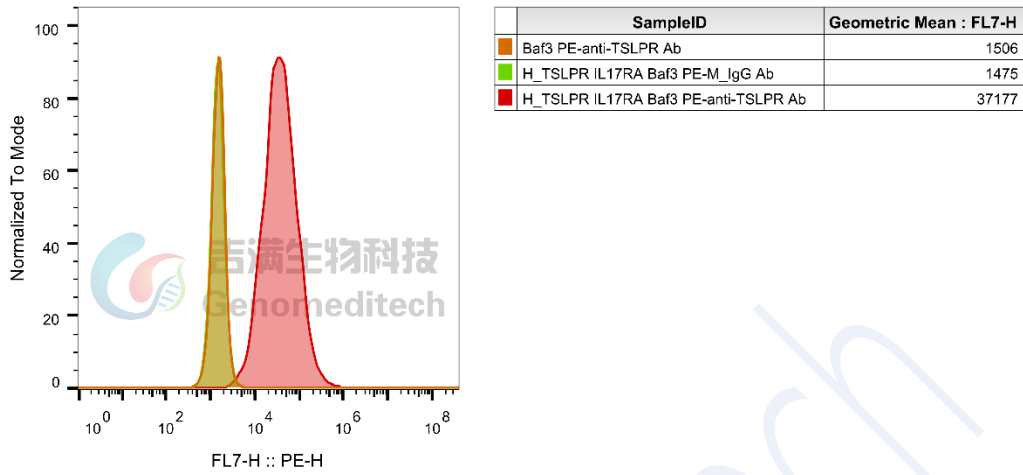


Fig 3. H_TSLPR IL7RA BaF3 Cell Line (Cat. GM-C15622) was determined by flow cytometry using PE anti-human TSLPR (TSLP-R) Antibody (Biolegend/322805).

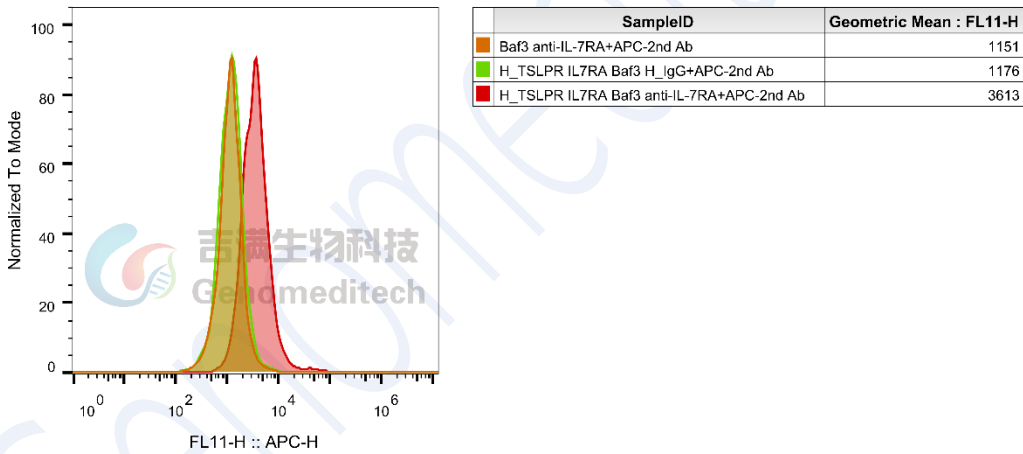


Fig 4. H_TSLPR IL7RA BaF3 Cell Line (Cat. GM-C15622) was determined by flow cytometry using Anti-H_IL-7R α hIgG4 Antibody(lusvertikimab) (Cat. GM-32425AB).

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 | Mouse_IL4R CHO-K1 Cell Line |
| Anti-IL-4R hIgG1 Antibody(12B5) | Anti-IL4R hIgG4 Antibody(Dupilumab) |
| Anti-IL4R hIgG4 Reference Antibody (Dupbio) | |
| Biotinylated Human IL-4R alpha Protein; Avi-His Tag | Cynomolgus IL-13 Protein; His Tag |
| Cynomolgus IL-4R alpha 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 | |
| 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 | 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) |

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。