

产品手册

H_IL-31RA OSMR Baf3 Cell Line

H_IL-31RA OSMR 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：V2.12.2

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.	Anti-IL31RA 抗体 Assay 验证	7
1)	加样步骤	7
2)	功能检测	8
3)	验证结果	9
2.	Anti-IL31 抗体 Assay 实验	10
1)	加样步骤	10
2)	功能检测	11
3)	验证结果	12
附录：	流式验证结果	13
相关产品		14
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-C29783	H_IL-31RA OSMR 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-C29783	H_IL-31RA OSMR 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

白细胞介素-31 (IL-31) 是一种新型细胞因子，其受体与 IL-6 受体相似，因此归属于 IL-6 细胞因子家族。其主要由活化的 CD4⁺T 淋巴细胞分泌，特别是活化的辅助性 Th2 细胞、肥大细胞、巨噬细胞以及树突状细胞等。IL-31 主要通过感知周围神经系统的瘙痒来调节皮肤中细胞介导的免疫力，通过增加气道炎症调节肺部的免疫力，并通过防御微生物来调节肠道中的免疫力。

IL-31 通过 IL31RA 和 OSMR(oncostatin M receptor)受体形成异源二聚体复合物传递信号。其信号通路与慢性瘙痒性皮肤病（如特应性湿疹）密切相关。针对 IL-31 或 IL-31 受体的单克隆抗体相关药物可以有效地减少瘙痒和睡眠障碍，改善皮肤病变，并最大限度地减少局部类固醇的使用。

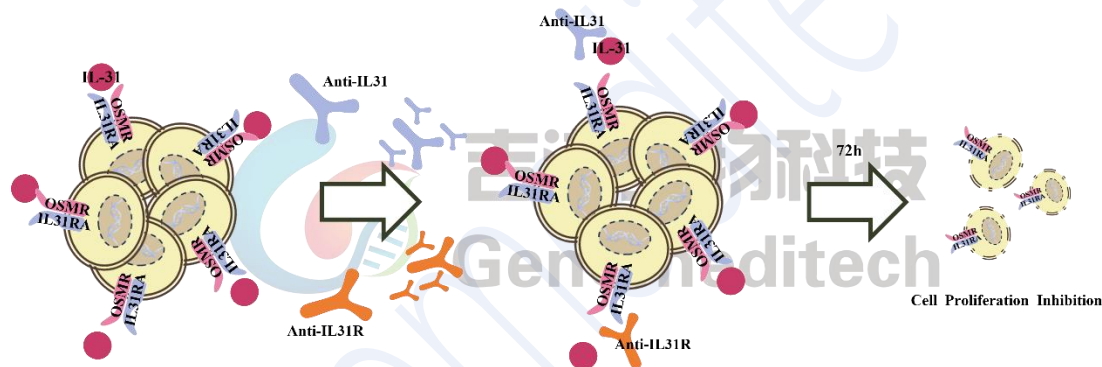


Fig 1. 信号通路图

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+8 ng/mL M_IL3
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+8 ng/mL M_IL3+50 µg/mL G418+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.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
G418	1 g	Genomeditech/ GM-040402-1
Recombinant Mouse IL-3 Protein	50 µg	Novoprotein/CP39
Pen/Strep(P.S)	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell BIOSCIENCES/C3010-0500
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-IL31 hIgG1 Antibody(mAb33)	/	Genomeditech/GM-50883AB
Anti-IL31RA hIgG2 Antibody(Nemolizumab)	/	Genomeditech/GM-50871AB
Anti-OSMR hIgG4 Antibody(Vixarelimab)	/	Genomeditech/GM-50874AB
Human IL-31 / IL31 Protein (His Tag)	10 µg	Sino Biological/11557-H08H
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 3min，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 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

1. Anti-IL31RA 抗体 Assay 验证

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_IL-31RA OSMR Baf3 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验分别使用 Anti-IL31RA hIgG2 Antibody(Nemolizumab)（以下简称为 Anti-IL31RA）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ ，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	Anti-IL31RA	PBS	10 μg/mL	2.5 μg/mL	625 ng/mL	156.25 ng/mL	39.06 ng/mL	9.77 ng/mL	2.44 ng/mL	610.35 pg/mL	152.59 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；使用 Assay Buffer 清洗细胞 2 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 3×10^5 cells/mL。用排枪加 $33.3 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上市盖，于孵箱中孵育使用。

- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-IL31RA hIgG2 Antibody(Nemolizumab)	2.21 mg/mL	/	直接使用储液
Human IL-31 / IL31 Protein (His Tag)	10 $\mu\text{g/mL}$	/	直接使用储液

- 96 孔 V 孔板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 $47.74 \mu\text{L}$ Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 $36.3 \mu\text{L}$ Assay Buffer。

- e) 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 0.66 μL Anti-IL31RA），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 12.1 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.66 μL Anti-IL31RA	加入	47.74 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- f) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 12.1 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- g) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- h) 配置 3 倍终浓度 6 ng/ml 的 IL-31 蛋白（取 0.2 μL 加入到 333.1 μL Assay Buffer 中）
- i) 将步骤 a 孵育的孔板取出。
- j) 加入步骤 h 准备好的梯度稀释的药物，每孔 33 μL ，孵育 1h。
- k) 然后每孔再加入 33 μL 浓度为 6 ng/ml 的 IL-31 蛋白。
- l) 盖上板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 72 h。
- m) 使用 GMTiter™ 细胞活力检测试剂盒检测。

2) 功能检测

H_IL-31RA OSMR Baf3 Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$ Anti-IL31RA+2 ng/mL IL-31	10 $\mu\text{g/mL}$ Anti- IL31RA+2 ng/mL IL- 31	152.59 pg/mL Anti- IL31RA+2 ng/mL IL- 31
	24144410	563776	27854595

3) 验证结果

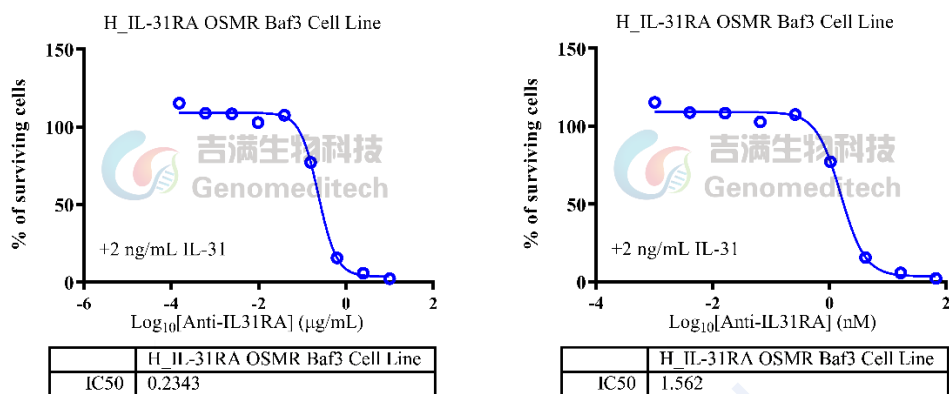


Fig 2. 使用 Anti-IL31RA 杀伤验证结果

换算方法：活细胞百分比=（加药孔-assay buffer 孔）/（不加药孔-assay buffer 孔）

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. Anti-IL31 抗体 Assay 实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_IL-31RA OSMR Baf3 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验分别使用 Anti-IL31 hIgG1 Antibody(mAb33) (150 kDa) （以下简称 Anti-IL31）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ ，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	Anti-IL31	PBS	10 μg/mL	2.5 μg/mL	625 ng/mL	156.25 ng/mL	39.06 ng/mL	9.77 ng/mL	2.44 ng/mL	610.35 pg/mL	152.59 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；使用 Assay Buffer 清洗细胞 2 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 3×10^5 cells/mL。用排枪加 $33.3 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上市盖，于孵箱中孵育使用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-IL31 hIgG1 Antibody(mAb33)	2.55 mg/mL	/	直接使用储液
Human IL-31 / IL31 Protein (His Tag)	$10 \mu\text{g/mL}$	/	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 $47.82 \mu\text{L}$ Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 $36.3 \mu\text{L}$ 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 $0.58 \mu\text{L}$ Anti-IL31），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 12.1 μ L，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.58 μ L Anti-IL31	加入	47.82 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 12.1 μ L，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 6 ng/mL 的 IL-31 蛋白（取 0.2 μ L 加入到 333.1 μ L Assay Buffer 中）。
- j) 然后向药物梯度孔板（步骤 h）中各加入 33 μ L 浓度为 6 ng/mL 的 IL-31 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 μ L。
- m) 盖上车盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 72 h。
- n) 使用 GMTiter™ 细胞活力检测试剂盒检测。

2) 功能检测

H_IL-31RA OSMR Baf3 Cell Line	0 μ g/mL Anti-IL31+2 ng/mL IL-31	10 μ g/mL Anti-IL31+2 ng/mL IL-31	152.59 pg/mL Anti-IL31+2 ng/mL IL-31
	2431661	36865	2528413

3) 验证结果

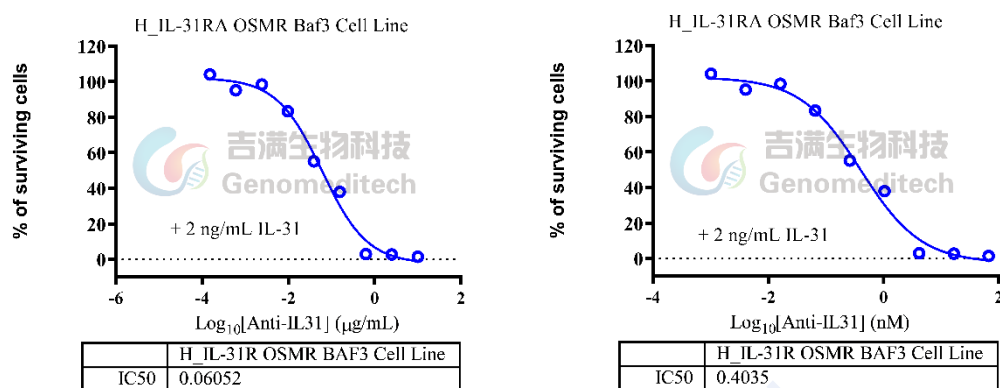


Fig 3. 使用 Anti-IL31 杀伤验证结果

换算方法：活细胞百分比=（加药孔-assay buffer 孔）/（不加药孔-assay buffer 孔）

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

附录：流式验证结果

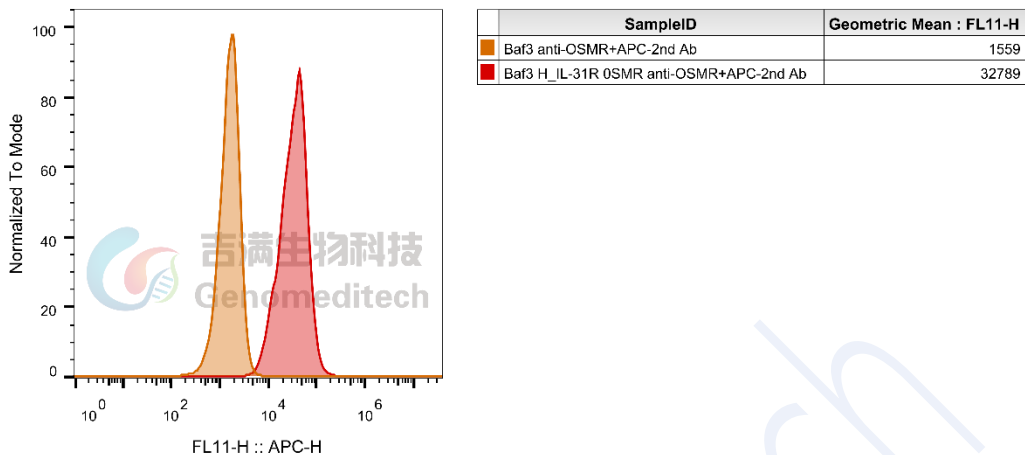


Fig 4. H_IL-31RA OSMR Baf3 Cell Line 使用 Anti-OSMR hIgG4 Antibody(Vixarelimab)抗体流式验证 OSMR 的表达

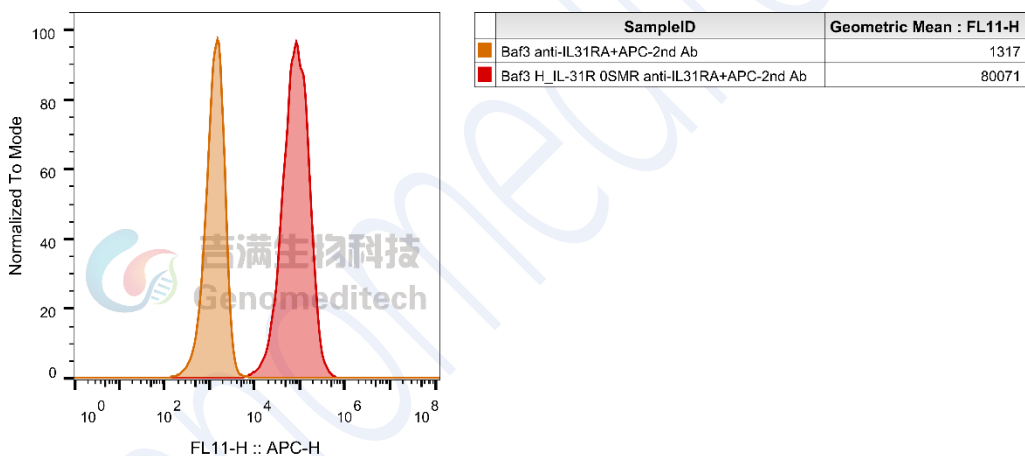


Fig 5. H_IL-31RA OSMR Baf3 Cell Line 使用 Anti-IL31RA hIgG2 Antibody(Nemolizumab)抗体流式验证 IL31RA 的表达

相关产品

OX40	
H_OX40 Reporter Cell Line	Cynomolgus_OX40L CHO-K1 Cell Line
H_OX40 CHO-K1 Cell Line	H_OX40L CHO-K1 Cell Line
H_OX40L HEK-293 Cell Line	
Anti-H_OX40 hIgG2 Antibody(Ivuxolimab)	Anti-OX40L hIgG1 Reference Antibody(Oxebio)
Anti-OX40L hIgG4 Antibody(Amlitelimab)	Anti-OX40L hIgG4 Reference Antibody(Amlbio)
Biotinylated Human OX40L Protein; His-Avi Tag	Cynomolgus OX40 Protein; His Tag
Cynomolgus OX40L Protein; His Tag	Cynomolgus OX40L Protein; mFc Tag
Human OX40 Protein; His Tag	Human OX40L Protein; His Tag
Human OX40L Protein; mFc Tag	
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	
Anti-IL-4R hIgG1 Antibody(12B5)	Anti-IL4R hIgG4 Antibody(Dupilumab)
Anti-IL4R hIgG4 Reference Antibody (Dupbio)	
Human IL-4R alpha Protein; mFc Tag	
IL-31	
Cynomolgus_IL-31RA OSMR Reporter Baf3 Cell Line	H_IL-31 Reporter Cell Line
Cynomolgus_IL31RA CHO-K1 Cell Line	H_IL31RA CHO-K1 Cell Line
H_IL31RA HEK-293 Cell Line	
Anti-IL31 hIgG1 Antibody(mAb33)	Anti-IL31RA hIgG1 Antibody(NA633)
Anti-IL31RA hIgG2 Antibody(Nemolizumab)	Anti-OSMR hIgG4 Antibody(Vixarelimab)
MRGPRX2	
H_MRGPRX2 Reporter Cell Line	Cynomolgus_MRGPRX2 CHO-K1 Cell Line
Cynomolgus_MRGPRX2 HEK-293 Cell Line	H_MRGPRX2 CHO-K1 Cell Line
H_MRGPRX2 HEK-293 Cell Line	Mouse_MRGPRX2 CHO-K1 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。

Genomeditech