

产品手册

H_TSLP Reporter 293 Cell Line

H_TSLP 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：V2.11.1

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.....	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.	激活剂验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	抑制实验.....	9
	加样步骤.....	9
	报告基因检测.....	10
	验证结果.....	10
附录 1	功能检测结果.....	11
附录 2	流式检测结果.....	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-C26459	H_TSLP 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-C26459	H_TSLP 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

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。

吉满生物 H_TSLP Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系，是一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 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，激活下游信号，从而导致荧光素酶（Luciferase）的表达。通过加入特定的拮抗型抗体，阻断由此激活的下游信号通路。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 TSLP 相关药物的体外效果评价。

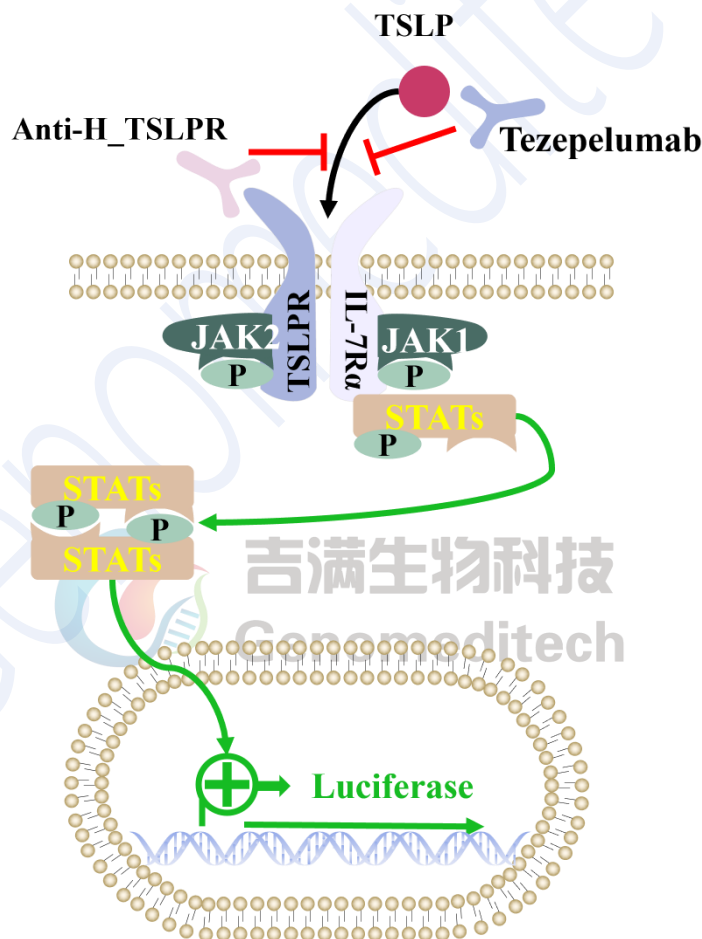


Fig 1.原理示意图

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:	DMEM+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin+400 µg/mL G418+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
G418	1g	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	96-well	Corning/3912
Microplate		
Human TSLP Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-87654RP
Anti-H_IL-7Rα hIgG4 Antibody(lusvertikimab)	/	Genomeditech/GM-32425AB
Anti-H_TSLPR hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-31018AB
Anti-TSLP hIgG2 Reference Antibody(Tezbio)	/	Genomeditech/GM-87344MAB
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°C ，因为在 -70°C 下储存会导致活性丧失。

- 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\times$ 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°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。

- 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 1:3-1:4，2-3 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

注意事项：

- 细胞刚复苏，死细胞较多，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 血清需 56 $^{\circ}\text{C}$ 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. 激活剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TSLP Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。使用激活剂：Human TSLP Protein; His Tag (15.1 kDa)起始终浓度(Conc.01)为 5 $\mu\text{g/mL}$ ，5 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.011 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围为 100 μL 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	
B	Human TSLP	5 μg/mL	1 μg/mL	200 ng/mL	40 ng/mL	8 ng/mL	1.6 ng/mL	320 pg/mL	64 pg/mL	12.8 pg/mL	2.56 pg/mL	512 fg/mL	0
C		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，使用完全培养基重悬，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 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上市盖，于孵箱中孵育过夜。
- 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）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human TSLP Protein; His Tag	1.2 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 B1 孔加入 150 μL Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 144 μL 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 B1 中加入 0.63 μL Human TSLP），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 36 μ L，加入次孔											对照组
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.63 μ L Human TSLP 加入	150 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B1 中吸取 36 μ L，加入到第 2 个梯度稀释孔 B2，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11）。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。
- j) 加入步骤 h 准备好的梯度稀释液，每孔 100 μ L。
- k) 盖上板盖，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。

H_TSLP Reporter 293 Cell Line	0 μ g/mL	5 μ g/mL	512.00 fg/mL
	4833	712707	4583

3) 验证结果

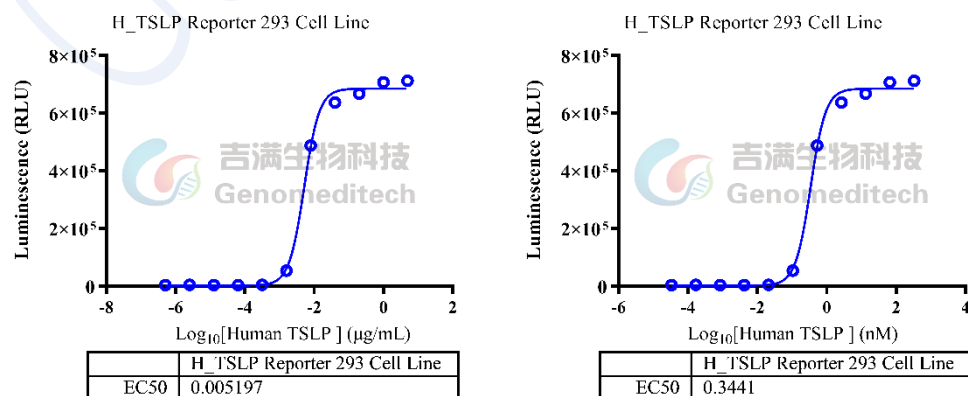


Fig 2.TSLP 激活验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. 抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TSLP Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。使用 Anti-TSLP hIgG2 Reference Antibody(Tezbio) (以下简称 Tezepelumab;150 kDa)作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围为 100 μL 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	
B	Tezepelumab	PBS	30 μg/mL	7.5 μg/mL	1.88 μg/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	
D													
E													
F													
G													
H													

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 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- 准备母液

抗体名称	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 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 80 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 60 μL 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 0.56 μL Tezepelumab），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
0.56 μL Tezepelumab	加入	80 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	55 μL	

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 20 μ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 混匀。
- h) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- i) 配置 2 $\times$ 激活剂: 40 ng/mL TSLP Protein (0.22 μ L 0.12 mg/mL TSLP Protein 母液加入到 660 μ L Assay Buffer 中, 混匀后使用)。
- j) 取出步骤 h 的梯度稀释孔板, 加入步骤 i 准备好的 TSLP Protein 溶液, 每孔 60 μ L。孵育 1 h。
- k) 1 h 后将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出, 吸弃上清。然后加入步骤 j 孵育好的混合溶液, 每孔加入 100 μ L。盖上盖板, 继续孵育 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TSLP Reporter 293 Cell Line	0 μ g/mL	30 μ g/mL	457.76 μ g/mL
	354282	3614	427586

验证结果

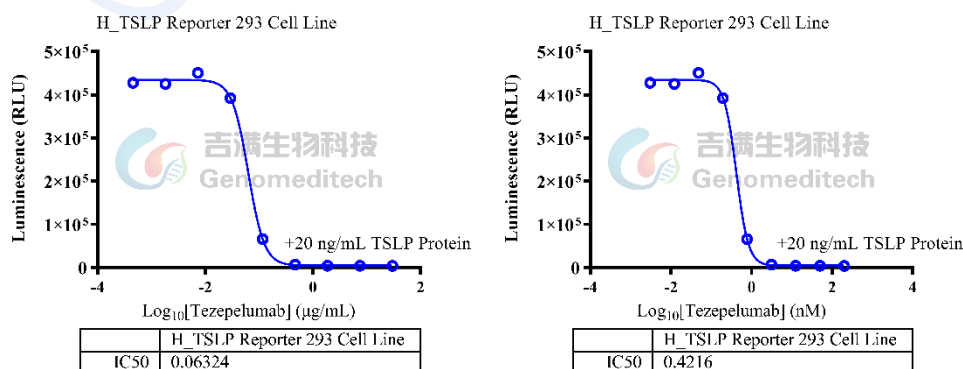


Fig 3. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1 功能检测结果

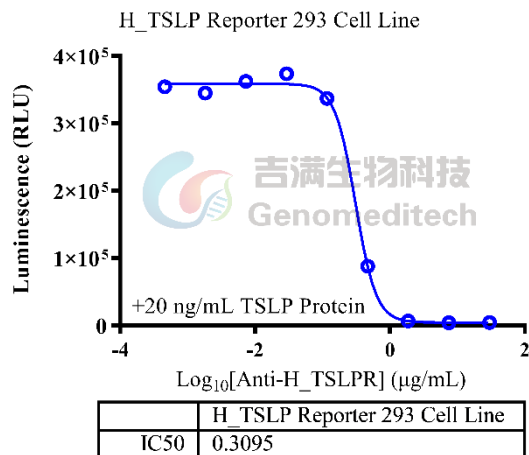


Fig 4. 使用 Anti-H_TSLPR hIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-31018AB) 功能检测结果

附录 2 流式检测结果

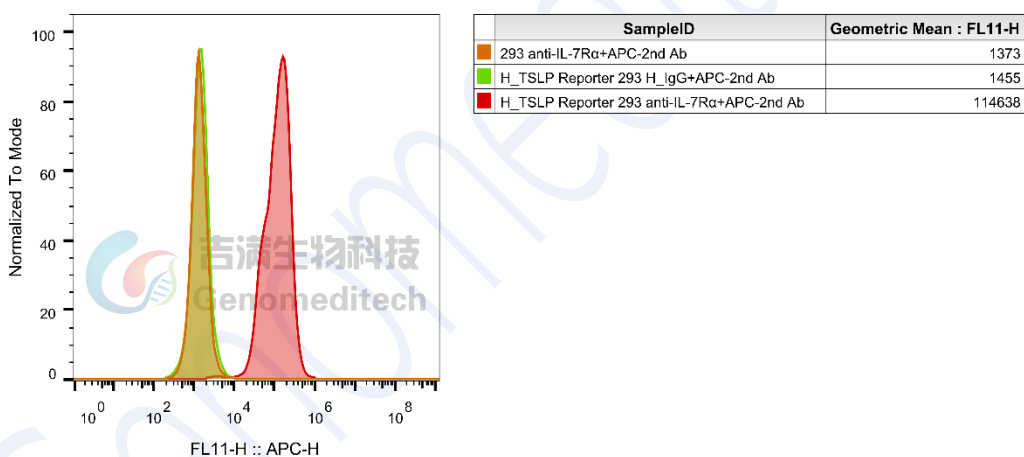


Fig 5. 使用 Anti-H_IL-7Rα hIgG4 Antibody(lusvertikimab) (Genomeditech/GM-32425AB) 抗体流式检测结果

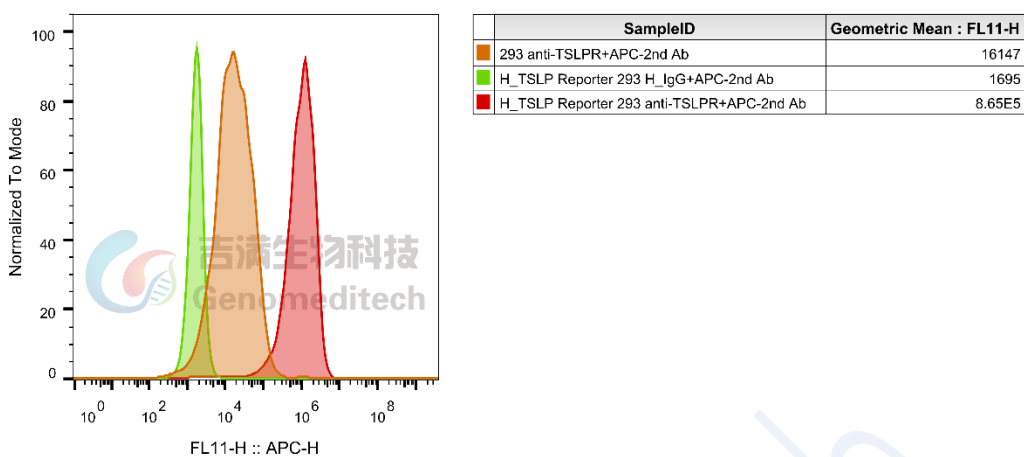


Fig 6. 使用 Anti-H_TSLPR hIgG1 Antibody (Genomeditech/GM-31018AB) 抗体流式检测结果

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	
Anti-IL-4R hIgG1 Antibody(12B5)	Anti-IL4R hIgG4 Antibody(Dupilumab)
Anti-IL4R hIgG4 Reference Antibody (Dupbio)	Cynomolgus IL-4R alpha Protein; His Tag
Human IL-4R alpha Protein; His Tag	
Human IL-4R alpha Protein; mFc Tag	
TSLP:TSLPR	
H_TSLP Reporter Cell Line	H_TSLPR CHO-K1 Cell Line
Anti-H_TSLPR hIgG1 Antibody	Anti-TSLP hIgG2 Reference Antibody(Tezbio)
Anti-TSLP hIgG2 Antibody(Tezepeumab)	
Biotinylated Human TSLP Protein; His-Avi Tag	Cynomolgus TSLP Protein; His Tag
Human TSLP 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。
- 用户不允许以任何方式修改细胞系，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。
- 如需对产品进行第三方转让、商业开发或临床前、临床试验期间的药物功能验证、商业化生产检测使用等超出本声明的应用，须另行获得吉满生物科技（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。