

## 产品手册

### H\_IL-31 Reporter DDX35<sup>TM</sup> Cell Line

### H\_IL-31 Reporter DDX35<sup>TM</sup> 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、 | 传代稳定性 .....             | 5  |
| 1. | 功能验证结果 .....            | 5  |
| 2. | 流式验证结果 .....            | 6  |
| 五、 | 材料准备 .....              | 7  |
| 1. | 细胞培养、冻存、复苏试剂准备 .....    | 7  |
| 2. | 试剂耗材准备 .....            | 7  |
| 六、 | 细胞复苏、传代、冻存 .....        | 8  |
| 1. | 细胞复苏 .....              | 8  |
| 2. | 细胞传代（以 10 cm 皿为例） ..... | 8  |
| 3. | 细胞冻存 .....              | 8  |
| 七、 | 使用方法（示例） .....          | 9  |
| 1. | Assay 验证实验 .....        | 9  |
| 1) | 加样步骤 .....              | 9  |
| 2) | 报告基因检测 .....            | 10 |
| 3) | 验证结果 .....              | 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-C39598 | H_IL-31 Reporter DDX35 <sup>TM</sup> Cell Line | 5E6 Cells/mL |

### 组成成分

| 产品编号      | 产品名称                                           | 规格           | 数量  | 储存     |
|-----------|------------------------------------------------|--------------|-----|--------|
| GM-C39598 | H_IL-31 Reporter DDX35 <sup>TM</sup> 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<sup>+</sup>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。

吉满生物 H\_IL-31 Reporter DDX35™ Cell Line 报告基因细胞系，专为高效评价 IL-31 及其相关药物的体外活性而设计。该细胞系在 IL-31 与 IL-31RA/OSMR 受体结合后，可激活下游信号通路，并驱动荧光素酶 (Luciferase) 表达。通过检测 Luciferase 活性，即可直接反映信号通路的激活程度，实现药物效果的灵敏定量分析。该细胞系经多轮单克隆筛选，兼具高稳定性、高灵敏度与高信噪比，适用于批量建库、药物放行检测及标准化实验流程。

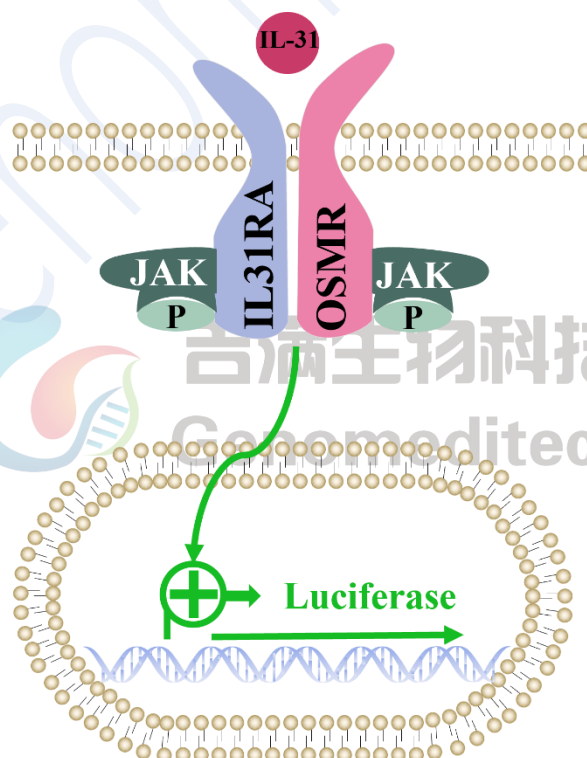


Fig 1. 信号通路图

## 四、 传代稳定性

### 1. 功能验证结果

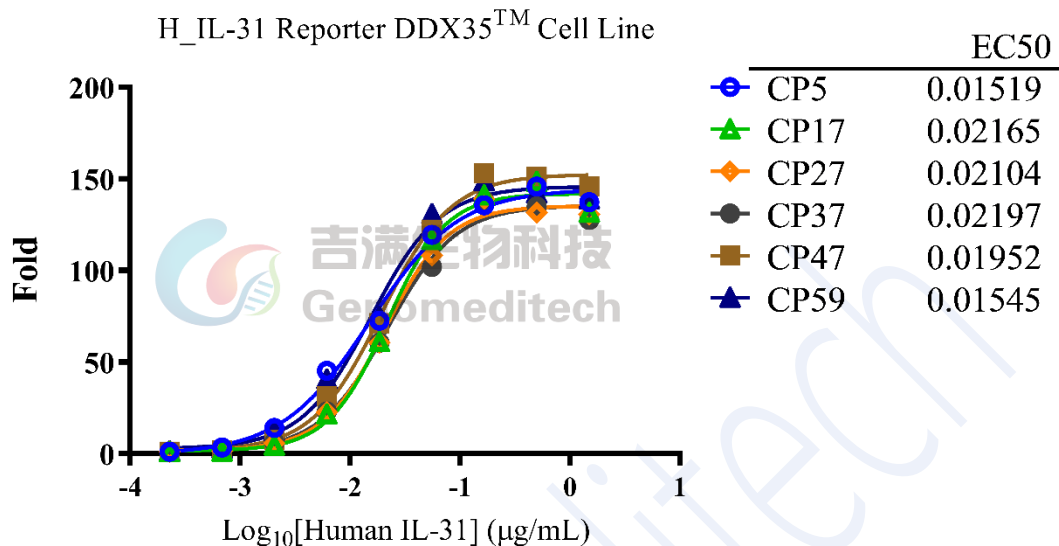


Fig 2. 制备 Recombinant Human IL-31 Protein (Sino Biological/11557-H08H) 梯度稀释液; 提前 16-24 h 配置 H\_IL-31 Reporter DDX35<sup>TM</sup> Cell Line (Genomeditech/# GM-C39598), 每孔细胞量  $1.5 \times 10^4$  个。将过夜培养的细胞吸弃上清, 加入稀释好的 Human IL-31, 孵育 6 h 后检测 Luciferase 数值, 使用 GraphPad 系统进行数据分析, 纵坐标转换为倍率。结果显示, 不同代次间倍率、EC50 数值稳定。

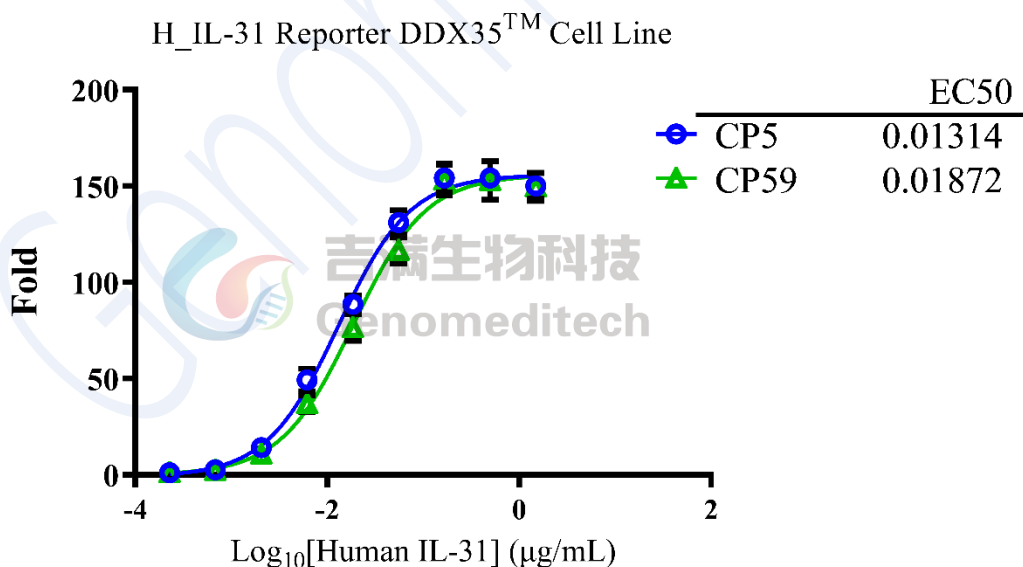


Fig 3. 制备 Recombinant Human IL-31 Protein (Sino Biological/11557-H08H) 梯度稀释液; 提前 16-24 h 配置 H\_IL-31 Reporter DDX35<sup>TM</sup> Cell Line (Genomeditech/# GM-C39598), 每孔细胞量  $1.5 \times 10^4$  个。将过夜培养的细胞吸弃上清, 加入稀释好的 Human IL-31, 3 复孔, 孵育 6 h 后检测 Luciferase 数值, 使用 GraphPad 系统进行数据分析, 纵坐标转换为倍率。结果显示, P5 代与 P59 代倍率、EC50 数值稳定。

## 2. 流式验证结果

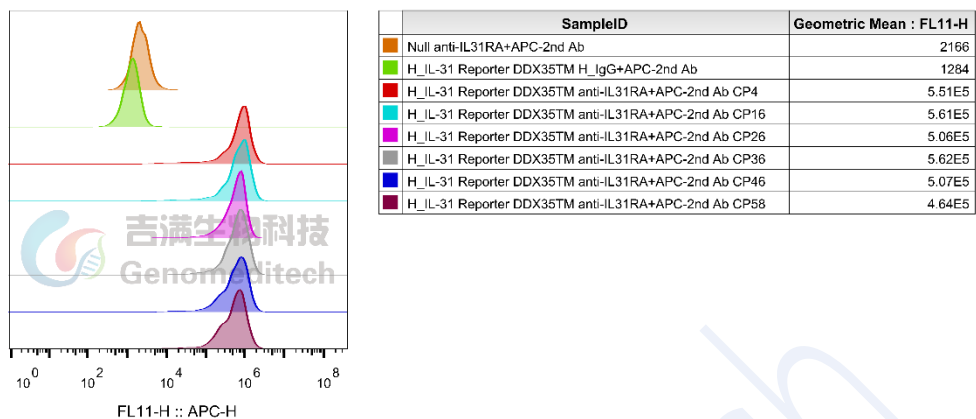


Fig 4.使用 Anti-IL31RA hIgG2 Reference Antibody (Nemobio) (Genomeditech/GM-88053MAB)流式验证结果

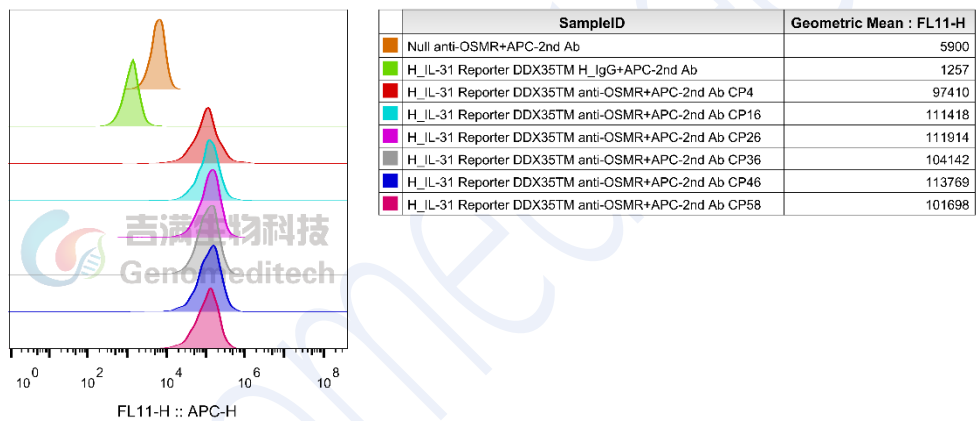


Fig 5.使用 Anti-OSMR hIgG4 Reference Antibody (Vixabio) (Genomeditech/GM-88055MAB)流式验证结果

## 五、 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 Microplate | 96-well       | Corning/3912               |
| Recombinant Human IL-31 Protein (His Tag)                    | 10 µg         | Sino Biological/11557-H08H |
| Anti-IL31RA hIgG2 Reference Antibody (Nemobio)               | /             | Genomeditech/GM-88053MAB   |
| Anti-OSMR hIgG4 Reference Antibody (Vixabio)                 | /             | Genomeditech/GM-88055MAB   |
| 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      |

## 六、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。
- 通过补加复苏培养基的形式，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  $5 \times 10^6$  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 1:3-1:4，2-3 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℃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 需 56℃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。

## 七、 使用方法（示例）

### 1. Assay 验证实验

操作步骤可根据示例调整优化，对于本次实验，推荐 H\_IL-31 Reporter DDX35™ Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 Human IL-31/IL31 Protein (His Tag) (17.3 kDa; 以下简称 Human IL-31) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为  $1.5 \mu\text{g/mL}$ ，3 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 | PBS |
| B | Human IL-31 | PBS | 1.50<br>μg/mL | 500.00<br>ng/mL | 166.67<br>ng/mL | 55.56<br>ng/mL | 18.52<br>ng/mL | 6.17<br>ng/mL | 2.06<br>ng/mL | 685.87<br>pg/mL | 228.62<br>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 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  $1.5 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加  $100 \mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔。周围的孔加  $100 \mu\text{L}$  PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜使用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液准备

| 药物名称        | 储液         | 母液 | 配置方法   |
|-------------|------------|----|--------|
| Human IL-31 | 0.15 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 B2 孔加入  $180 \mu\text{L}$  Assay Buffer，B3-B11 孔，加入  $120 \mu\text{L}$  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 1.82  $\mu\text{L}$  Human IL-31），混匀。

| 母液吸取                           | 梯度稀释孔，依次从前孔吸取 60 $\mu\text{L}$ ，加入次孔 |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   | 对照组               |    |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----|
|                                | 1                                    | 2                 | 3                 | 4                 | 5                 | 6                 | 7                 | 8                 | 9                 | 10                | 11                | 12 |
| 1.82 $\mu\text{L}$ Human IL-31 | 加入                                   | 180 $\mu\text{L}$ | 120 $\mu\text{L}$ | 120 $\mu\text{L}$ | 120 $\mu\text{L}$ | 120 $\mu\text{L}$ | 120 $\mu\text{L}$ | 120 $\mu\text{L}$ | 120 $\mu\text{L}$ | 120 $\mu\text{L}$ | 120 $\mu\text{L}$ |    |
|                                |                                      |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |    |
|                                |                                      |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |    |
|                                |                                      |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |    |
|                                |                                      |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |    |
|                                |                                      |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |    |
|                                |                                      |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |    |

- g) 从第一个稀释孔 B2 中吸取 60  $\mu\text{L}$ ，加入到第二个稀释孔 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 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。
- j) 加入梯度稀释好的药物，100  $\mu\text{L}$  每孔。
- k) 盖上班盖，于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  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_IL-31 Reporter DDX35 <sup>TM</sup> Cell Line | 0 $\mu\text{g/mL}$ | 1.50 $\mu\text{g/mL}$ | 228.62 $\mu\text{g/mL}$ |
|                                                | 10464              | 1643072               | 11249                   |

## 3) 验证结果

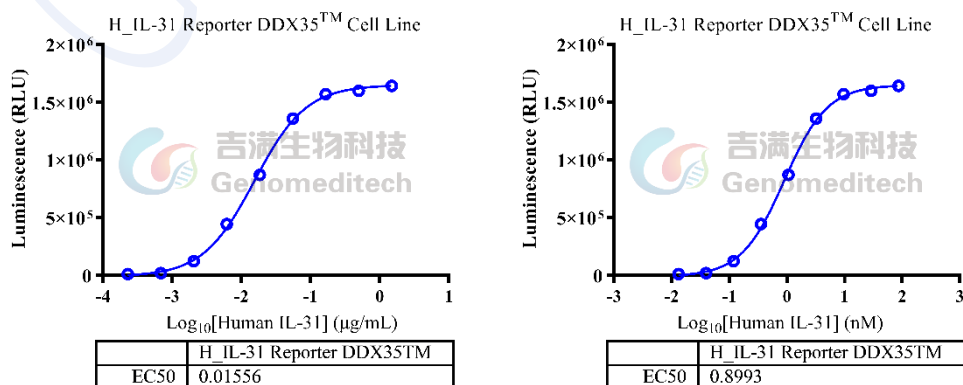


Fig 6.验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

## 相关产品

| OX40                                                |                                             |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| H_OX40 Reporter Cell Line                           | H_OX40 Reporter DDX35TM 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(Amltelimab)               | 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                             | 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-13 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                    |                                             |
| 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                          | H_IL-31RA OSMR Baf3 Cell Line               |
| Anti-IL31 hIgG1 Antibody(mAb33)                     | Anti-IL31RA hIgG1 Antibody(NA633)           |
| Anti-IL31RA hIgG2 Antibody(Nemolizumab)             | Anti-OSMR hIgG4 Antibody(Vixarelimab)       |
| Cynomolgus IL-31 Protein; His Tag                   | Human IL-31 Protein; His Tag                |
| Human IL-31RA Protein; hFc Tag                      |                                             |
| MRGPRX2                                             |                                             |
| H_MRGPRX2 Reporter Cell Line                        | Tango-H_MRGPRX2 CHO-K1 Cell Line            |
| Cynomolgus_MRGPRX2 CHO-K1 Cell Line                 | Cynomolgus_MRGPRX2 HEK-293 Cell Line        |
| Flag-Rat_Mrgprb3 HEK-293 Cell Line                  | H_MRGPRX2 CHO-K1 Cell Line                  |
| H_MRGPRX2 HEK-293 Cell Line                         | H_MRGPRX2 RBL-2H3 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。