

产品手册

H_IL15 Reporter Cell Line

H_IL15 Reporter 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.	功能检测实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	9
附录 1:	功能稳定性结果	10
附录 2	流式稳定性结果	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-C25386	H_IL15 Reporter Cell Line	3E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C25386	H_IL15 Reporter Cell Line	3E6 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-15 (IL-15) 是一种促炎性蛋白，在中性粒细胞、树突状细胞和巨噬细胞的活化中起作用，对于 NK 细胞和 CD8+ T 细胞的发育和生存是必不可少的。

IL-15 与 IL-15R α 受体结合，随后呈递给表面带有 IL-15R $\beta\gamma$ 复合物的周围细胞，再与 IL-15R β , IL-15R γ 二聚体结合，形成异三聚体受体复合物。IL-15 触发 JAK 信号转导和转录激活因子 (STAT)通路的磷酸化，然后磷酸化的 STATs 二聚体或四聚体移位到细胞核中。

吉满生物 H_IL15 Reporter Cell Line 报告基因细胞系，是基于 JAK1/3-STATs 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 IL-15 分别与其受体结合时，受体三聚体和 JAK1/3 被磷酸化。进一步介导 STATs 的磷酸化，使 STATs 二聚体或四聚体转运到细胞核内。从而激活荧光素酶 (Luciferase) 的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 IL-15 相关药物的体外效果评价。

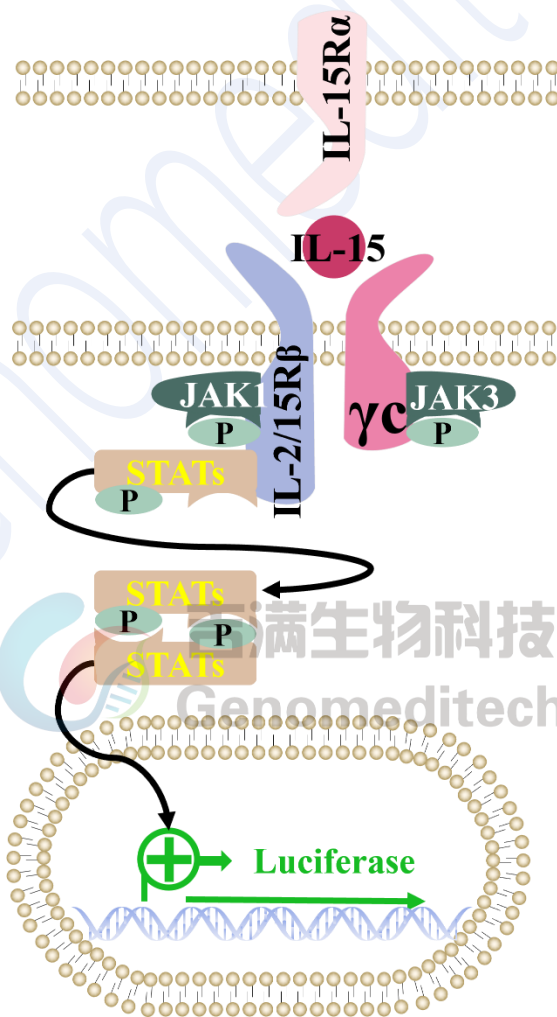


Fig 1. 原理示意图

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:	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+3 µg/mL Blastincidin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640+1% 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
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
GM-CSF	10 µg	Novoprotein/C003
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
RPMI 1640	500 mL	gibco/C11875500BT
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
Recombinant Human IL-15 Protein (His Tag)	10 µg	SinoBiological/10360-H07E
Anti-CD122 hIgG1 Antibody(HuABC-2)	/	Genomeditech/GM-52319AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	Genomeditech/GM-040513C

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	Thermo/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 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. 功能检测实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_IL15 Reporter Cell Line 细胞量为 4×10^4 cells/孔。本次实验使用 Human IL-15 (14.9 kDa) 作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$ ，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 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	Human IL-15	PBS	3 μg/mL	750 ng/mL	187.5 ng/mL	46.88 ng/mL	11.72 ng/mL	2.93 ng/mL	732.42 pg/mL	183.11 pg/mL	45.78 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

- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行）。
- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 80 μL 的 Assay buffer，B2-B10 加入 60 μL 的 Assay buffer。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-15	0.15 mg/mL	/	直接使用储液

- 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 3.33 μL Human IL-15）。

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	3.33 μL Human IL-15		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														

- f) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 20 μL 液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 B3），充分混匀。
- g) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- h) 从细胞培养瓶中转移 H_IL15 Reporter Cell Line 至 50 mL 离心管中，计算细胞密度及活力。使用 Assay Buffer 小心洗涤细胞 2 遍，尽量去除培养基中的 GM-CSF。以 Assay Buffer 重悬细胞，调整至 8×10^5 cells/mL，细胞活力>95%。
- i) 准备 96 圆底孔板，根据孔板布局，加入准备好的 H_IL15 Reporter Cell Line 50 μL ， 4×10^4 cells/孔。
- j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 50 μL 。
- k) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 16 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_IL15 Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	45.78 $\mu\text{g/mL}$
	19511	86633	17660

3) 验证结果

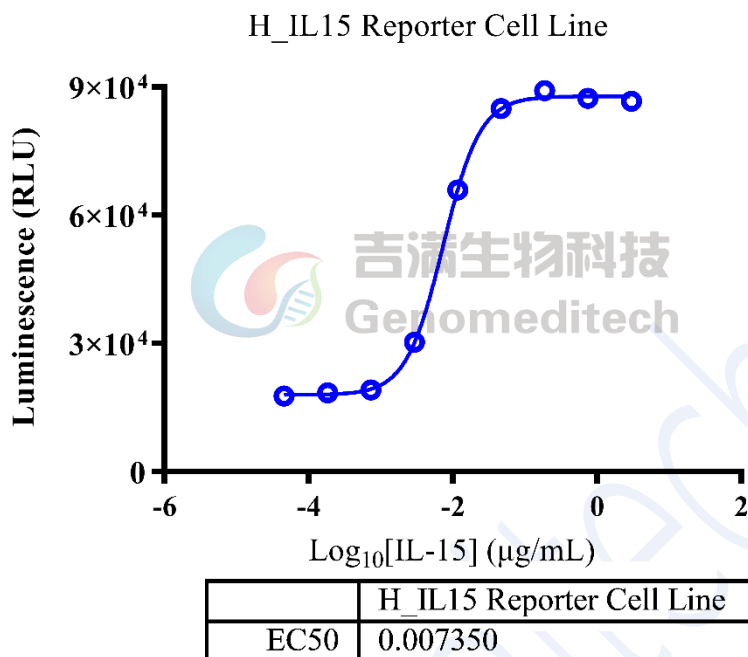


Fig 2. Response to Human IL-15 protein. H_IL15 Reporter Cell Line (Cat. GM-C25386) at a concentration of 4E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Recombinant Human IL-15 Protein (His Tag) (SinoBiological/10360-H07E) in assay buffer (RPMI 1640+1% FBS+1% P.S) for 16 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [4.5]. Data are shown by drug mass concentration.

附录 1：功能稳定性结果

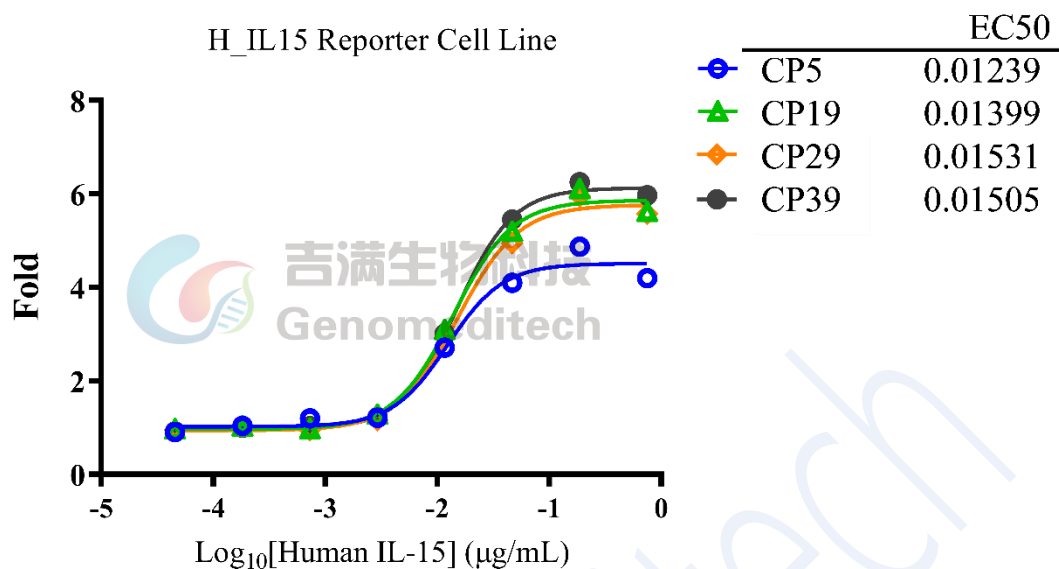


Fig 3. The passage stability of response to Human IL-15 protein. The passage 5, 19, 29 and 39 of H_IL15 Reporter Cell Line (Cat. GM-C25386) at a concentration of 4E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Recombinant Human IL-15 Protein (His Tag) (SinoBiological/10360-H07E) in assay buffer (RPMI 1640+1% FBS+1% P.S) for 16 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech).. Data are shown by drug mass concentration.

附录 2 流式稳定性结果

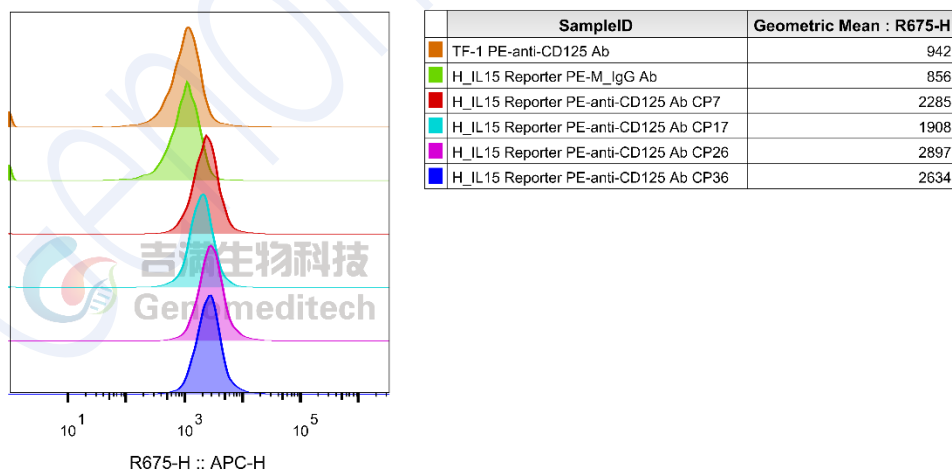


Fig 4. The passage stability of the H_IL15 Reporter Cell Line (Cat. GM-C25386) was determined by flow cytometry using Anti-CD122 hIgG1 Antibody(HuABC-2) (Cat. GM-52319AB).

相关产品

IL-15	
Cynomolgus_CD122 HEK-293 Cell Line	H_CD122 CD132 CHO-K1 Cell Line
H_CD122 CHO-K1 Cell Line	H_CD122 HEK-293 Cell Line
H_CD215(IL15RA) HEK-293 Cell Line	
IL-2	
H_CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line	H_CD122 CD132 Reporter Cell Line
H_CD25 CD122 CD132 Reporter 293 Cell Line	H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line
H_CD25 CD122 CD132 Reporter Jurkat(hPD1 OE) Cell Line	H_IL2 Reporter Cell Line
H_IL2 Reporter DDX35TM Cell Line	Cynomolgus_CD25 HEK-293 Cell Line
H_CD25 CHO-K1 Cell Line	H_CD25 HEK-293 Cell Line
Anti-CD122 hIgG1 Antibody(HuABC-2)	Anti-CD132(IL2RG) hIgG4 Antibody(REGN7257)
Anti-CD25 hIgG1 Antibody(Basiliximab)	Anti-IL2 hIgG1 Antibody (imneskibart)
Anti-mouse CD25 mIgG2a Antibody(PC-61.5.3)	Anti-mouse CD25 RIgG1 Antibody(PC-61.5.3)
Anti-PD1-IL2v Fusion hIgG1 Antibody(2149)	Anti-PD1-IL2v Fusion hIgG1 Antibody(KY-0118)
Cynomolgus IL-2 Protein; hFc Tag	Cynomolgus IL-2 Protein; His Tag
Cynomolgus IL-2RA Protein; hFc Tag	Cynomolgus IL-2RA Protein; His Tag
Cynomolgus IL-2RB Protein; His Tag	Human IL-2 Protein; hFc Tag
Human IL-2 Protein; His Tag	Human IL-2RA Protein; hFc Tag
Human IL-2RA Protein; His Tag	Human IL-2RB Protein; His Tag
Human IL-2RG Protein; His Tag	Mouse IL-2 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。