

## 产品手册

### H\_IL18 Reporter 293 Cell Line

### H\_IL18 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：V2.12.3

## 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（以 10 cm 皿为例）.....	6
3.	细胞冻存.....	6
六、	使用方法（示例）.....	7
1.	激活验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	抑制验证实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	11
	附录 1 流式验证结果.....	12
	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-C21147	H_IL18 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-C21147	H_IL18 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

白细胞介素 18 (IL18, 也称为干扰素- $\gamma$  诱导因子) 是一种在人体中由 IL18 基因编码的蛋白质。该基因编码的蛋白质是一种促炎细胞因子。许多细胞类型, 包括造血细胞和非造血细胞等多种类型细胞都具有产生 IL-18 的潜力。

游离 IL-18 与特定的异二聚体细胞表面受体结合, 该受体是 IL-1 受体/Toll 样受体超家族的成员, 由两个亚基 IL-18R $\alpha$  ( IL-18R $\alpha$ 1) 和 IL-18R $\beta$  (IL-18RAP) 组成, 两者均具有一个包含 Toll/IL-1R 结构域 (TIR) 的细胞内部分。IL-18 与 IL-18R $\alpha$  的相互作用。通过 TIR 结构域稳定了其 与 IL-18R $\beta$  的连接。并通过这个结构域募集 MyD88 衔接蛋白。募集 IL-1 受体激活激酶 (IRAK) 启动信号转导。IRAK 自磷酸化并从受体复合物中解离, 随后与 TRAF6 相互作用, 最终激活下游信号通路。

吉满生物 H\_IL18 Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系, 是基于 IL18 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 IL-18 与异二聚体受体结合后, 募集 MyD88 衔接蛋白, MyD88 衔接蛋白募集 IRAK, 与 traf6 结合, 激活下游信号通路, 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-18 相关药物的体外效果评价。

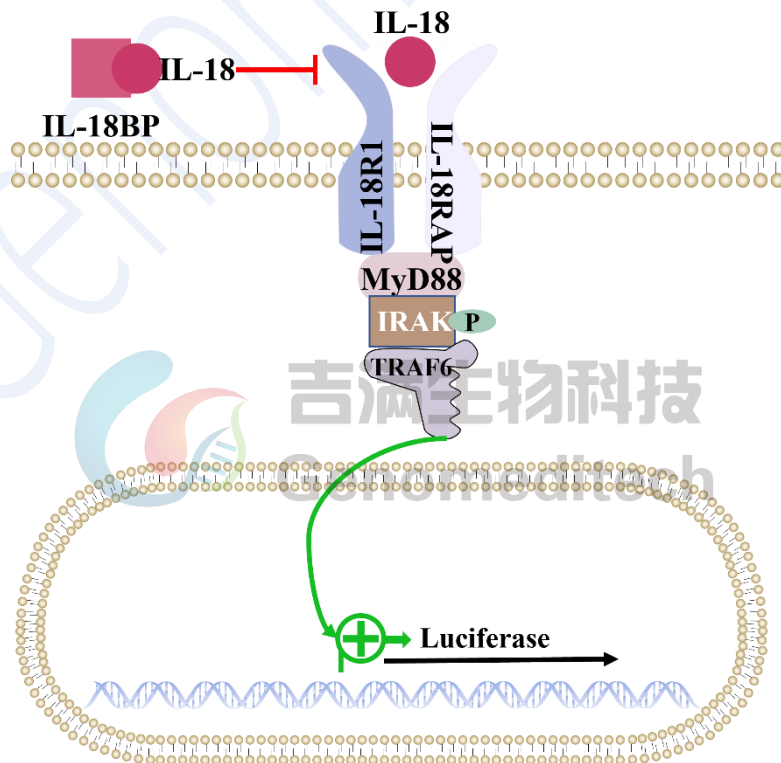


Fig 1.IL18 信号通路图

## 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:	EMEM+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	EMEM+10% FBS+1% P.S+3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin+400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418+1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	EMEM+1% FBS+1% P.S

### 2. 试剂耗材准备

#### 试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
EMEM	500 mL	ATCC/30-2003
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
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
Human IL-18 Protein	100 $\mu\text{g}$	KACTUS/IL1-HE018
Human IL-18BP Protein; hFc Tag	/	Genomeditech/GM-88315RP
IL18R1 Antibody (APC), Mouse MAb	/	Sino Biologica/11102-MM17-A
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

- 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 × 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。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 3-4  $\times 10^5$  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 × 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°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，当细胞密度大于 80%，即可进行细胞传代。两次传代后复苏培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 天传代。
- 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°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 × g 室温离心 3 min。
- 弃上清，细胞沉淀用生长培养基重悬，根据传代前细胞密度分盘（根据培养皿面积和细胞密度计算，传代后细胞密度为 30-40%）。

**注意事项：**

- 细胞刚复苏时，死细胞较多，贴壁不明显属于正常情况，2-3 天可以恢复贴壁，传代 2-3 次后贴壁细胞比例升高，细胞正常展开。
- 每次传代后会有 5-10%死细胞，但随着代次升高，细胞恢复速度变快，死细胞比例降低，细胞生长速度会趋于稳定。
- 细胞复苏后及每次观察时建议保留细胞照片，可用于辅助判断细胞状态，在出现异常时及时与吉满销售沟通。
- 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（示例）

### 1. 激活验证实验

操作步骤可调整优化,对于本实验 H\_IL18 Reporter 293 Cell Line 细胞量为  $1.8 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 Human IL-18 Protein (18.2 kDa) (以下简称为 Human IL-18) 作为阳性药物, Conc.01 浓度为 30 ng/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  $\mu$ 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	Human IL-18	30.00 ng/mL	10.00 ng/mL	3.33 ng/mL	1.11 ng/mL	370.37 pg/mL	123.46 pg/mL	41.15 pg/mL	13.72 pg/mL	4.57 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  $1.8 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加 100  $\mu$ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu$ L PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜使用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物, 使用两行 (如 B2-B10)。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-18	100 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL	取 2 $\mu$ L 储液+198 $\mu$ L Assay Buffer

- 96 孔 U 中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 180  $\mu$ L Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 120  $\mu$ 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 5.57  $\mu$ L Human IL-18), 混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 60 $\mu$ L, 加入次孔											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	5.57 $\mu$ L Human IL-18	加入	180 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 60  $\mu$ 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) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出, 吸弃上清。
- j) 加入之前准备好的梯度稀释液, 每孔 100  $\mu$ L。
- k) 盖板上盖, 于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16 h。
- l) 收样, 转至 96 孔白底板上机, 检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_IL18 Reporter 293 Cell Line	0 ng/mL	30.00 ng/mL	4.57 pg/mL
	344679	20049385	380114

## 3) 验证结果

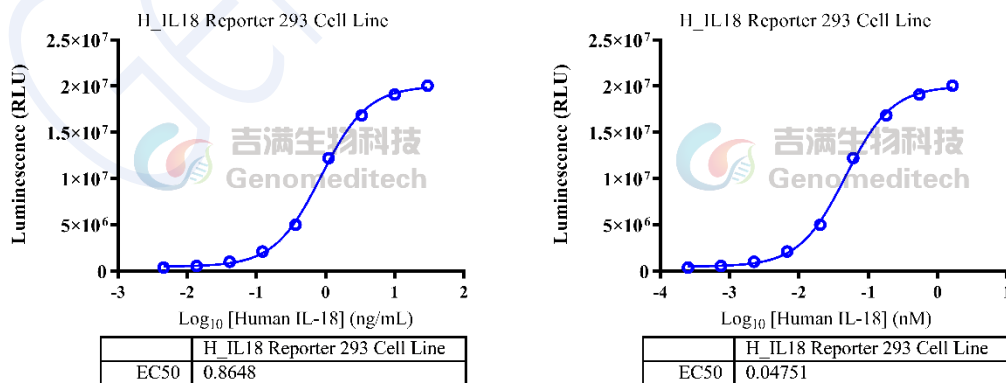


Fig 2. Response to Human IL-18 Protein. The H\_IL18 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C21147) at a concentration of 1.8E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Human IL-18 Protein (KACTUS/IL1-HE018) in assay buffer (EMEM+1% FBS+1% P.S) for 16 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [58.2].

## 2. 抑制验证实验

操作步骤可调整优化,对于本实验 H\_IL18 Reporter 293 Cell Line 细胞量为  $1.8 \times 10^4$  cells/孔。使用 Human IL18 Protein 激活,终浓度为 2 ng/mL; Human IL-18BP Protein; hFc Tag (44.2 kDa; 以下简称 Human IL-18BP) 起始终浓度(Conc.01)为 15  $\mu\text{g/mL}$ , 5 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.10 分别排布在 B2-B11, B12 为 0 浓度对照。周围为 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	Human IL-18 BP	15 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	600 ng/mL	120 ng/mL	24 ng/mL	4.8 ng/mL	960 pg/mL	192 pg/mL	38.4 pg/mL	7.68 pg/mL	0
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  $1.8 \times 10^5$  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 U 底板准备药物稀释。
- 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B11)。
- 准备母液:

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-18	100 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	取 2 $\mu\text{L}$ 储液 + 198 $\mu\text{L}$ Assay Buffer
Human IL-18BP Protein	1.92 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 U 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 加入 75  $\mu\text{L}$  Assay Buffer, B3-B12 孔, 加入 60  $\mu\text{L}$  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 加入 1.19  $\mu\text{L}$  Human IL-18BP), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 15 $\mu$ L, 加入次孔										对照	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.19 $\mu$ L Human IL-18 BP	加入	75 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 15  $\mu$ 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 10 个梯度稀释孔 (B11)。
- i) 配置激活药物 Human IL-18 (2 $\times$  激活浓度), 4 ng/mL Human IL-18 (取 5.3  $\mu$ L 1  $\mu$ g/mL Human IL-18 母液加入到 1320  $\mu$ L Assay Buffer 中, 混匀后使用)
- j) 将配置好的激活剂加入步骤 h 准备好的梯度稀释的抗体中, 每孔加入 60  $\mu$ L 混匀, 盖上盖板放入培养箱孵育 1 h。
- k) 1 h 后, 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出, 吸弃上清, 然后加入步骤 j 的混合溶液, 每孔 100  $\mu$ L。
- l) 盖板上板盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16 h。
- m) 收样, 转至 96 孔白底板上机, 检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_IL18 Reporter 293 Cell Line	2 ng/mL IL-18+0 $\mu$ g/mL Human IL-18 BP	2 ng/mL IL-18+15 $\mu$ g/mL Human IL-18 BP	2 ng/mL IL-18+7.68 pg/mL Human IL-18 BP
	17297895	899191	15638551

### 3) 验证结果

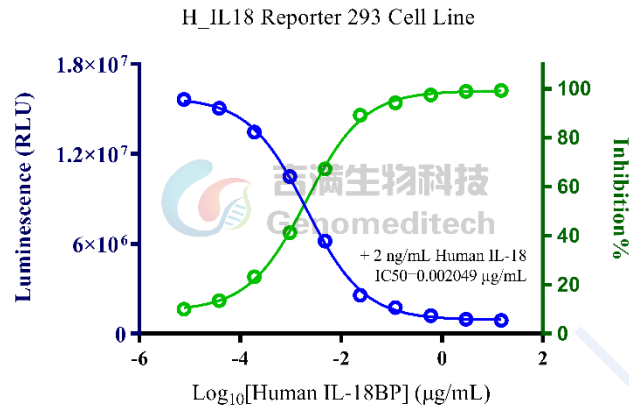


Fig 3. Inhibition of Human IL-18 Protein-induced reporter activity by Human IL-18BP Protein; hFc Tag. Serial dilutions of Human IL-18BP Protein (Cat. GM-88315RP) were incubated with 0.2 ng/well of Human IL-18 Protein (CKACTUS/IL1-HE018) for 1 hour in assay buffer (EMEM+1% FBS+1% P.S). After pre-incubation, add the mixture to the H\_IL18 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C21147) at a density of 1.8E4 cells/well in a 96-well format, and incubate for 16 hours. Firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) (left Y-axis, relative luminescence units, RLU), with inhibition percentages shown on the right Y-axis. Data are shown by drug mass concentration.

## 附录 1 流式验证结果

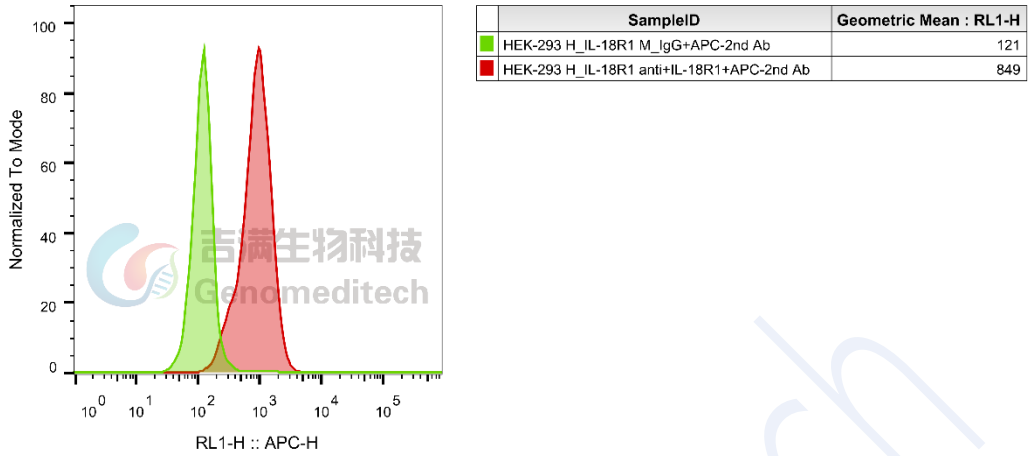


Fig 4. H\_IL-18 Reporter HEK 293 Cell Line 使用 IL18R1 Antibody (APC), Mouse Mab 抗体流式验证 IL-18R1 的表达

### 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。