

## 产品手册

### H\_TSLP Reporter Cell Line

### H\_TSLP 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：V2.12.3

## 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.....	6
3.	细胞冻存.....	6
六、	使用方法（示例）.....	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.	抗体 Block 验证实验（Anti-TSLPR）.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	10
附录 1	蛋白激活.....	11
附录 2	稳定性验证结果.....	11
附录 3	流式检测结果.....	12
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-C15572	H_TSLP Reporter Cell Line	5E6 Cells/mL

### 组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C15572	H_TSLP Reporter 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 $\alpha$  链形成三元信号复合物，激活下游信号。

吉满生物 H\_TSLP Reporter 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 $\alpha$  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。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。

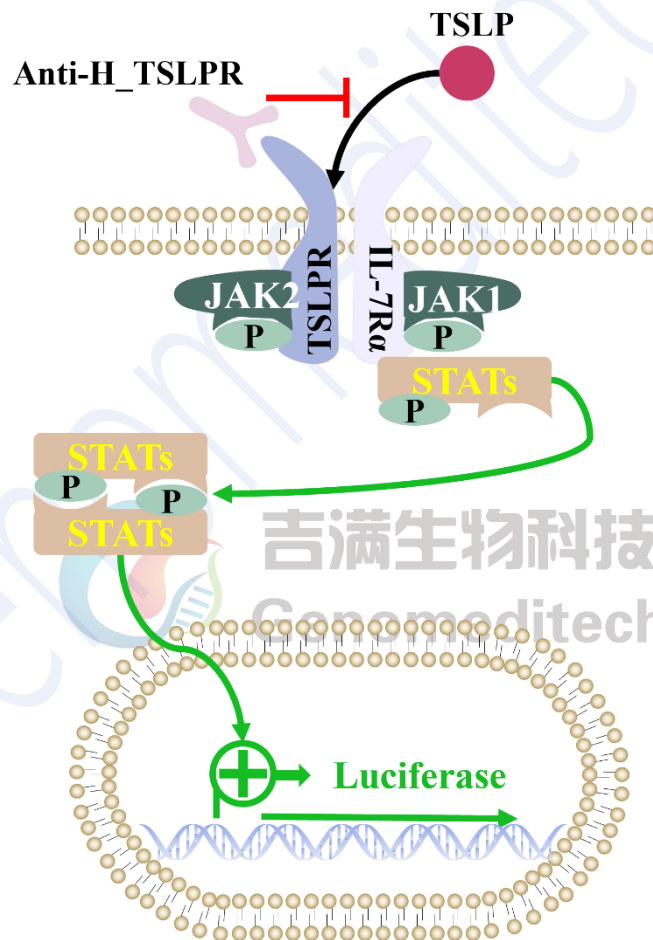


Fig 1.原理示意图

## 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:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+8 ng/mL M_IL-3
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+8 ng/mL M_IL-3+5 µg/mL Blasticidin+50 µg/mL G418+0.25 µg/mL Puromycin
细胞冻存培养基:	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
G418	1 g	Genomeditech/ GM-040402-1
mouse IL-3	10 µg	近岸蛋白/CP39
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
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 TSLP	10 µg	R&D/1398-TS-010
Human TSLP Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-87654RP
Recombinant Human TSLP(Cat.No.:CK16)	10 µg	Novoprotein/ CK16
Anti-H_TSLPR hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-31018AB
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 × g，离心 5 min，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<sup>2</sup>），竖瓶培养。

### 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

**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  $1.4 \times 10^6$  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  $24 \pm 8$  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 需 56°C 水浴 30 分钟，可热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. 激活剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_TSLP Reporter Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  Cells/孔。使用激活剂：Recombinant Human TSLP Protein (15 kDa)起始终浓度(Conc.01)为 5  $\mu\text{g/mL}$ ，5 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  $\mu\text{L}$  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	TSLP	PBS	5 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	200 $\text{ng/mL}$	40 $\text{ng/mL}$	8 $\text{ng/mL}$	1.6 $\text{ng/mL}$	320 $\text{pg/mL}$	64 $\text{pg/mL}$	12.8 $\text{pg/mL}$	0 $\text{pg/mL}$	PBS
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 1 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 2 遍后，再次重悬，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$  cells/mL。以排枪加 50  $\mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu\text{L}$  PBS。盖盖板盖，于孵箱中孵育待用。
- 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（如 B2-B11）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
TSLP	100 $\mu\text{g/mL}$	/	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 61.88  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55  $\mu\text{L}$  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 6.88  $\mu\text{L}$  TSLP），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 13.75 $\mu$ L, 加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
6.88 $\mu$ L TSLP	加入	61.88 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 13.75  $\mu$ L, 加入到第 2 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 h 里稀释好的药物每孔吸取 50  $\mu$ L 加入到步骤 a 准备好的细胞悬液里, 盖板上板盖, 于孵箱中孵育 24 h。
- j) 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 Cell Line	0 $\mu$ g/mL	5 $\mu$ g/mL	12.8 pg/mL
	184566	7771665	238271

## 3) 验证结果

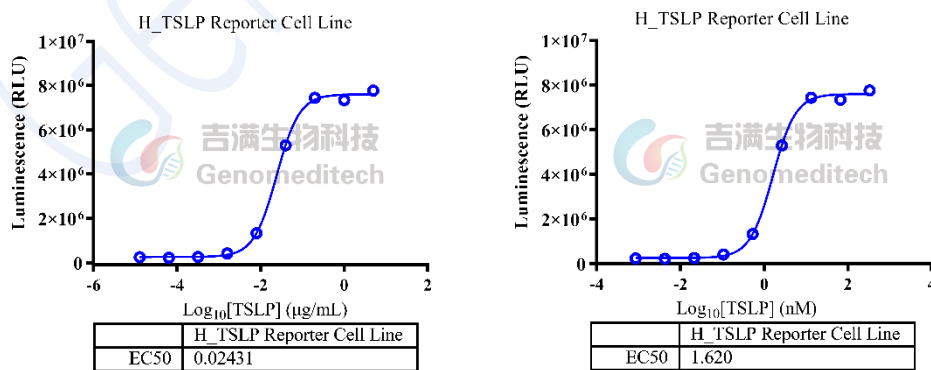


Fig 2. Response to Recombinant Human TSLP Protein. The H\_TSLP Reporter Cell Line (Cat. GM-C15572) at a concentration of 1E5 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Recombinant Human TSLP Protein (R&D/1398-TS-010) in assay buffer (RPMI 1640 + 1% FBS + 1% P.S) for 24 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). (The right panel was plotted after conversion of mass concentration and molar concentration of the drug.)

## 2. 抗体 Block 验证实验 (Anti-TSLPR)

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 H\_TSLP Reporter Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  cells/孔。使用 TSLP(15 kDa)终浓度为 57.7 ng/mL(EC80=57.8 ng/mL), Anti-H\_TSLPR hIgG1 Antibody (150 kDa) (以下简称为 Anti-TSLPR) 起始终浓度(Conc.01)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  $\mu\text{L}$  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	Anti-TSLPR	30 $\mu\text{g/mL}$	7.5 $\mu\text{g/mL}$	1.88 $\mu\text{g/mL}$	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	PBS
D												
E												
F												
G												
H												

### 1) 加样步骤

- 在实验前 1 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 2 遍后, 再次重悬, 检测细胞活力并计数, 再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为  $3 \times 10^6$  cells/mL。以排枪加 33  $\mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu\text{L}$  PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育待用。
- 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)。
- 母液配置

抗体名称	储液	母液	配置方法
Anti-TSLPR	1.4 mg/mL	/	直接使用储液
TSLP	100 $\mu\text{g/mL}$	/	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 45.26  $\mu\text{L}$  Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 36.3  $\mu\text{L}$  Assay Buffer。
- 吸取 3.14  $\mu\text{L}$  待测样品母液, 加入到第一个梯度稀释孔中 (如 B2), 混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 12.1 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照组	
A		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B													
C	3.14 $\mu\text{L}$ Anti-TSLPR	加入	45.26 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	36.3 $\mu\text{L}$	
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 12.1  $\mu\text{L}$ ，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)，B11 为不加抗体的对照。
- i) 将稀释好的抗体每孔吸取 33  $\mu\text{L}$  加入到步骤 a 准备好的细胞孔板中，孵育 1 h。
- j) 孵育的同时配置激活剂 ( $3 \times$  激活浓度)，取 1.19  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TSLP 加入到 679.43  $\mu\text{L}$  Assay Buffer 中，混匀后使用。
- k) 1 h 后，将步骤 j 配置的激活剂加入到步骤 i 孵育过的孔板中，每孔 33  $\mu\text{L}$ ，混匀后盖上检测盖板，于 37 $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中继续孵育 23 h。
- l) 收样使用报告基因试剂盒检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TSLP Reporter Cell Line+Anti-TSLPR	TSLP + No Ab Control	TSLP + 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anti-TSLPR	TSLP + 457.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anti-TSLPR
	1811780	178172	1831714

## 3) 验证结果

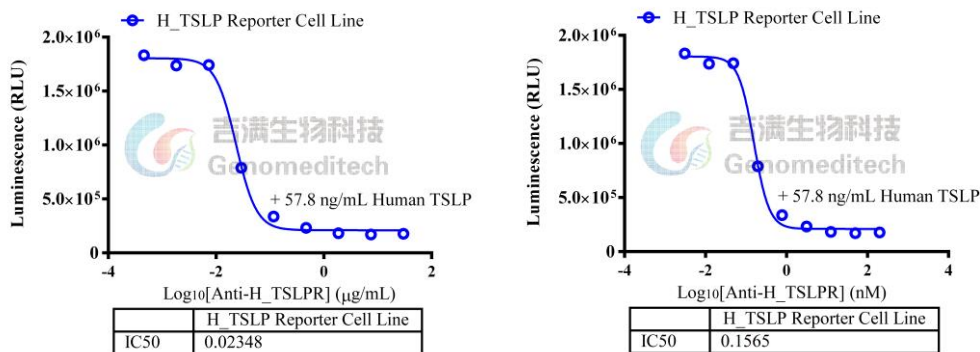


Fig 3. Response to Anti-H\_TSLPR hIgG1 Antibody. Serial dilutions of the Anti-H\_TSLPR hIgG1 Antibody (Cat. GM-31018AB) was incubated with 1E5 cells/well of the H\_TSLP Reporter Cell Line (Cat. GM-C15572) in a 96-

well plate for 1 hour in assay buffer (RPMI 1640 + 1% FBS + 1% P.S). Subsequently, the Recombinant Human TSLP Protein (R&D SYSTEMS/1398-TS-010) at a concentration of 5.78 ng/well was added, and the coculture proceeded for an additional 23 hours. Firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech).

## 附录 1 蛋白激活

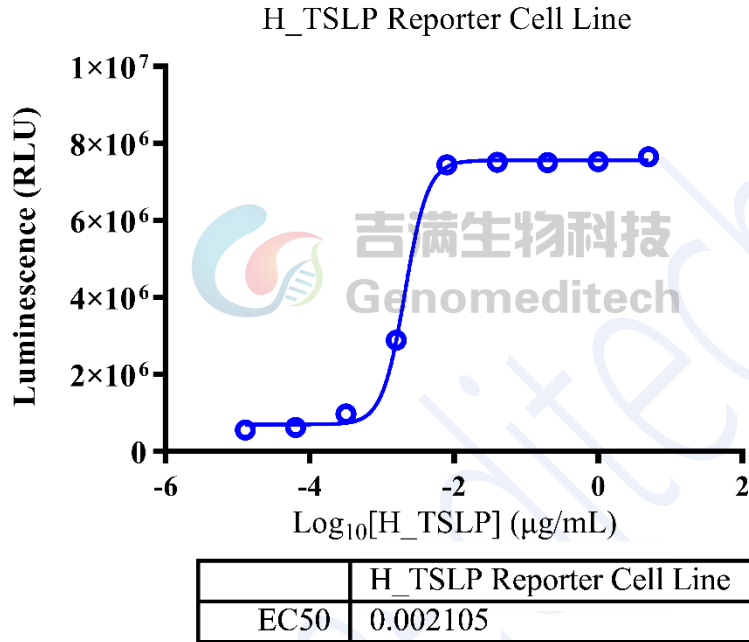


Fig 4. Response to Human TSLP Protein; His Tag (Cat. GM-87654RP). The H\_TSLP Reporter Cell Line (Cat. GM-C15572) at a concentration of 1E5 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Human TSLP Protein; His Tag (Cat. GM-87654RP) in assay buffer (RPMI 1640 + 1% FBS + 1% P.S) for 24 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech).

## 附录 2 稳定性验证结果

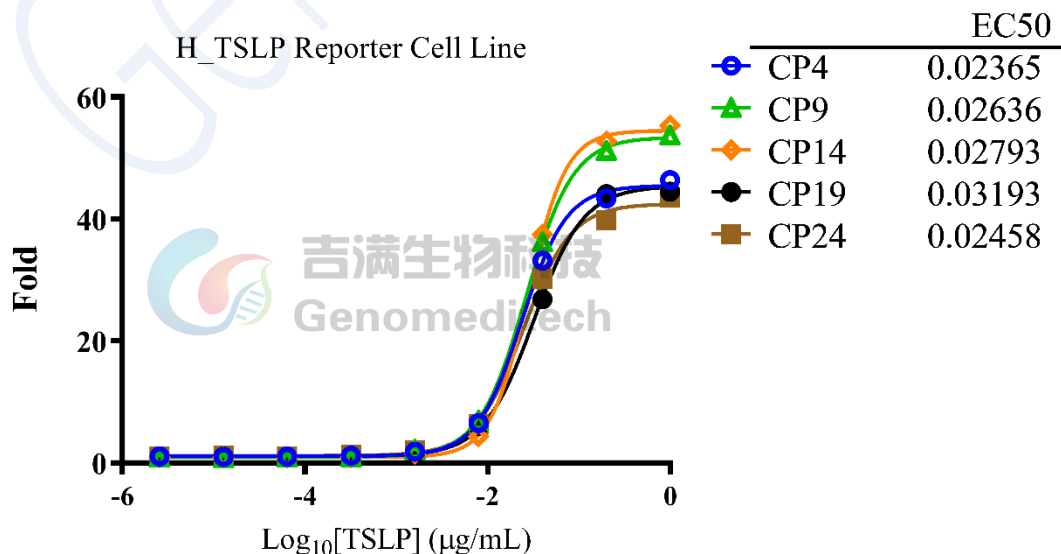


Fig 7. The passage stability of response to Recombinant Human TSLP. The passage 4, 9, 14, 19 and 24 of H\_TSLP Reporter Cell Line (Cat. GM-C15572) at a concentration of 1E5 cells/well (96-well format) were stimulated with serial dilutions of Recombinant Human TSLP (Novoprotein/CK16) in assay buffer (RPMI 1640 + 1% FBS + 1% P.S) for 24 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech)

### 附录 3 流式检测结果

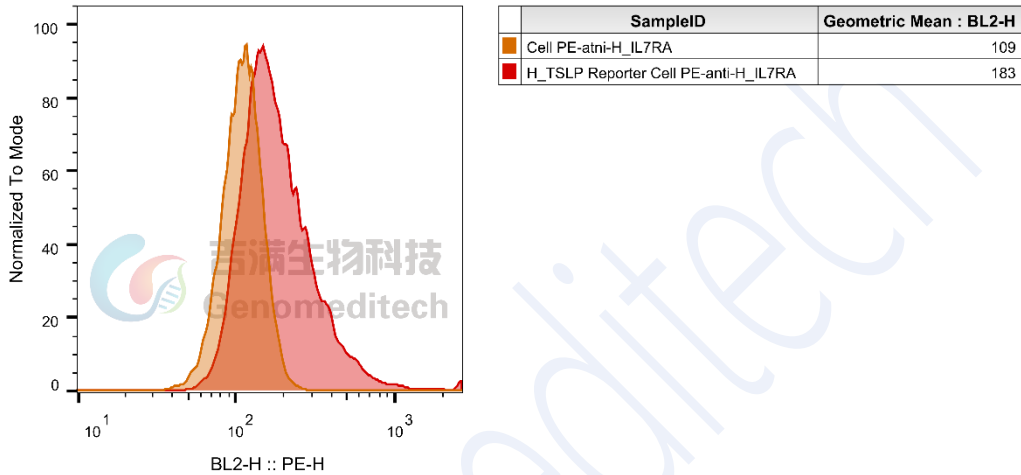


Fig 5. H\_TSLP Reporter Cell Line (Cat. GM-C15572) was determined by flow cytometry using PE anti-human CD127 (IL-7R $\alpha$ ) Antibody (BioLegend/351303).

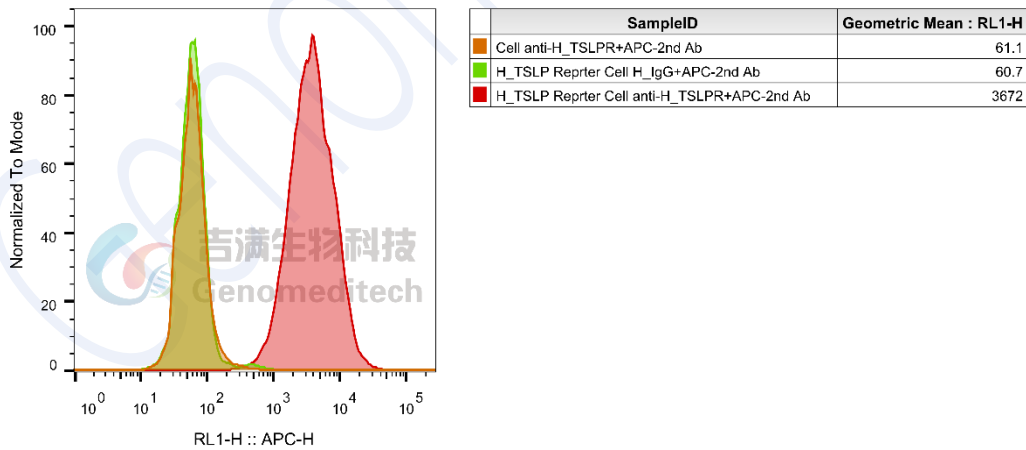


Fig 6. H\_TSLP Reporter Cell Line (Cat. GM-C15572) was determined by flow cytometry using Anti-H\_TSLPR hIgG1 Antibody (Cat. GM-31018AB).

## 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)	
Human IL-4R alpha Protein; mFc Tag	
TSLP:TSLPR	
H_TSLPR CHO-K1 Cell Line	
Anti-H_TSLPR hIgG1 Antibody	Anti-TSLP hIgG2 Reference Antibody(Tezbio)
Anti-TSLP hIgG2 Antibody(Tezepelumab)	
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。
- 用户及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。