

产品手册

H_IL-21 Reporter Cell Line

H_IL-21 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（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
	使用许可协议:	9

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-C15762	H_IL-21 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-C15762	H_IL-21 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

IL-21 是一种四螺旋束的细胞因子，IL-21 受体 (IL-21 receptor, IL-21R) 是一个由独有的亚单位和 γ 链组成的异二聚体，在淋巴细胞和造血细胞表面广泛表达，与 IL-2 家族的其他成员 (IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13 和 IL-15) 共用 γ 链。IL-21R 亚单位为配体识别结合部位， γ 链为信号转导单位。IL-21 的信号转导主要通过蛋白酪氨酸激酶 JAK/信号转导子和转录激动子(signal transducers and activator of transcription, STAT)途径进行。IL-21 与其受体结合后，活化 JAK 家族成员(JAK1 和 JAK3)，随后磷酸化 STAT1、STAT3、STAT4 和 STAT5，最后进入细胞核内调节相应基因的表达。此外，IL-21 也能激活丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族成员。

吉满生物 H_IL-21 Reporter Cell Line 细胞系是基于 JAK-STAT 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 IL-21 受体结合后，激活 STAT 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-21 相关药物的体外效果评价。

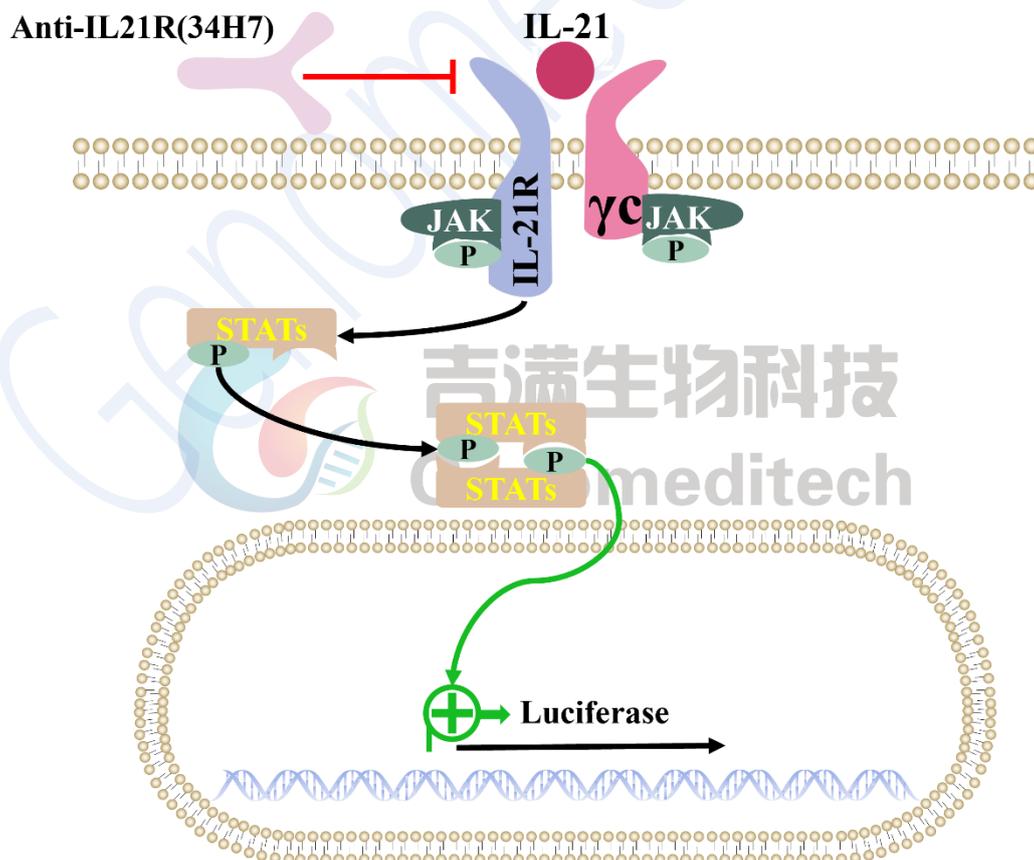


Fig 1.IL21 信号通路图

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:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+8 ng/mL M_IL3
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+8 ng/mL M_IL3+5 µg/mL Blasticidin+0.25 µg/mL Puromycin
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
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
Human Interleukin-21 / IL-21 Protein	/	SinoBiological/GMP-10584-HNAE
mouse IL-3	10 µg	Novoprotein /CP39
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 tests	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， $176 \times g$ ，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^2 ），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 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

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 1.4×10^6 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 ± 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 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. 激活剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_IL-21 Reporter Cell Line 细胞量为 1×10^5 Cells/孔。使用 Human IL21 Protein（15.6 kDa）起始终浓度(Conc.01)为 100 ng/mL，10 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 μ 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 IL21 Protein	PBS 100 ng/mL	10 ng/mL	1 ng/mL	100 pg/mL	10 pg/mL	1 pg/mL	100 fg/mL	10 fg/mL	1 fg/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 2×10^6 cells/mL。以排枪加 50 μ L 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖上班盖，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-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL21 Protein	0.25 mg/mL	2.5 μ g/mL	取 2 μ L 储液+198 μ L Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 56.2 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 μ 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 4.89 μ L Human IL21 Protein），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 6.1 μL, 加入次孔									对照孔	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	4.89 μL Human IL21 Protein 加入	加入	56.2 μL	55 μL								
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 6.1 μL, 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 的细胞孔板取出, 每孔加入步骤 h 梯度稀释的药物 50 μL, 盖上市盖, 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_IL-21 Reporter Cell Line	0 ng/mL	100 ng/mL	1 fg/mL
	38908	142635	43604

3) 验证结果

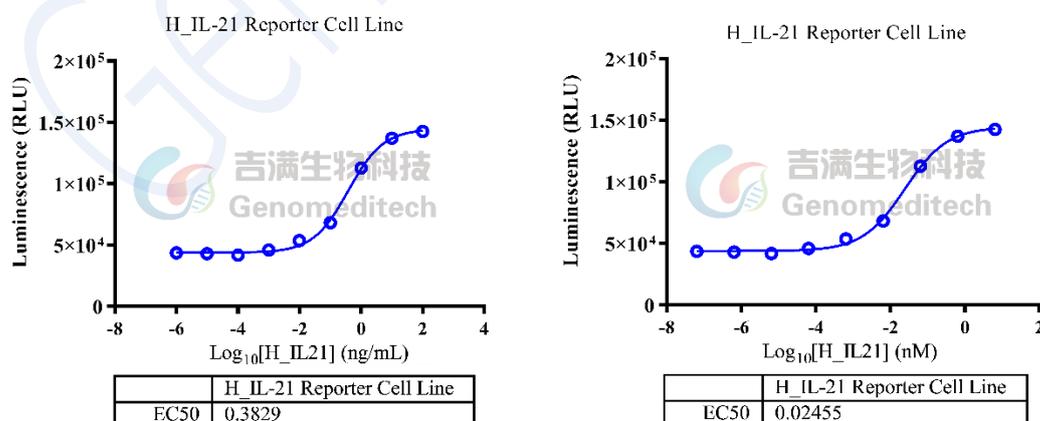


Fig 2.Human IL21 Protein 激活验证结果

(右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

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。

Genomeditech