

## 产品手册

### H\_IL-5 Reporter 293 Cell Line

### H\_IL-5 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：V2.8.2

## 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.	H_IL-5 Reporter 293 Cell Line 细胞复苏.....	6
2.	H_IL-5 Reporter 293 Cell Line 细胞传代.....	6
3.	H_IL-5 Reporter 293 Cell Line 细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	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.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	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-C06723	H_IL-5 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-C06723	H_IL-5 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

IL-5 是一种 115 个氨基酸（在人类中，在小鼠中为 133 个）长的 TH2 细胞因子，它是造血家族的一部分。与该细胞因子家族的其他成员（即白细胞介素 3 和 GM-CSF）不同，这种糖蛋白的活性形式是同型二聚体。IL-5 受体（IL-5R）属于 I 型细胞因子受体家族，是由两条多肽链组成的异二聚体，一个  $\alpha$  亚基与 IL-5 结合并赋予受体细胞因子特异性，另一个  $\beta$  亚基，包含信号转导域且不与 IL-5 结合。

IL-5 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-5 与 IL-5R $\alpha$  受体结合后，活化 JAK 家族成员，随后磷酸化 STAT1、STAT3、STAT5，最后进入细胞核内调节相应基因的表达。

长期以来，IL-5 与多种过敏性疾病的病因有关，包括过敏性鼻炎和哮喘，其中观察到循环、气道组织和诱导的嗜酸性粒细胞数量大量增加。鉴于嗜酸性粒细胞的高度一致性，特别是过敏性哮喘病理学，人们普遍推测嗜酸性粒细胞在该疾病的病理学中具有重要作用。

吉满生物 H\_IL-5 Reporter 293 Cell Line 细胞系是基于 JAK-STATs 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 IL-5 受体结合后，激活 STATs 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-5 相关药物的体外效果评价。

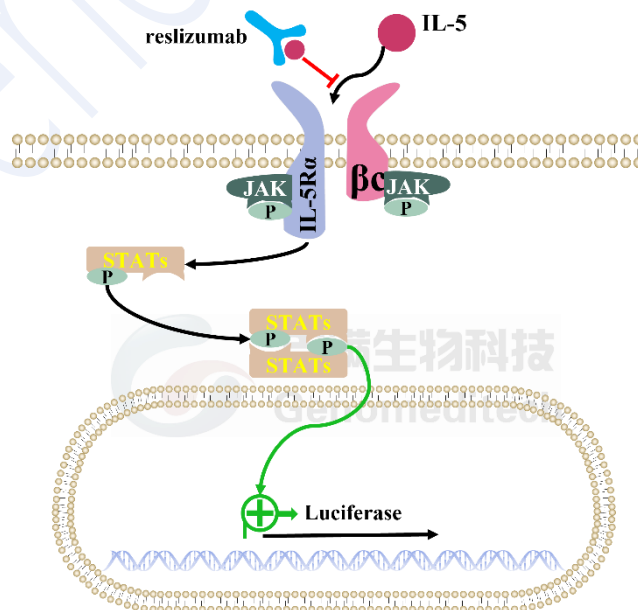


Fig 1.原理示意图

## 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:	DMEM+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S+0.75 µg/mL Puromycin+4 µg/mL Blasticidin +125 µg/mL Hygromycin+400 µg/mL G418
细胞冻存培养基:	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.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
G418	10 mg	Genomeditech/GM-040402-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
DMEM	500 mL	Vivacell/C3110-0500
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
Passive Lysis 5X Buffer	30 mL	Promega/E1941
Firefly Luciferase Assay Reagent	100 mL	Genomeditech/G0483M002
Human IL-5 / Interleukin 5 Protein	/	Sino Biological/15673-HNCE
Anti-IL5 hIgG4 Antibody (Reslizumab)	/	Genomeditech/GM-52408AB

#### 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. H\_IL-5 Reporter 293 Cell Line 细胞复苏

- 37°C水浴锅预热培养基，加入预热后的完全培养基 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。
- 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，800 rpm，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 完全培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞。
- 通过补加完全培养基的形式，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。

### 2. H\_IL-5 Reporter 293 Cell Line 细胞传代

- 当细胞密度大于 80%，即可进行细胞传代。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 左右完全培养液混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，800 rpm 室温离心 3 min。
- 弃上清，细胞沉淀用完全培养液重悬，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%）。

### 3. H\_IL-5 Reporter 293 Cell Line 细胞冻存

- 使用 800 rpm，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。

## 六、 使用方法

### 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-5 Reporter 293 Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 Human IL-5 / Interleukin 5 Protein (以下简称为 Human IL-5;13.1 kDa)作为阳性药物，Conc.01 浓度为 500 ng/mL，4 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-5	500 ng/mL	125 ng/mL	31.25 ng/mL	7.81 ng/mL	1.95 ng/mL	488.28 pg/mL	122.07 pg/mL	30.52 pg/mL	7.63 pg/mL	1.91 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  $1.5 \times 10^5$  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 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B12）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-5	0.1 mg/mL	0.01 mg/mL	使用 2 $\mu$ L 储液+18 $\mu$ 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 139.3  $\mu$ L Assay Buffer，B3-B12 孔，加入 110  $\mu$ 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 7.33  $\mu\text{L}$  Human IL-5），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 36.7 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照组	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	7.33 $\mu\text{L}$ Human IL-5	加入	139.3 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 36.7  $\mu\text{L}$ ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 10 个梯度稀释孔（B11）。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100  $\mu\text{L}$  培养基。
- j) 加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100  $\mu\text{L}$ 。
- k) 盖上班盖，于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16 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-5 Reporter 293 Cell Line	0 ng/mL	500 ng/mL	1.91 $\mu\text{g/mL}$
	11658	1404277	15509

## 3) 验证结果

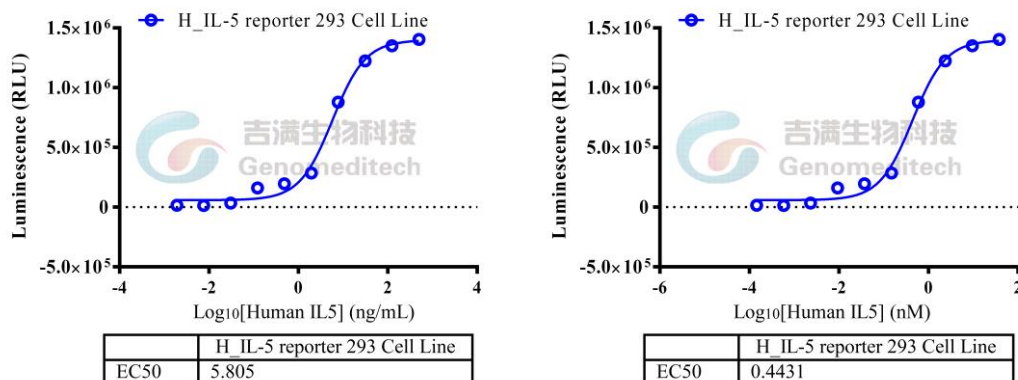


Fig 2.功能验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）



## 2. 抗体 Block 验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_IL-5 Reporter 293 Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 Human IL-5 / Interleukin 5 Protein (以下简称为 Human IL-5;13.1 kDa)作为阳性激活药物，激活浓度为 5.81 ng/mL，使用 Anti-IL5 hIgG4 Antibody(Reslizumab) (150 kDa; 以下简称 Anti-IL5) 作为待测抗体，起始终浓度(Conc.01)为 100  $\mu\text{g/mL}$ ，2 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	5.81 ng/mL Human IL-5+Anti-IL5	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{g/mL}$	3.13 $\mu\text{g/mL}$	1.56 $\mu\text{g/mL}$	781.25 ng/mL	390.63 ng/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。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-5	0.15 mg/mL	0.0015 mg/mL	取 2 $\mu\text{L}$ 储液 + 198 $\mu\text{L}$ Assay Buffer
Anti-IL5	2.97 mg/mL	/	直接使用储液

- e) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 102.6  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55  $\mu\text{L}$  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 7.4  $\mu\text{L}$  Anti-IL5），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 55 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照组
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	7.4 $\mu\text{L}$ Anti-IL5	加入	102.6 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 55  $\mu\text{L}$ ，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）。
- i) 配置激活药物 Human IL-5（ $2 \times$  激活浓度），取 5.13  $\mu\text{L}$  稀释后的母液，加入到 654.93  $\mu\text{L}$  Assay Buffer 中，混匀。将配置好的 Human IL-5 依次加入到步骤 h 梯度稀释的抗体中，B2-B11，每孔加入 55  $\mu\text{L}$ ，盖上盖板，静置 1 h。
- j) 1 h 后，将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 90  $\mu\text{L}$  上清。加入步骤 i 准备好的混合药物，100  $\mu\text{L}$  每孔。
- k) 盖上板盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$  CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16 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-5 Reporter 293 Cell Line	Human IL-5+No Ab Control	Human IL-5+100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anti-IL5	Human IL-5+390.63 ng/mL Anti-IL5
	6889796	1579930	8275566

### 3) 验证结果

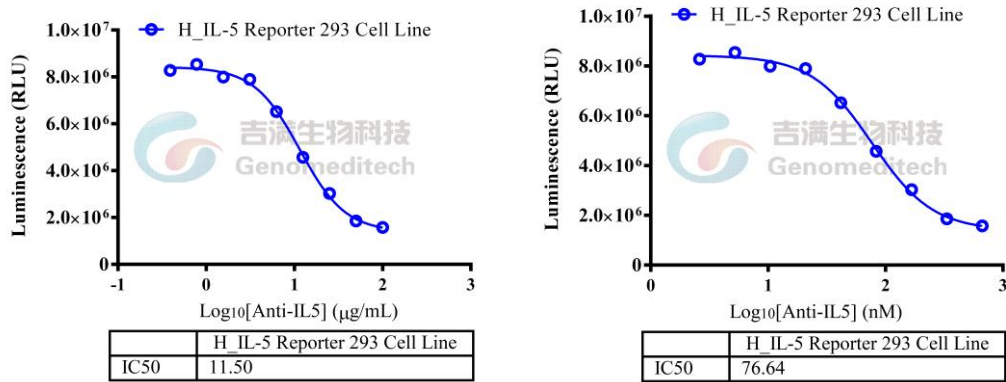


Fig 3. Anti-IL5 Antibody Block 实验验证结果  
 (右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 使用许可协议:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech