

## 产品手册

### GM-CSF Reporter Cell Line

### GM-CSF 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：V2.9.1

## 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.	激活剂验证实验.....	7
1)	细胞准备.....	7
2)	药物准备 (2×稀释浓度).....	7
3)	加样步骤.....	8
4)	报告基因检测.....	8
5)	验证结果.....	9
	使用许可协议: .....	10

## 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-C15752	GM-CSF 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-C15752	GM-CSF 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

粒细胞-巨噬细胞菌落刺激因子(GM-CSF)，又称菌落刺激因子 2 (CSF2)，是巨噬细胞、T 细胞、基质细胞、自然杀伤细胞、内皮细胞和成纤维细胞分泌的一种单体糖蛋白，是一种白细胞生长因子。GM-CSF 对巨噬细胞和嗜酸性粒细胞影响较大。GM-CSF 刺激干细胞产生粒细胞(中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)和单核细胞。单核细胞迁移到组织中，进一步成熟为巨噬细胞和树突状细胞。因此，它是免疫/炎症级联的一部分，通过激活少量巨噬细胞可以迅速导致它们的数量增加，这也是一个对抗感染的关键过程。GM-CSF 对免疫系统的成熟细胞也有一定的作用。例如，增强中性粒细胞迁移和引起细胞表面表达受体的改变 GM-CSF 信号通过信号转换器和转录激活因子 STATs.在细胞因子激活巨噬细胞抑制真菌存活。它诱导细胞内游离锌的剥夺，并增加活性氧的产生，最终导致真菌锌饥饿和中毒因此，GM-CSF 促进了免疫系统的发育，促进了对感染的防御。

低剂量 GM-CSF 信号通路触发 GM-CSFR  $\beta$  链的 Ser 磷酸化，PI3K/Akt 被激活使 BCL-2 活性相应增强。高剂量信号通路触发 GM-CSFR  $\beta$  链 Tyr 磷酸化，导致 JAK/STATs 激活，导致转录因子 PU.1 和 IRF4 上调，IRF8 下调，从而对髓细胞分化和功能产生差异影响。GM-CSF 激活 JAK2/STATs 也可诱导 SOCS 蛋白转录，负向调控信号通路，形成信号调节回路。PI3K 的激活也可以通过优先激活 Akt1 和 Akt2 促进单核细胞/巨噬细胞极化。

吉满生物 GM-CSF Reporter Cell Line 报告基因细胞系，是基于 JAK2/STATs 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 GM-CSF 与 GM-CSFR 结合时，受体  $\beta$  链 Tyr 磷酸化。导致 JAK/STATs 激活入核，从而导致荧光素酶 (Luciferase) 的表达变化。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 GM-CSF 相关药物的体外效果评价。

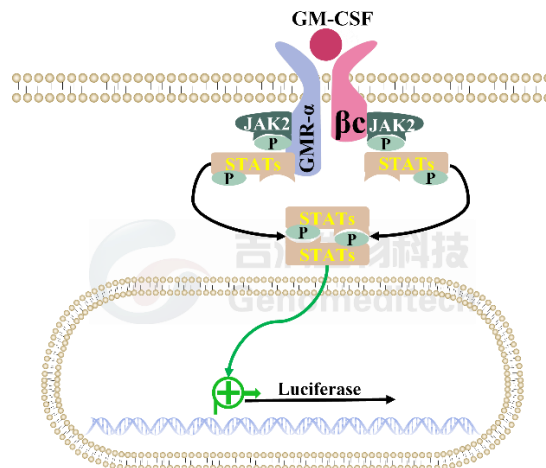


Fig 1. GM-CSF 信号通路

## 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+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.
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen/A0500-3010
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 GM-CSF	/	novoprotein/C003
Passive Lysis 5X Buffer	30 mL	Promega/E1941
Firely Luciferase Assay Reagent	100 mL	Genomeditech/G0483M002

#### 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 × 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 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  $3 \times 10^6$  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: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  $1.2 \times 10^6$  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。

## 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 GM-CSF Reporter Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  Cells/孔。使用激活剂：Recombinant Human GM-CSF (14.6 kDa) 起始终浓度(Conc.01)为 10 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。周围为 100  $\mu$ 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	Recombinant Human GM-CSF	10 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	1.52 pg/mL	0	PBS
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D												
E												
F												
G												
H												

#### 1) 细胞准备

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  $\mu$ L 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 100  $\mu$ L PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育待用。

#### 2) 药物准备 (2 $\times$ 稀释浓度)

- 1) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 2) 每个待测药物，使用一行（如 B2-B11）。
- 3) 母液配置

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

- 4) 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 80.85  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55  $\mu\text{L}$  Assay Buffer。
- 5) 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 1.65  $\mu\text{L}$  Recombinant Human GM-CSF），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 27.5 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.65 $\mu\text{L}$ Recombinant Human GM-CSF 加入		80.85 $\mu\text{L}$	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 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	

- 6) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5  $\mu\text{L}$ ，加入到第 2 个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- 7) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。

### 3) 加样步骤

- a) 将步骤 7 里稀释好的药物 50  $\mu\text{L}$  加入到步骤 1 准备好的细胞悬液里，盖上市盖，于孵箱中孵育 24 h。
- b) 使用报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

### 4) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

GM-CSF Reporter Cell Line	PBS Control	10 ng/mL	1.52 pg/mL
	1839	50953	1856



## 5) 验证结果

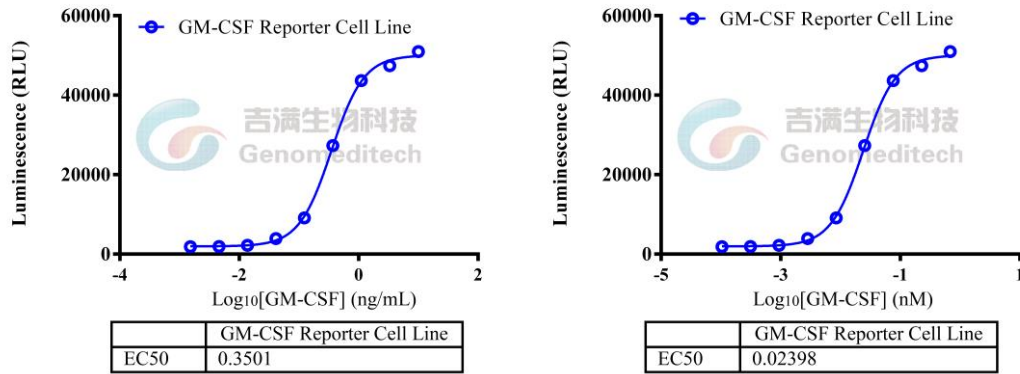


Fig 2. Recombinant Human GM-CSF 激活验证结果  
 (右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 使用许可协议:

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