

产品手册

H_IL17A Reporter 293 DDX35TM Cell Line

H_IL17A Reporter 293 DDX35TM 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.2

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、	传代稳定性.....	5
五、	材料准备.....	6
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	6
2.	试剂耗材准备.....	6
六、	细胞复苏、传代、冻存.....	7
1.	细胞复苏.....	7
2.	细胞传代（以 10 cm 皿为例）.....	7
3.	细胞冻存.....	7
七、	使用方法（示例）.....	8
1.	Assay 验证实验.....	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	9
3)	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-C26020	H_IL17A Reporter 293 DDX35 TM Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C26020	H_IL17A Reporter 293 DDX35 TM 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. 本产品相关实验，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

白介素-17 家族。该家族的细胞因子被分别命名为白介素-17A 到白介素-17F。它们的受体家族：白介素-17 受体 A 到白介素-17 受体 E。这些白介素-17 细胞因子可以结合到相对应的受体成员上从而介导不同的炎症反应。

该家族中最具代表性的成员白介素-17A (IL-17A)，在机体受感染或损伤处，迁移过来的淋巴细胞会分泌 IL-17A。IL-17A 一方面会诱导炎症因子以及趋化因子的表达，从而招募更多的免疫细胞到达炎症部位加剧机体的炎症因子的表达，过高的 IL-17A 水平对于疾病的病理发展起恶化作用反应；另一方面，IL-17A 还会诱导一些组织修复相关因子的表达从而加速机体的恢复。虽然 IL-17A 在宿主抗感染和组织修复过程中起到扩大免疫防御反应保护自身机体的作用，但是，在很多自身免疫病病人和肿瘤病人当中 IL-17A 又是高表达的，可以诱导很多炎症。很多动物实验也证明，IL-17A 缺失或者抗体中和 IL-17A，可以有效抑制多种自身免疫病发展程度。

IL-17 受体家族由 5 个成员 IL-17RA 到 IL-17RE 组成。IL-17A 的受体是 IL-17RA 与 IL-17RC 形成异质二聚体复合物。迄今为止，所有 IL-17 受体都用 Act1 作为下游信号转导的衔接分子。

吉满生物 H_IL17A Reporter 293 DDX35™ Cell Line 报告基因细胞系，是通过大量、多轮单克隆筛选，获得的具有高稳定特性同时兼具高灵敏性、高倍率性的优选单克隆。可以满足客户批量建库、放行实验等标准。

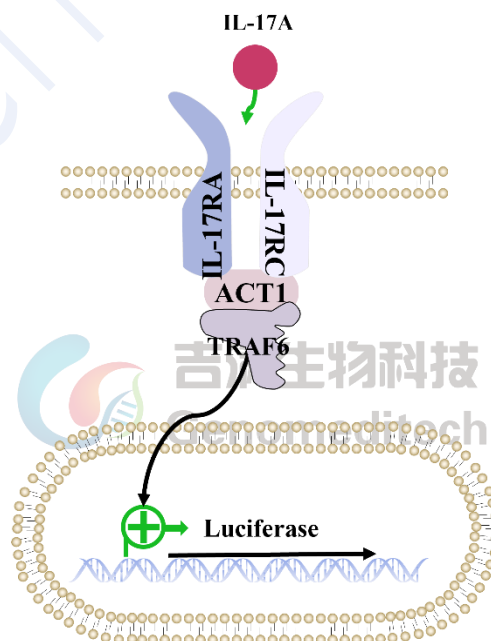


Fig 1. 原理示意图

四、 传代稳定性

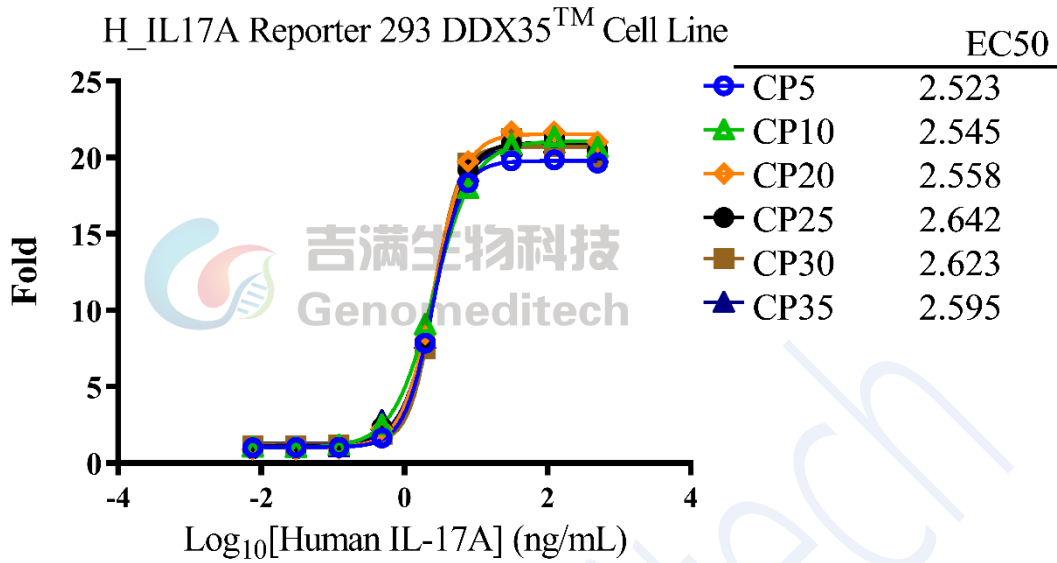


Fig 2. 制备 Human IL-17A 梯度稀释液；提前 16-24 h 配置 H_IL17A Reporter 293 DDX35TM Cell Line (Genomeditech/# GM-C26020)，每孔细胞量 1.5×10^4 个。然后加入稀释好的 Human_IL-17A，孵育 7 h 后检测 Luciferase 数值，使用 GraphPad 系统进行数据分析，纵坐标转换为倍率。结果显示，不同代次间倍率、EC50 数值稳定。

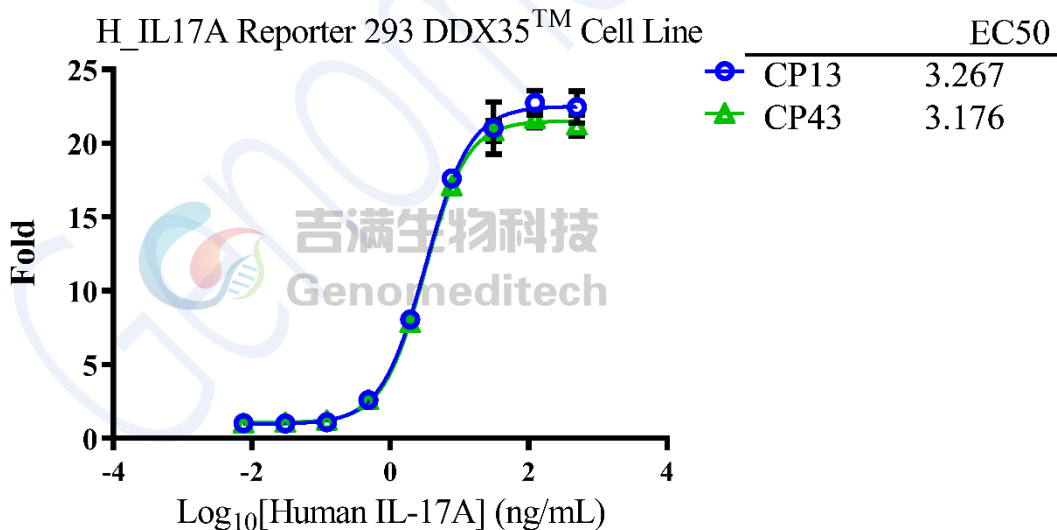


Fig 3 制备 Human IL-17A 梯度稀释液；提前 16-24 h 配置 H_IL17A Reporter 293 DDX35TM Cell Line (Genomeditech/# GM-C26020)，每孔细胞量 1.5×10^4 个。然后加入稀释好的 Human_IL-17A，3 复孔。孵育 7 h 后检测 Luciferase 数值，使用 GraphPad 系统进行数据分析，纵坐标转换为倍率。结果显示，P13 代与 P43 代倍率、EC50 数值稳定。

五、 材料准备

1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

细胞复苏培养基:	E MEM(ATCC)+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	E MEM(ATCC)+10% FBS+1% P.S+3 μ g/mL Blasticidin+150 μ g/mL Hygromycin+1.5 μ g/mL Puromycin+100 μ g/mL Zeocin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer	E MEM(ATCC)+1 % FBS+1% P.S

注意：细胞应使用 ATCC/30-2003 EMEM 培养基或购买吉满生物完全培养基培养，血清需使用说明书相同血清或 gibco 血清。

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/ GM-040403-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Zeocin	100 mg	Genomeditech/GM-040407-100MG
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
EMEM	500 mL	ATCC/30-2003
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	96-well	Corning/3912
Microplate		
96 Well White Polystyrene Microplate	96-well	Corning/3903
Cell Culture Dish	10 cm	NEST/704001
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C
Recombinant Human IL-17A (C-6His)	50ug	Novoprotein/C774

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

六、 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 5×10^6 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。

七、使用方法（示例）

1. Assay 验证实验

操作步骤可根据示例调整优化，对于本次实验，推荐 H_IL17A Reporter 293 DDX35™ Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human IL-17A (C-6His) (15.9 kDa; 以下简称 Human IL-17A) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 500ng/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。周围孔加入 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 IL-17A	PBS	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	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 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ 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-B11）。
- 母液准备

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-17A	0.5 mg/mL	0.05 mg/mL	取 2 μ L 储液+18 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 145.2 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 110 μ 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 1.47 μL Human IL-17A），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 36.67 μL ，加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.47 μL Human IL-17A	加入	145.2 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	

- g) 从第一个稀释孔 B2 中吸取 36.67 μL ，加入到第二个稀释孔 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 准备的细胞孔板取出，吸弃上清 100 μL 。
- j) 加入梯度稀释好的药物，100 μL 每孔。
- k) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养 7 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_IL17A Reporter 293	0 ng/mL	500 ng/mL	7.63 pg/mL
DDX35 TM Cell Line	181199	4336189	222793

3) 验证结果

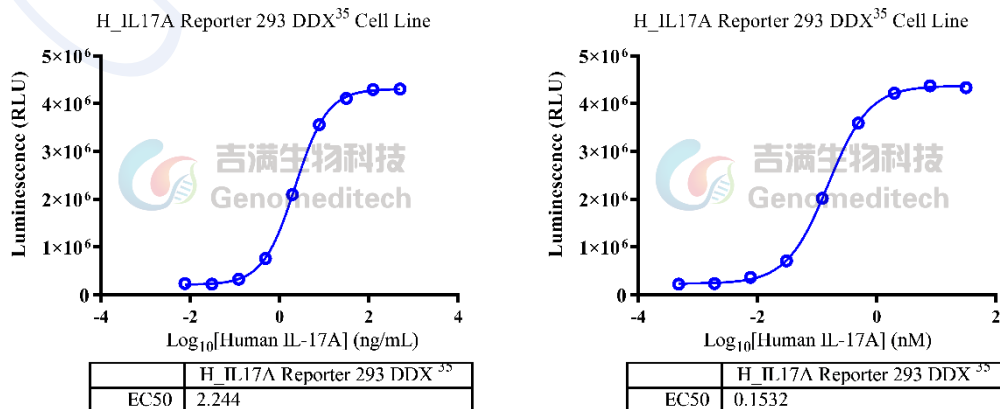


Fig 4. 验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）。

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