

产品手册

H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line

H_CD25 CD122 CD132 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：V2.9.2

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.....	6
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	6
2.	试剂耗材准备.....	6
五、	细胞复苏、传代、冻存.....	7
1.	细胞复苏.....	7
2.	细胞传代.....	7
3.	细胞冻存.....	7
六、	使用方法.....	8
1.	激动剂激活实验.....	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	10
附录 1	功能细胞系流式结果.....	11
附录 2	稳定性结果.....	12
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-C29055	H_CD25 CD122 CD132 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-C29055	H_CD25 CD122 CD132 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

白细胞介素-2(IL-2)是肿瘤浸润淋巴细胞的关键生长因子,主要由活化的 T 细胞表达,其发生在 T 细胞受体识别同源抗原时。虽然 IL-2 促进活化效应细胞和幼稚 T 细胞的增殖和存活,但它也激活调节性 T 细胞 (Tregs)。

IL-2 的活性主要通过与淋巴细胞表面的 IL-2 受体结合并传导信号到胞内,IL-2 受体是由 α 、 β 、 γ 三个亚基组成的异聚体 (IL-2R α /CD25, IL-2R β /CD122, IL-2R γ /CD132)。

IL-2R γ /CD132 在所有淋巴细胞上表达,而 IL-2R β /CD122 在自然杀伤 (NK) 和 CD8 记忆 T 细胞上组成型表达,并且可以在抗原识别后在幼稚 T 细胞上诱导。IL-2R γ /CD132 和 IL-2R β /CD122 能够进行细胞内信号传导的亚基,而 IL-2R α /CD25 不参与信号传导。

低浓度的 IL-2 优先结合在 Treg 上组成型表达的高亲和力三元复合物受体 (IL2R $\alpha\beta\gamma$),因此低剂量 IL-2 可激活 Treg 来诱导免疫耐受,用于治疗 1 型糖尿病,红斑狼疮等自身免疫性疾病的治疗。高浓度的 IL-2 饱和 Treg 之后会结合比如 NK 细胞和 CD8+T 细胞上组成型表达的中等亲和力的二元复合物受体 (IL2R $\beta\gamma$),激活 NK 细胞和 CD8+T 细胞,增加抗癌活性。而在 IL-2R α /CD25 亚基单独存在时,其与 IL-2 的亲合力只有三元复合物受体 (IL2R $\alpha\beta\gamma$) 的百分之一。因此不同的研发公司根据不同的应用场景进行了不同设计方法的探索,包括 PEG 化修饰、融合 Fc、突变体设计、双特异性抗体设计、联合免疫检查点抗体用药等策略。

吉满生物开发了不表达 IL-2R α /CD25 受体的 H_CD122 CD132 Reporter Cell Line/GM-C29054 报告基因细胞系与高表达 IL-2R α /CD25 受体的 H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line/GM-C29055 报告基因细胞系,当 IL-2 结合受体后,激活下游信号通路,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-2 及其受体相关药物等的体外效果评价。

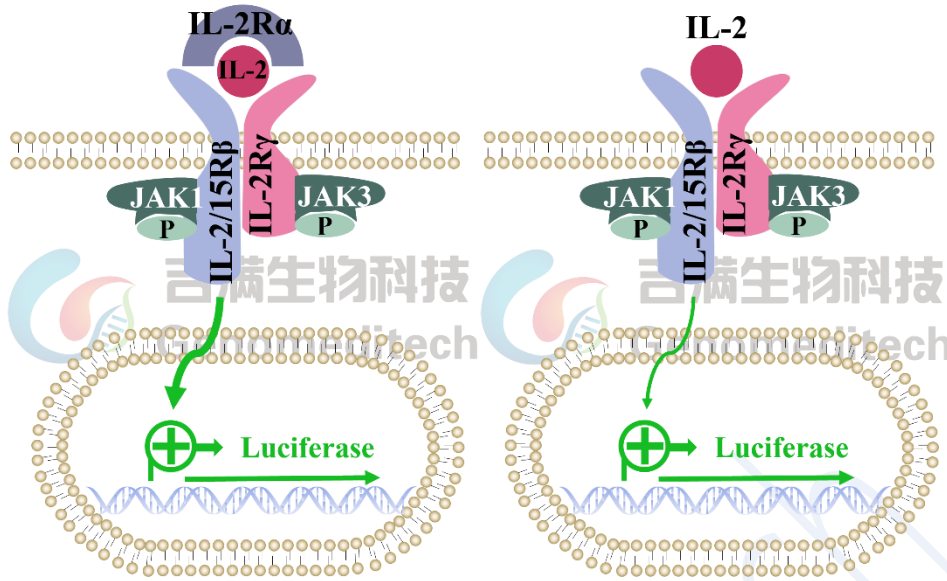


Fig 1. 左图 H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line 原理示意图；右图 H_CD122 CD132 Reporter Cell Line 原理示意图

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
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+3.5 µg/mL Blasticidin+400 µg/mL G418+200 µg/mL Hygromycin+0.75 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
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/ GM-040403-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell/C3010-0500
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
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C
Recombinant Human IL-2	10 µg	Novoprotein/C013
Anti-CD122 hIgG1 Antibody (HuABC-2)	/	Genomeditech/GM-52319AB
Anti-CD132(IL2RG) hIgG4 Antibody (REGN7257)	/	Genomeditech/GM-52334AB
Anti-CD25 hIgG1 Antibody(Basiliximab)	/	Genomeditech/GM-52329AB
H_CD122 CD132 Reporter Cell Line	/	Genomeditech/GM-C29054

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,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 4-6 × 10⁵ 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 悬液),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 × 10⁶ 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。

- 此细胞为淋巴细胞状,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。
- 当细胞密度达到 1.5-2 × 10⁶ cells/mL, 1 传 3, 隔 2-3 天继续传代,不要让其密度超 2 × 10⁶ cells/mL,推荐使用 T25 瓶进行传代培养。
- 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:

- 该细胞对密度较为敏感,培养、传代时请注意保持细胞密度在合适的范围。
- 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。

六、使用方法

1. 激动剂激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_CD122 CD132 Reporter Cell Line (Genomeditech/#GM-C29054)、H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line 细胞量为 1×10^5 Cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human IL-2 (15.5 KDa; 以下简称 Human IL-2) 作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释。H_CD122 CD132 Reporter Cell Line 做 9 个梯度，Conc.01-Conc.9 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照；H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line 做 11 个梯度，Conc.01-Conc.11 分别排布在 C1-C11，C12 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	Human IL-2	PBS	1 $\mu\text{g/mL}$	333.33 ng/mL	111.11 ng/mL	37.04 ng/mL	12.35 ng/mL	4.12 ng/mL	1.37 ng/mL	457.25 pg/mL	152.42 pg/mL	0	PBS
C	Human IL-2	1 $\mu\text{g/mL}$	333.33 ng/mL	111.11 ng/mL	37.04 ng/mL	12.35 ng/mL	4.12 ng/mL	1.37 ng/mL	457.25 pg/mL	152.42 pg/mL	50.81 pg/mL	16.94 pg/mL	0
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 在实验前 1-2 h，将细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用适量 Assay Buffer 重悬细胞，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 $50 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上班盖，放入培养箱中备用。
- 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、C1-C12）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-2	0.1 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 80.85 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 μL Assay Buffer；C1 孔加入 80.85 μL Assay Buffer，C2-C12 孔，加入 55 μL 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、C1 中分别加入 1.65 μL Human IL-2），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 27.5 μL ，加入次孔										对照组	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.65 μL Human IL-2	加入	80.85 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	
C	1.65 μL Human IL-2	80.85 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5 μL ，加入到第 2 个梯度稀释孔 B3，充分混匀。以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- h) 从第 1 个梯度稀释孔 C1 中吸取 27.5 μL ，加入到第 2 个梯度稀释孔 C2，充分混匀。以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（C11）。
- i) 将步骤 a 准备的细胞孔板取出，分别加入步骤 g、h 准备好的梯度稀释液，每孔 50 μL 。（注：将步骤 g 准备好的梯度稀释液加到 H_CD122 CD132 Reporter Cell Line 细胞孔中，将步骤 h 准备好的梯度稀释液，加到 H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line 细胞孔中。）
- j) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 16 h。
- k) 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_CD122 CD132 Reporter Cell Line	0 ng/mL	1 $\mu\text{g/mL}$	152.42 pg/mL
	326952	2951698	330449
H_CD25 CD122 CD132 Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	16.94 pg/mL
	141882	1348699	150083

3) 验证结果

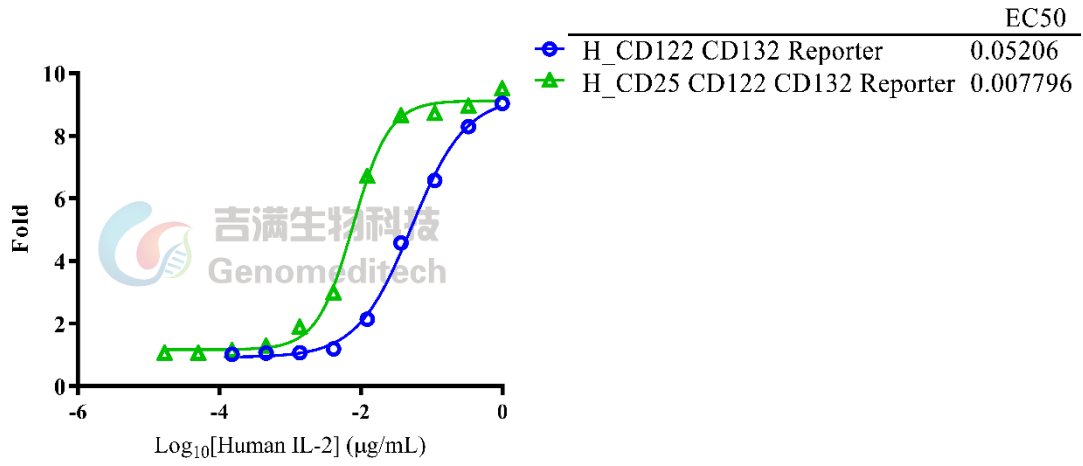


Fig 2.1 功能验证结果

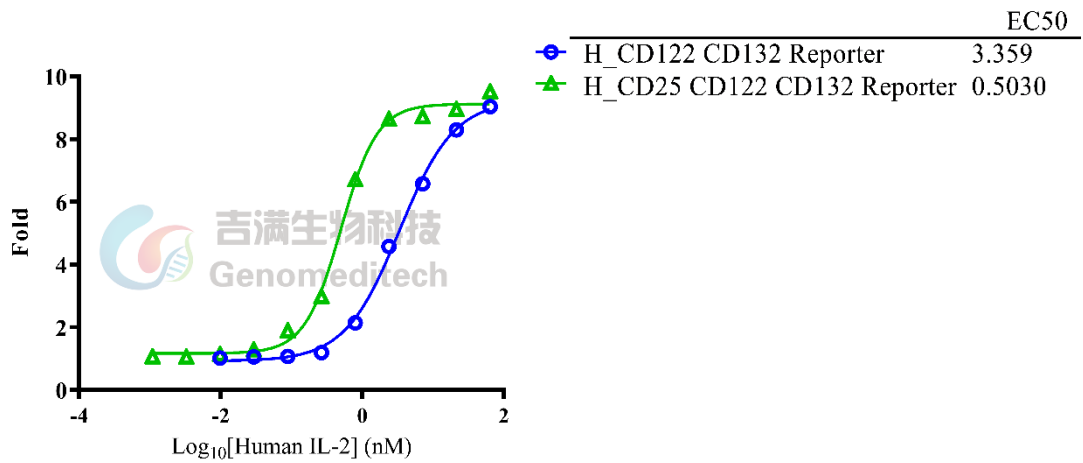


Fig 2.2 功能验证结果

（倍率换算：通过将加药孔数值/空孔数值，将 luminescence 值换算成 Fold；Fig 2.2 对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

附录 1 功能细胞系流式结果

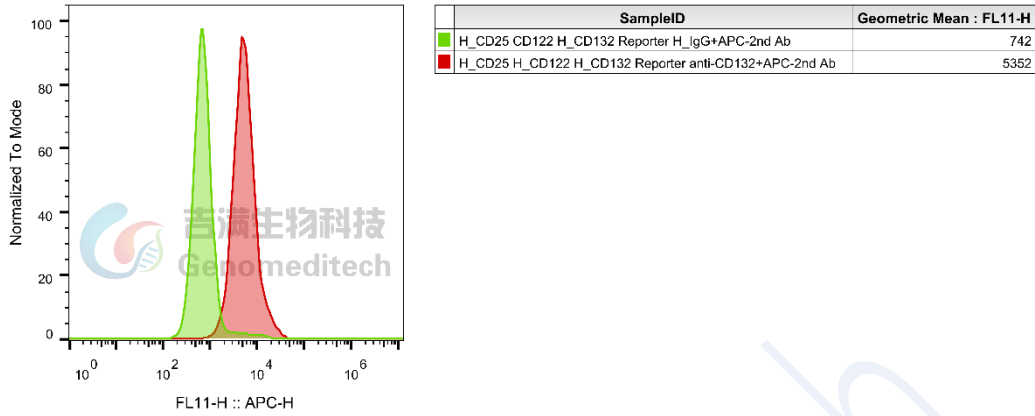


Fig 3.使用 Anti-CD132(IL2RG) hIgG4 Antibody(REGN7257) (Genomeditech/GM-52334AB)验证功能细胞表达结果

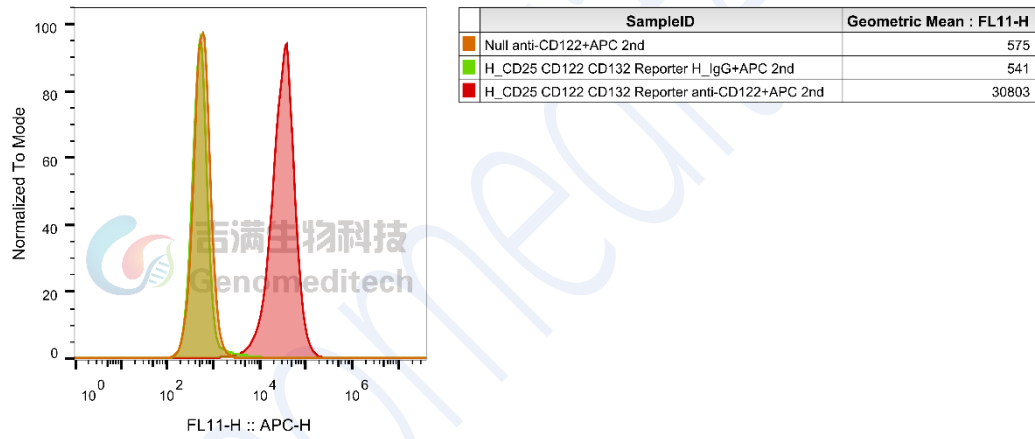


Fig 4.使用 Anti-CD122 hIgG1 Antibody (HuABC-2) (Genomeditech/GM-52319AB)验证功能细胞表达结果

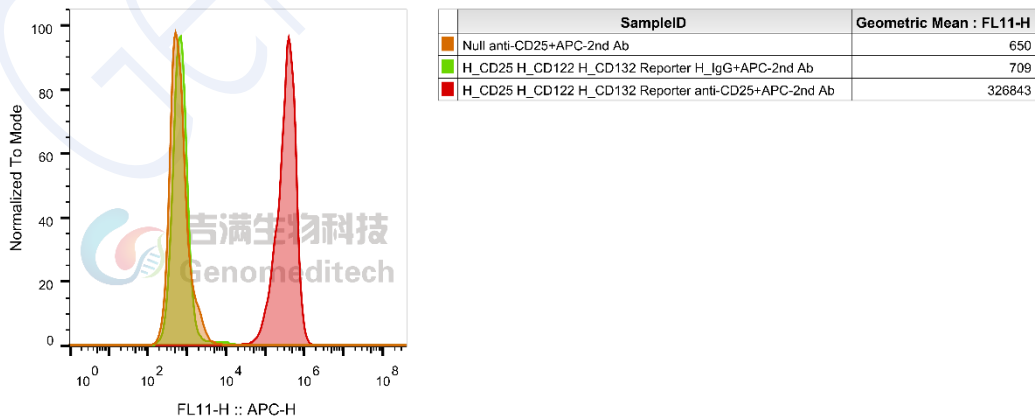


Fig 5.使用 Anti-CD25 hIgG1 Antibody(Basiliximab) (Genomeditech /GM-52329AB)验证功能细胞表达结果

附录 2 稳定性结果

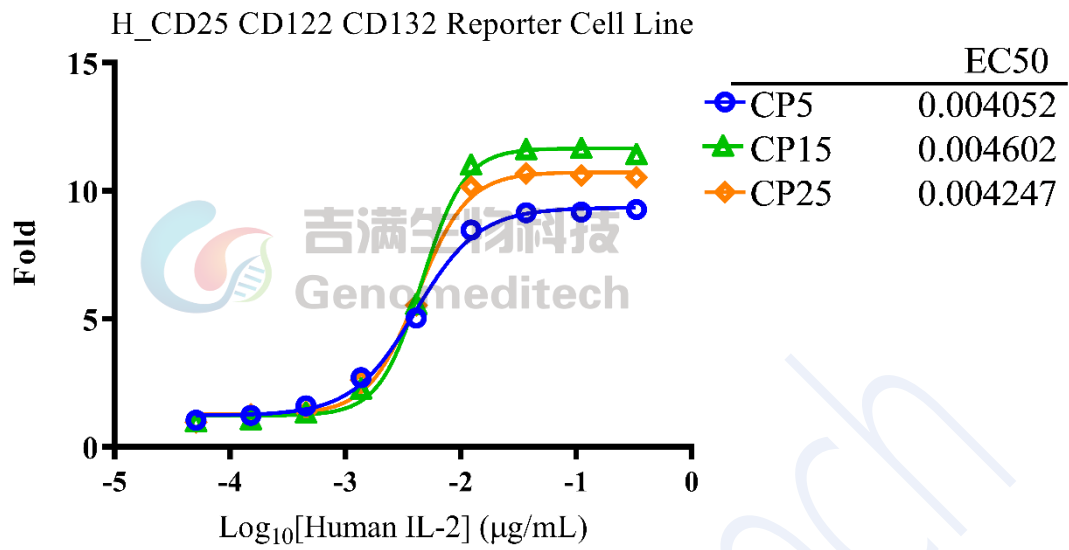


Fig 6.使用 Recombinant Human IL-2 (novoprotein/C013)稳定性验证结果

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