

产品手册

Cynomolgus_IL-31RA OSMR Reporter Baf3 Cell Line

Cynomolgus_IL-31RA OSMR 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：V2.11.2

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.....	7
1.	激动剂验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	抗体抑制实验.....	9
1)	报告基因检测.....	10
2)	验证结果.....	11
	附录 1 流式结果.....	12
	相关产品.....	13
	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-C38785	Cynomolgus_IL-31RA OSMR Reporter Baf3 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C38785	Cynomolgus_IL-31RA OSMR Reporter Baf3 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-31 (IL-31) 是一种新型细胞因子, 其受体与 IL-6 受体相似, 因此归属于 IL-6 细胞因子家族。其主要由活化的 CD4+T 淋巴细胞分泌, 特别是活化的辅助性 Th2 细胞、肥大细胞、巨噬细胞以及树突状细胞等。IL-31 主要通过感知周围神经系统的瘙痒来调节皮肤中细胞介导的免疫力, 通过增加气道炎症调节肺部的免疫力, 并通过防御微生物来调节肠道中的免疫力。

IL-31 通过 IL31RA 和 OSMR(oncostatin M receptor)受体形成异源二聚体复合物传递信号。其信号通路与慢性瘙痒性皮肤病 (如特应性湿疹) 密切相关。针对 IL-31 或 IL-31 受体的单克隆抗体相关药物可以有效地减少瘙痒和睡眠障碍, 改善皮肤病变, 并最大限度地减少局部类固醇的使用。

吉满生物 Cynomolgus_IL-31RA OSMR Reporter Baf3 Cell Line 报告基因细胞系。当 IL-31 结合 IL31RA 和 OSMR 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-31 及等相关药物的体外效果评价。

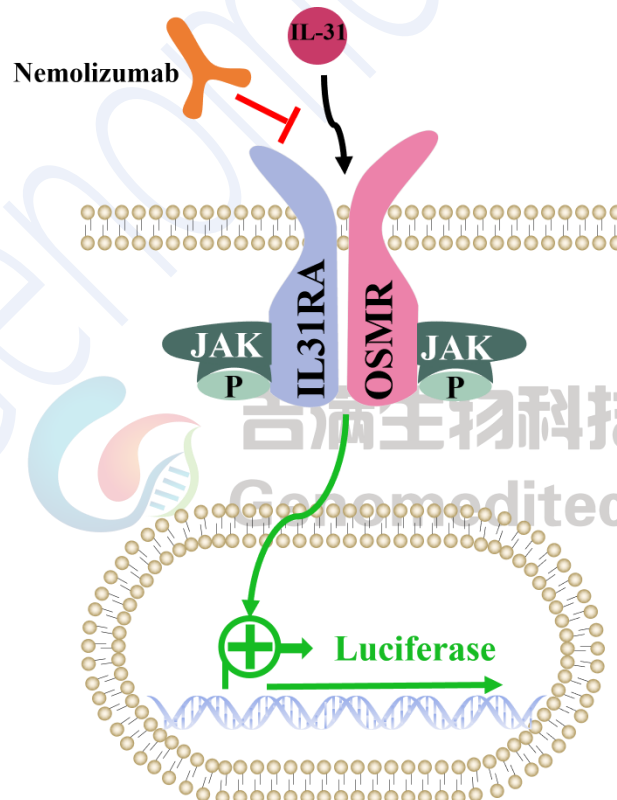


Fig 1. 原理示意图

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:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+8 ng/mL M_IL-3+5 µg/mL Blasticidin+50 µg/mL G418+0.25 µg/mL Puromycin
细胞冻存培养基:	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.
RPMI 1640	500 mL	VivaCell/C3010-0500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
Recombinant Mouse IL-3 (C-6His)	50 µg	Novoprotein/CP39
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
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 Cynomolgus IL31 Protein; His Tag	50 µg	Sino Biological/90895-C08H
Anti-IL31RA IgG2 Antibody(Nemolizumab)	/	Genomeditech/GM-50871AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503

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 3min，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

1. 激动剂验证实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 Cynomolgus_IL-31RA OSMR Reporter Baf3 Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Recombinant Cynomolgus IL-31 Protein (His Tag) (16.8 kDa; 以下简称 Cyno_IL-31) 作为阳性药物, Conc.01 浓度为 30 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。周围孔加入 100 μ 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	Cyno_IL-31	30 ng/mL	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	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 1-2 h, 将细胞从培养瓶中取出, 使用 Assay Buffer 清洗 2 遍, 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/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖上市盖, 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
Cyno_IL-31	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 80.52 μ L Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 55 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 1.98 μL Cyno_IL-31），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										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.98 μL Cyno_IL-31	加入	80.52 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5 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，加入梯度稀释好的药物，每孔 50 μL 。
j) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 6 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。

Cynomolgus_IL-31RA OSMR Reporter Baf3 Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30 ng/mL	4.57 pg/mL
	114705	4020872	173956

3) 验证结果

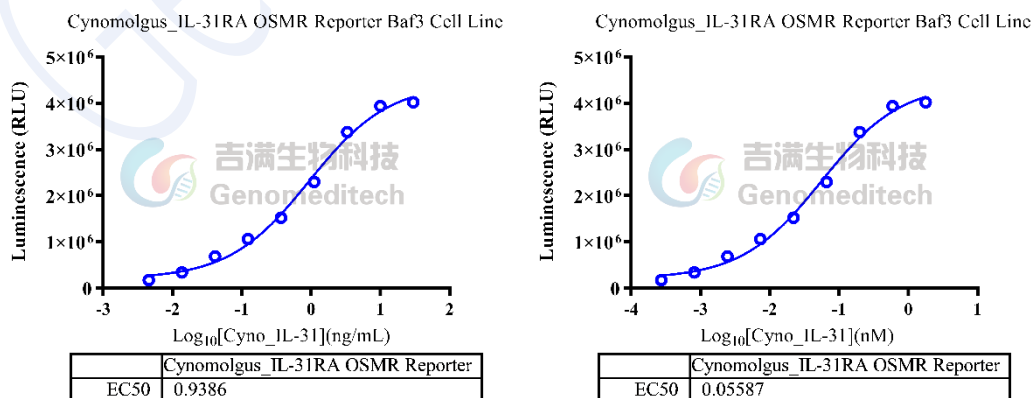


Fig 2. 激活验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. 抗体抑制实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 Cynomolgus_IL-31RA OSMR Reporter Baf3 Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。

本次实验使用 Anti-IL31RA hIgG2 Antibody(Nemolizumab) (150 kDa; 以下简称为 Nemolizumab) 作为阳性药物。Conc.01 终浓度为 $30 \mu\text{g/mL}$, 3 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.13 分别排布在 B2-B10、C2-C4, C5 为 0 浓度对照。周围孔加入 $100 \mu\text{L}$ 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	Nemolizumab	30 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	3.33 $\mu\text{g/mL}$	1.11 $\mu\text{g/mL}$	370.37 ng/mL	123.46 ng/mL	41.15 ng/mL	13.72 ng/mL	4.57 ng/mL	1.52 ng/mL	1PBS
C	PBS	508.05 pg/mL	169.35 pg/mL	56.45 pg/mL	0	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS							
E												
F												
G												
H												

加样步骤

- 在实验前 1-2 h, 将细胞从培养瓶中取出, 使用 Assay Buffer 清洗 2 遍, 检测细胞活力并计数, 再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 3.04×10^6 cells/mL。以排枪加 $33 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上市盖, 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。
- 待测抗体, 使用两行 (如 B2- C4)。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Nemolizumab	4.054 mg/mL	/	直接使用储液
Cyno IL-31	0.25 mg/mL	$2.5 \mu\text{g/mL}$	取 $2 \mu\text{L}$ 储液+ $198 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 $53.2 \mu\text{L}$ Assay Buffer, B3-B11、C2- C4 孔, 加入 $33 \mu\text{L}$ 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 1.22 μL Nemolizumab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.15 μL ，加入次孔											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.22 μL Nemolizumab 加入		53.2 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	
C	B11 孔 加入		36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL	36.3 μL							
D						对照组							
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.15 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 13 个梯度稀释孔（C4）。
- i) 配置 $3 \times$ 激活剂，6 ng/mL Cyno IL-31（1.3 μL 2.5 $\mu\text{g/mL}$ Cyno IL-31 母液加入到 543.2 μL Assay Buffer 中，混匀后使用）。
- j) 将步骤 a 的细胞孔板取出。加入步骤 h 梯度稀释的抗体，每孔 33 μL 混匀，盖上盖板放入培养箱孵育 1 h。
- k) 1 h 后，将步骤 j 的混合溶液孔板取出，加入步骤 i 准备好的 Cyno_IL-31 溶液，每孔加入 33 μL 。
- l) 盖上班盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- m) 收样检测 Luciferase。

1) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

Cynomolgus_IL-31RA OSMR Reporter Baf3 Cell Line	2 ng/mL Cyno IL-31 + 0 $\mu\text{g/mL}$	2 ng/mL Cyno IL-31 + 30 $\mu\text{g/mL}$	2 ng/mL Cyno IL-31 + 56.45 $\mu\text{g/mL}$
	1290421	165620	1364062

2) 验证结果

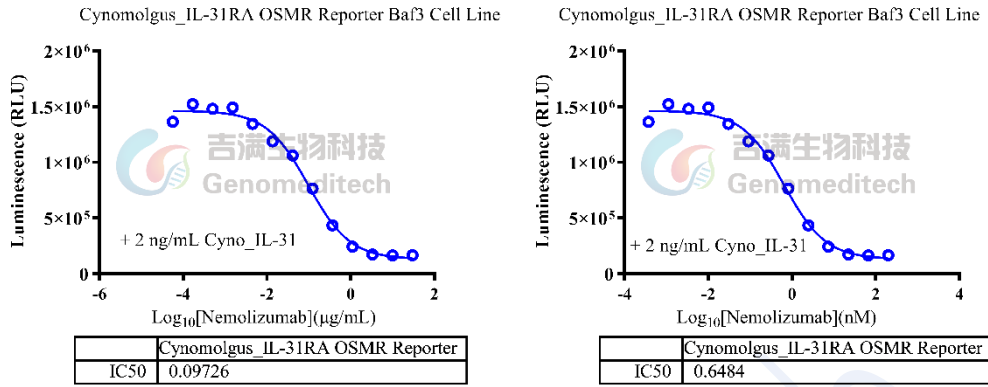


Fig 3. Antibody block 抑制结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1 流式结果

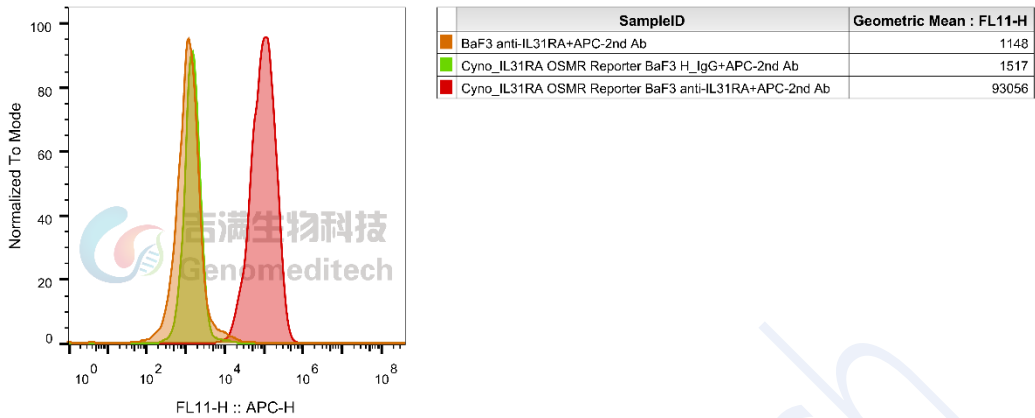


Fig 4.使用 Anti-IL31RA hIgG2 Antibody (Genomeditech /GM-50871AB)验证功能细胞表达结果

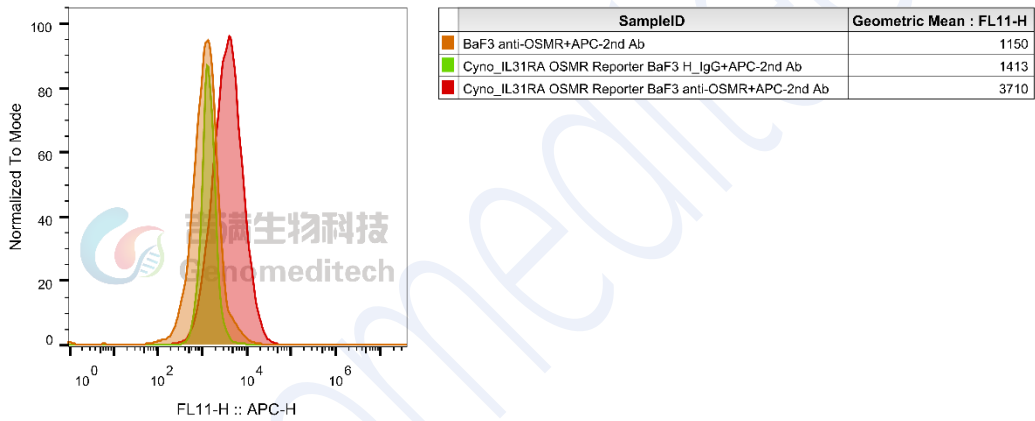


Fig 5.使用 Anti-OSMR hIgG4 Antibody (Genomeditech /GM-50874AB)验证功能细胞表达结果

相关产品

OX40	
H_OX40 Reporter Cell Line	Cynomolgus_OX40L CHO-K1 Cell Line
H_OX40 CHO-K1 Cell Line	H_OX40L CHO-K1 Cell Line
H_OX40L HEK-293 Cell Line	
Anti-H_OX40 hIgG2 Antibody(Ivuxolimab)	Anti-OX40L hIgG1 Reference Antibody(Oxebio)
Anti-OX40L hIgG4 Antibody(Amlitelimab)	Anti-OX40L hIgG4 Reference Antibody(Amlbio)
Biotinylated Human OX40L Protein; His-Avi Tag	Cynomolgus OX40 Protein; His Tag
Cynomolgus OX40L Protein; His Tag	Cynomolgus OX40L Protein; mFc Tag
Human OX40 Protein; His Tag	Human OX40L Protein; His Tag
Human OX40L Protein; mFc Tag	
IL-4/IL-13	
IL-4 Reporter Cell Line	IL-4/IL-13 Reporter 293 Cell Line
IL-4/IL-13 Reporter 293 DDX35TM Cell Line	Cynomolgus_IL4R CHO-K1 Cell Line
H_IL4R CHO-K1 Cell Line	
Anti-IL-4R hIgG1 Antibody(12B5)	Anti-IL4R hIgG4 Antibody(Dupilumab)
Anti-IL4R hIgG4 Reference Antibody (Dupbio)	
Human IL-4R alpha Protein; mFc Tag	
IL-31	
H_IL-31 Reporter Cell Line	Cynomolgus_IL31RA CHO-K1 Cell Line
	H_IL31RA CHO-K1 Cell Line
H_IL31RA HEK-293 Cell Line	H_IL-31RA OSMR Baf3 Cell Line
Anti-IL31 hIgG1 Antibody(mAb33)	Anti-IL31RA hIgG1 Antibody(NA633)
Anti-IL31RA hIgG2 Antibody(Nemolizumab)	Anti-OSMR hIgG4 Antibody(Vixarelimab)

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。