

产品手册

H_IL-31 Reporter Cell Line

H_IL-31 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：V2.8.2

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-31 Reporter Cell Line 细胞复苏.....	6
2.	H_IL-31 Reporter Cell Line 细胞传代.....	6
3.	H_IL-31 Reporter Cell Line 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.	Block 抗体抑制实验.....	9
(1)	Block 抗体靶向受体.....	9
(2)	Block 抗体靶向激动剂.....	11
(3)	报告基因检测.....	13
(4)	验证结果.....	13
附录 1	功能细胞系流式结果.....	14
使用许可协议:	15

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-C25989	H_IL-31 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-C25989	H_IL-31 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-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 H_IL-31 Reporter 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。

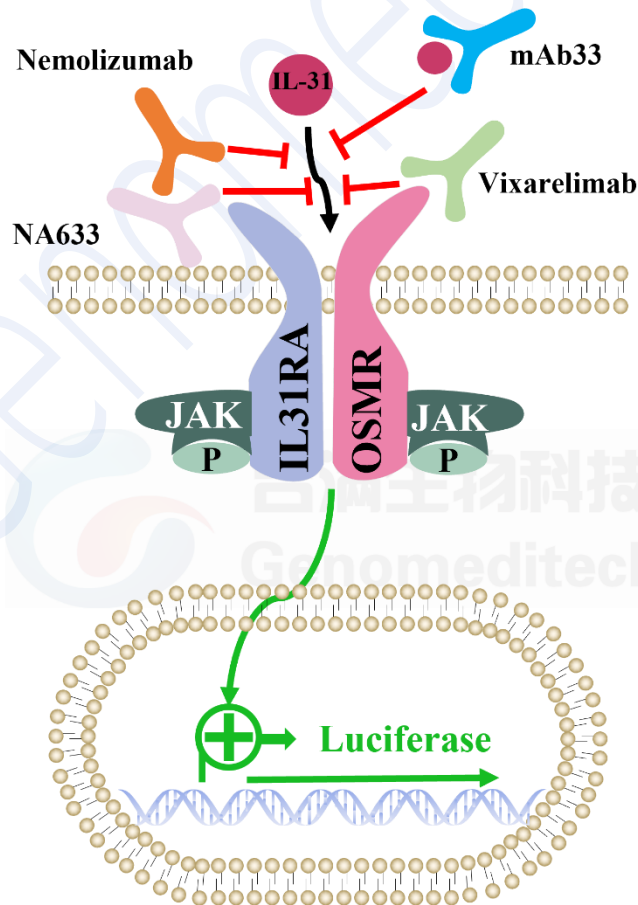


Fig 1. 原理示意图

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:	DMEM+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S+400 µg/mL G418+0.75 µg/mL Puromycin+4 µg/mL Blasticidin
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
G418	1g	Genomeditech/GM-040402-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
DMEM	500 mL	gibco/C11995500BT/8122062
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-040503B
Passive Lysis 5X Buffer	30 mL	Promega/E1941
Firefly Luciferase Assay Reagent	100 mL	Genomeditech/G0483M002
Human IL-31 / IL31 Protein (His Tag)	/	SinoBiological/11557-H08H
Anti-IL31RA IgG2 Antibody(Nemolizumab)	/	Genomeditech/GM-50871AB
Anti-IL31RA hIgG1 Antibody(NA633)	/	Genomeditech/GM-50880AB
Anti-OSMR hIgG4 Antibody(Vixarelimab)	/	Genomeditech/GM-50874AB
Anti-IL31 hIgG1 Antibody(mAb33)	/	Genomeditech/GM-50883AB

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-31 Reporter 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-31 Reporter 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-31 Reporter 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 5×10^6 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. 激动剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_IL-31 Reporter Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Human IL-31 / IL31 Protein (His Tag) (17.3 KDa; 以下简称 Human IL-31) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 300 ng/mL，5 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	Human IL-31	300 ng/mL	60 ng/mL	12 ng/mL	2.4 ng/mL	480 pg/mL	96 pg/mL	19.2 pg/mL	3.84 pg/mL	768 fg/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）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-31	0.15 mg/mL	0.015 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 134.75 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 2.75 μL Human 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	2.75 μL Human IL-31	加入	134.75 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 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 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100 μL 培养基。
- j) 加入梯度稀释好的药物，每孔 100 μL 。
- k) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 6 h。
- l) 使用 Firefly Luciferase Assay Reagent 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-31 Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	300 ng/mL	768 fg/mL
	2550	428031	2808

3) 验证结果

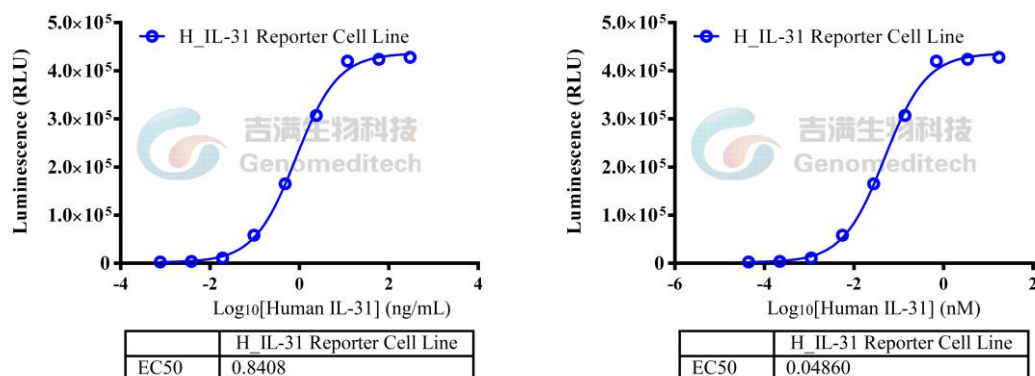


Fig 2. Human IL-31 激活验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. Block 抗体抑制实验

(1) Block 抗体靶向受体

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_IL-31 Reporter Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Human IL-31 / IL31 Protein (His Tag) (17.3 KDa; 以下简称 Human IL-31) 作为激活药物 (激活浓度使用 0.84 ng/mL)，Anti-OSMR hIgG4 Antibody(Vixarelimab)、Anti-IL31RA hIgG1 Antibody(NA633)、Anti-IL31RA hIgG2 Antibody(Nemolizumab)作为 block 抗体 (150 kDa; 以下分别简称为 Vixarelimab、NA633、Nemolizumab)。以 Vixarelimab 为例：Conc.01 终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ ，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 μL PBS，以防止边孔蒸发。3 种抗体浓度及孔板排布如下：

	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	0.84 ng/mL Human IL-33+ Vixarelimab	PBS	50 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	3.13 $\mu\text{g/mL}$	781.25 ng/mL	195.31 ng/mL	48.83 ng/mL	12.21 ng/mL	3.05 ng/mL	762.94 pg/mL	0	PBS
C	0.84 ng/mL Human IL-33+ NA633	PBS	50 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	3.13 $\mu\text{g/mL}$	781.25 ng/mL	195.31 ng/mL	48.83 ng/mL	12.21 ng/mL	3.05 ng/mL	762.94 pg/mL	0	PBS
D	0.84 ng/mL Human IL-33+ Nemolizumab	PBS	50 $\mu\text{g/mL}$	3.13 $\mu\text{g/mL}$	5.56 $\mu\text{g/mL}$	781.25 ng/mL	195.31 ng/mL	48.83 ng/mL	12.21 ng/mL	3.05 ng/mL	762.94 pg/mL	0	PBS
E		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
F													
G													
H													

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 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上报板盖，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。
- 每个待测抗体，使用一行 (如 B2-B10)。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Vixarelimab	0.68 mg/mL	/	直接使用储液
NA633	2.32 mg/mL	/	直接使用储液
Nemolizumab	2.21 mg/mL	/	直接使用储液
Human IL-31	0.15 mg/mL	0.0015 mg/mL	取 2 μ L 储液 + 198 μ L Assay Buffer

- e) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，以 Vixarelimab 为例：如 B2 孔加入 62.5 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 10.8 μ L Vixarelimab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.3 μ L，加入次孔										对照组	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	10.8 μ L Vixarelimab 加入		62.5 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	
C	3.2 μ L NA633 加入		70.1 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	
D	3.3 μ L Nemolizumab 加入		70.0 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.3 μ 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) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100 μ L 上清。加入步骤 h 梯度稀释的抗体，50 μ L 每孔，与细胞孵育 1h。
- j) 配置激活药物 Human IL-31（2 \times 激活浓度），取 3.3 μ L 稀释后的母液，加入到 2930 μ L Assay Buffer 中，混匀。
- k) 1 h 后，将步骤 i 的细胞孔板取出，依次加入步骤 j 配置好的 Human IL-31，每孔加入 50 μ L。
- l) 盖上板盖，于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- m) 使用 GMOne-Step 报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。结果请见页 13。

(2) Block 抗体靶向激动剂

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_IL-31 Reporter Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Human IL-31 / IL31 Protein (His Tag) (17.3 KDa; 以下简称 Human IL-31) 作为激活药物 (激活浓度使用 0.84 ng/mL)，Anti-IL31 hIgG1 Antibody(mAb33) 作为 block 抗体 (150 kDa; 以下简称为 mAb33)。Conc.01 终浓度为 1 μ g/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	0.84 ng/mL Human IL-31 + mAb33	1 μ g/mL	250 ng/mL	62.5 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 pg/mL	15.26 pg/mL	0	PBS
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D												
E												
F												
G												
H												

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。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
mAb33	2.55 mg/mL	0.0255 mg/mL	取 2 μ L 储液 + 198 μ L Assay Buffer
Human IL-31	0.15 mg/mL	0.0015 mg/mL	取 2 μ L 储液 + 198 μ L Assay Buffer

- e) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 67.5 μL Assay Buffer，B3-B11 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 中加入 5.8 μL mAb33），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.3 μL ，加入次孔										对照组
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	5.8 μL mAb33	加入	67.5 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 18.3 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) 配置激活药物 Human IL-31（ $2 \times$ 激活浓度），取 3.3 μL 稀释后的母液，加入到 2930 μL Assay Buffer 中，混匀。然后依次加入到步骤 h 梯度稀释的抗体中，55 μL 每孔，静置 1h。
- j) 1 h 后，将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100 μL 上清。
- k) 依次加入步骤 i 混合药物，每孔加入 100 μL 。
- l) 盖板上盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- m) 使用 GMOne-Step 报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

(3) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_IL31 Reporter 293 Cell Line + Vixarelimab	Human IL-31+No Ab Control	Human IL-31+50 μg/mL Vixarelimab	Human IL-31+7.62 ng/mL Vixarelimab
	55048	7578	52803
H_IL31 Reporter 293 Cell Line + mAb33	Human IL-31+No Ab Control	Human IL-31+1 μg/mL mAb33	Human IL-31+15.26 pg/mL mAb33
	49850	6812	46177
H_IL31 Reporter 293 Cell Line + NA633	Human IL-31+No Ab Control	Human IL-31+50 μg/mL NA633	Human IL-31+7.62 ng/mL NA633
	52353	7189	49659
H_IL31 Reporter 293 Cell Line + Nemolizumab	Human IL-31+No Ab Control	Human IL-31+50 μg/mL Nemolizumab	Human IL-31+7.62 ng/mL Nemolizumab
	46697	7889	49766

(4) 验证结果

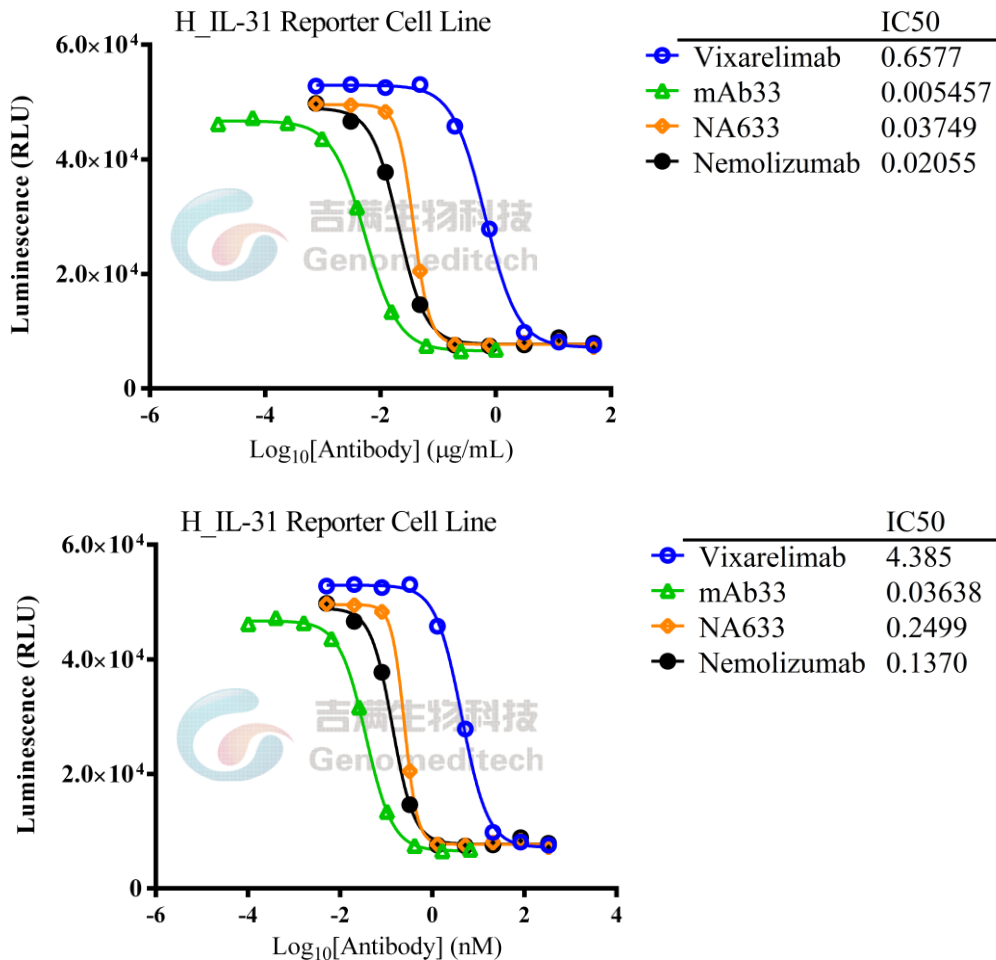


Fig 3. Antibody block 抑制结果

(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 功能细胞系流式结果

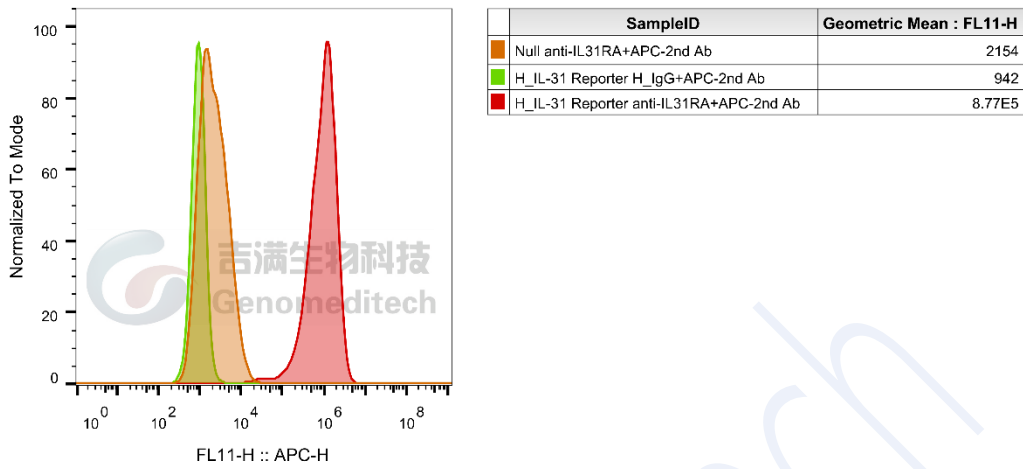


Fig 4.使用 Anti-IL31RA hIgG2 Antibody (Genomeditech /GM-50871AB)验证功能细胞表达结果

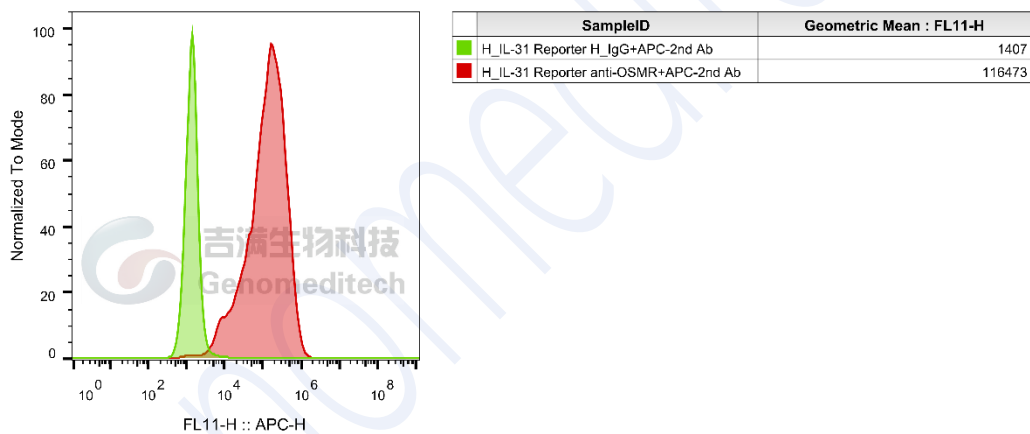


Fig 5.使用 Anti-OSMR hIgG4 Antibody (Genomeditech /GM-50874AB)验证功能细胞表达结果

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