

产品手册

H_TNFSF15(TL1A) Reporter Cell Line

H_TNFSF15(TL1A) 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：V2.9.240521

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.	抑制实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
附录：	流式验证结果.....	10
附录：	稳定性验证结果.....	10
使用许可协议：	11

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-C30289	H_TNFSF15(TL1A) 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-C30289	H_TNFSF15(TL1A) 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

肿瘤坏死因子(TNF)样配体1A(TL1A)是细胞因子的TNF家族的成员，也称为TNFSF15。主要由内皮细胞表达。在T细胞中，TL1A充当共刺激剂，在体外和体内增加IL-2反应性和促炎细胞因子的分泌。TL1A是其受体“死亡受体3”(DR3，也称为TNFRSF25)的唯一已知配体。DR3是含有死亡结构域的肿瘤坏死因子家族受体，与TNFR1同源性较高，在T细胞活化过程中表达上调，并诱导细胞凋亡。DR3和TL1A之间的相互作用可以通过阻断TL1A和DR3的结合来实现。因此，TL1A/DR3可作为治疗慢性免疫疾病药物的重要潜在靶点。

吉满生物H_TNFSF15(TL1A) Reporter Cell Line报告基因细胞系，是一种Luciferase报告基因细胞系。通过加入TL1A的拮抗型抗体，阻断由TL1A激活的DR3下游信号，从而可以通过测定荧光信号确定荧光素酶（Luciferase）的表达。可用于筛选靶向TL1A的拮抗型药物。

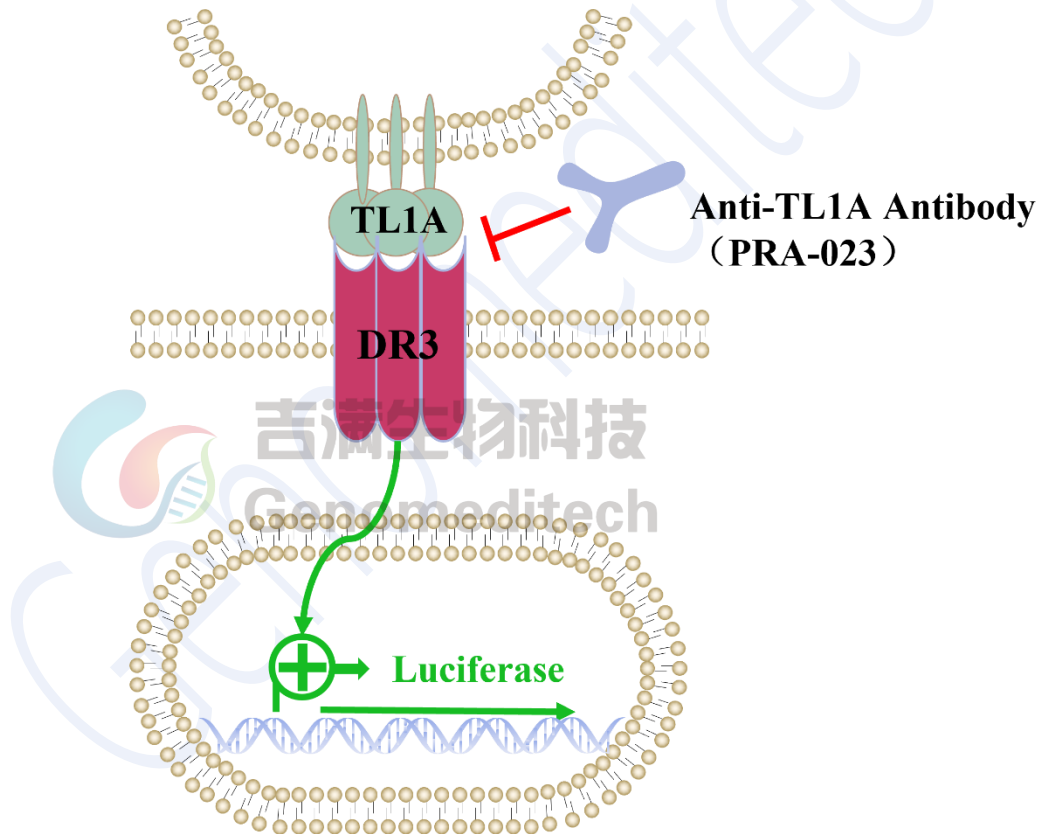


Fig 1. TL1A 原理图

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+ 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 Blasticidin
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
GM-CSF	10 μg	novoprotein/C003
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	gibco/C11875500BT
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated	96-well	Corning/3912
Microplate		
H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL	Genomeditech/GM-C19170
Anti-TNFRSF25(DR3) hIgG1 Antibody(PTX-35)	/	Genomeditech/GM-58913AB
Anti-H_TNFSF15(TL1A) hIgG1 Antibody (Tulisokibart、PRA-023)	/	Genomeditech/GM-58915AB
Anti-H_TNFSF15(TL1A) hIgG1 Antibody(PF-06480605)	/	Genomeditech/GM-59479AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C

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,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 $3-5 \times 10^5$ 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 cm²),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 5×10^6 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,待细胞状态稳定后开始细胞维持和繁殖,再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 此细胞为人红系白血病细胞,悬浮生长,轻微贴壁。
- 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 $1-1.2 \times 10^6$ cells/mL,1 传 2-1 传 5,隔 2-3 天继续传代,不要让其密度超 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。

六、使用方法

1. 抑制实验

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_TNFSF15(TL1A) Reporter Cell Line 和 1×10^4 cells/Well 的 H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 Cell Line (接种密度)进行实验。

使用 Anti-H_TNFSF15(TL1A) hIgG1 Antibody(Tulisokibart、PRA-023)(以下简称为 PRA-023;150 kDa)、Anti-H_TNFSF15(TL1A) hIgG1 Antibody(PF-06480605) (以下简称为 PF-06480605;150 kDa)作为阳性药物, 起始浓度(Conc.01)为 $30 \mu\text{g/mL}$, 3 倍梯度稀释, PRA-023 的 Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照; PF-06480605 的 Conc.01-Conc.09 分别排布在 C2-C10, C11 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	PRA-023	PBS	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	0	PBS
C	PF-06480605	PBS	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	0	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 16–24 h, 消化离心收集 H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 Cell Line 细胞, 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 1×10^5 cells/mL, 以排枪加 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔, 周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS, 盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h, 离心收集 H_TNFSF15(TL1A) Reporter Cell Line, 以 Assay Buffer 重悬细胞, 计算细胞密度及活力, 通过补加 Assay Buffer 的方式, 调整 H_TNFSF15(TL1A) Reporter Cell Line 到 2×10^6 cells/mL。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B10)。

e) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
PRA-023	4.724 mg/mL	/	直接使用储液
PF-06480605	1.904 mg/mL	/	直接使用储液

f) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 81.45 μ L Assay Buffer、C2 孔加入 79.9 μ L Assay Buffer；B3-B11、C3- C11 孔各加入 55 μ L Assay Buffer。

g) 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 1.05 μ L PRA-023、C2 中加入 2.6 μ L PF-06480605），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 27.5 μ L，加入次孔										对照孔			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12	
A															
B	1.05 μ L PRA-023	加入	81.45 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	2.6 μ L PF-06480605	加入	79.9 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															
E															
F															
G															
H															

h) 从第一个梯度稀释孔 B2、C2 中各吸取 27.5 μ L，加入到第二个梯度稀释孔 B3、C2，充分混匀。

i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10、C10）。

j) 取出步骤 a 准备好的 H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 Cell Line 细胞孔板，吸弃上清 100 μ L；然后将步骤 i 准备好的药物各取出 50 μ L，加入到步骤 a 的 H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 Cell Line 细胞孔板中，孵育 1 h。

k) 1 h 后将步骤 b 准备好的 H_TNFSF15(TL1A) Reporter Cell Line 细胞取出，吸取 50 μ L 分别加入步骤 j 孵育好的混合液中，盖上盖板，继续孵育 6 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。

药物	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	4.57 ng/ml
PRA-023	278112	60777	300648
PF-06480605	256410	58993	247295

3) 验证结果

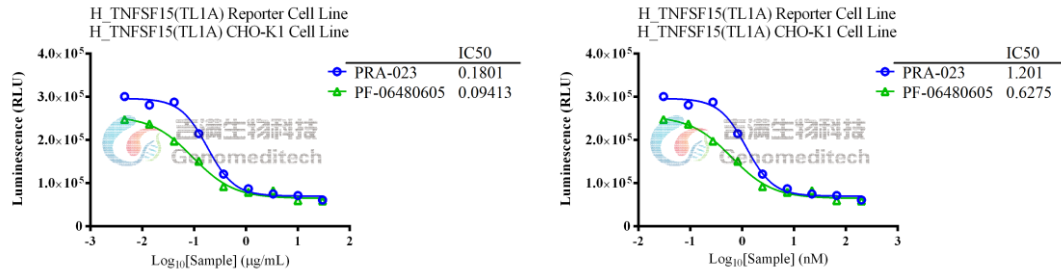


Fig 2. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录：流式验证结果

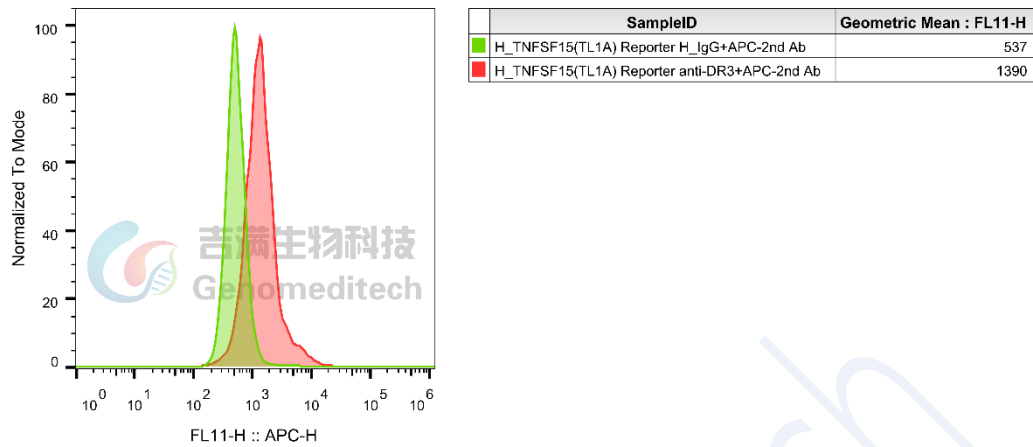


Fig 3. H_TNFSF15(TL1A) Reporter Cell Line 细胞使用 Anti-TNFRSF25(DR3) hIgG1 Antibody(PTX-35) (Genomeditech/GM-58913AB) 流式验证结果

附录：稳定性验证结果

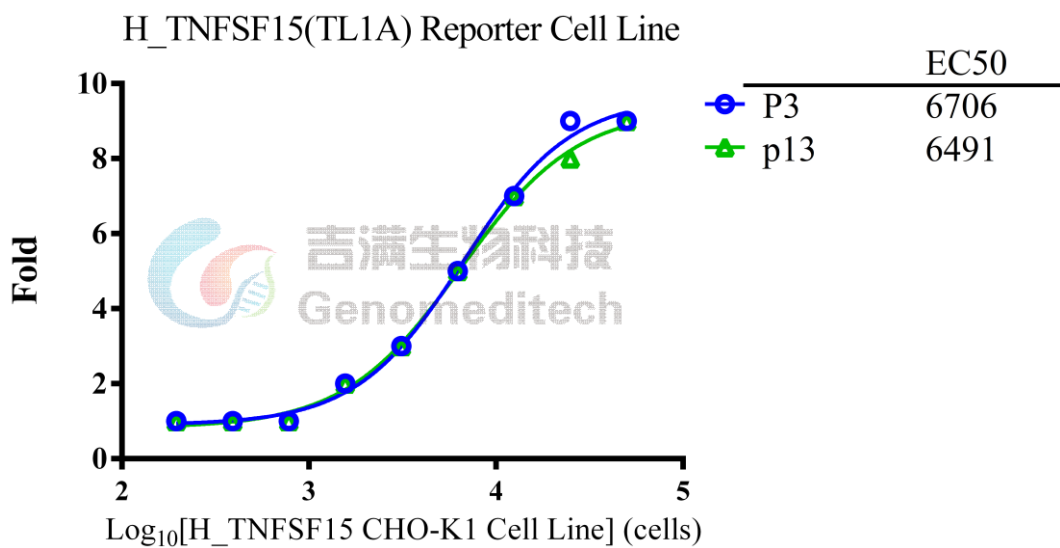


Fig 4. H_TNFSF15(TL1A) Reporter Cell Line (Genomeditech/GM-C30289) 的 P3、P13 细胞分别与 2 倍梯度稀释的 H_TNFSF15(TL1A) CHO-K1 Cell Line (Genomeditech/GM-C19170) 共培养; 孵育 7h; 收样检测。

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