

IL10 Effector Reporter Cell

CBP74158

操作说明书



4008-750-250

目录



1. 背景信息	1
2. 产品介绍	1
3. 细胞基本信息	3
4. 主要仪器试剂耗材	4
5. 细胞培养	4
5.1 细胞复苏	4
5.2 细胞传代	5
5.3 细胞冻存	5
6. 细胞实验流程	5
6.1 IL10 Stimulation Assay	5
6.2 IL10 Inhibition Assay	6
7. 数据展示	7
8. 相关产品	8

1. 背景信息

白细胞介素-10 (IL-10) 也称为人细胞因子合成抑制因子 (CSIF)，是一种抗炎症的细胞因子。作为一种免疫抑制细胞因子，IL-10 可由多种类型细胞产生，包括巨噬细胞、单核细胞、T 细胞、B 细胞和角质形成细胞等。IL-10 在免疫调节和炎症反应中具有多效作用，一方面，IL-10 能够抑制由巨噬细胞和调节性 T 细胞等产生的炎症因子如 IFN- γ 、IL-2、IL-3、TNF α 和 GM-CSF 的合成，同时它也可以抑制抗原呈递细胞的抗原呈递能力；另一方面，它也刺激某些 T 细胞和肥大细胞，并刺激 B 细胞成熟和抗体产生。IL-10 的受体是由两个配体结合亚基 IL-10R1 和两个辅助信号亚基 IL-10R2 组成的四聚体，当 IL-10 与 IL-10R1 结合就会激活由 IL-10R1 和 R2 组成的 IL-10 受体，导致其下游 JAK1 和 TYK2 的磷酸化，进而参与 JAK-STAT 信号通路的调节。IL-10 可能与多种疾病相关，其过度表达可能与系统性红斑狼疮，结核病等密切相关，而缺乏 IL-10 则可能会与炎症性肠病、银屑病、哮喘、类风湿性关节炎的发生有关。而在肿瘤发生过程中，IL-10 的作用则存在一定争议，在某些癌种如非小细胞肺癌、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、宫颈癌和口腔癌中 IL-10 的表达水平与肿瘤发生正相关，而在结肠癌，前列腺癌患者中，其表达则低于对照人群。一方面，由于 IL-10 作为一种免疫抑制细胞因子被广泛接受，所以 IL-10 被认为通过降低肿瘤微环境中的抗肿瘤免疫反应来促进肿瘤免疫逃逸；另一方面，Ouyang W 等人认为 IL-10 至少存在三种主要的抗肿瘤机制：1. 促进 CD8T+ 细胞的增殖和活化，从而增强了抗肿瘤能力；2. IL-10 抑制骨髓细胞的抗原呈递，并抑制 IFN-g 诱导的细胞因子产生，尤其是抑制 IL-12 表达可诱导强烈的抗肿瘤免疫；3. 某些促炎细胞因子，如 IL-6 以及 IL-23 可促进肿瘤在慢性炎症下生长，而 IL-10 对这些细胞因子产生的抑制作用在某些癌症中可能是有益的。

2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 IL10 Effector Reporter Cell 报告基因细胞，在由调控因子调控并表达报告基因的重组细胞上，稳定表达人 IL10R。见图 1 流式验证 IL10RA 表达。见图 2 流式验证 IL10RB 表达。

	Population Name	Mean , FL4-A
	IL10 Effector Reporter cell+anti-IL10RA	1.05E6
	Control cell+anti-IL10RA	8436

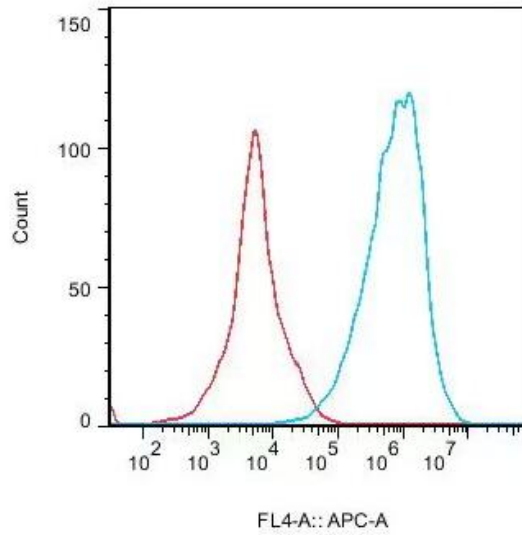




图 1: IL10 Effector Reporter Cell 细胞表达 IL10RA。

	Population Name	Mean , FL4-A
	IL10 Effector Reporter cell+anti-IL10RB	5.72E5
	Control cell+anti-IL10RB	7052

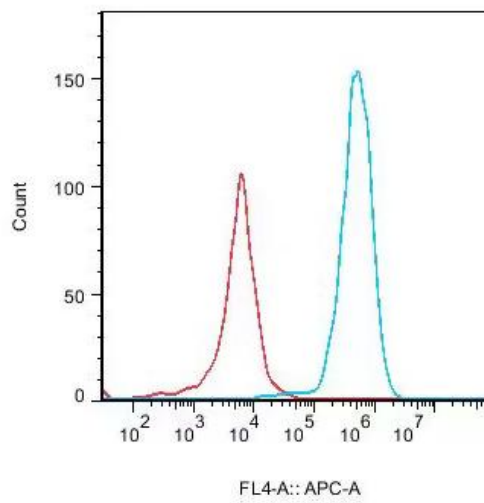


图 2: IL10 Effector Reporter Cell 细胞表达 IL10RB。

报告基因细胞模型可以很好的反映分子作用机制，同时具备更小的变异性和更好的可操作性，已被中检院及药企广泛应用于抗体药物生物活性的检定，对于药物研发、质量控制、批次放行都有重要意义。

IL10 Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 IL10 的信号转导过程，原理见图 3 所示。

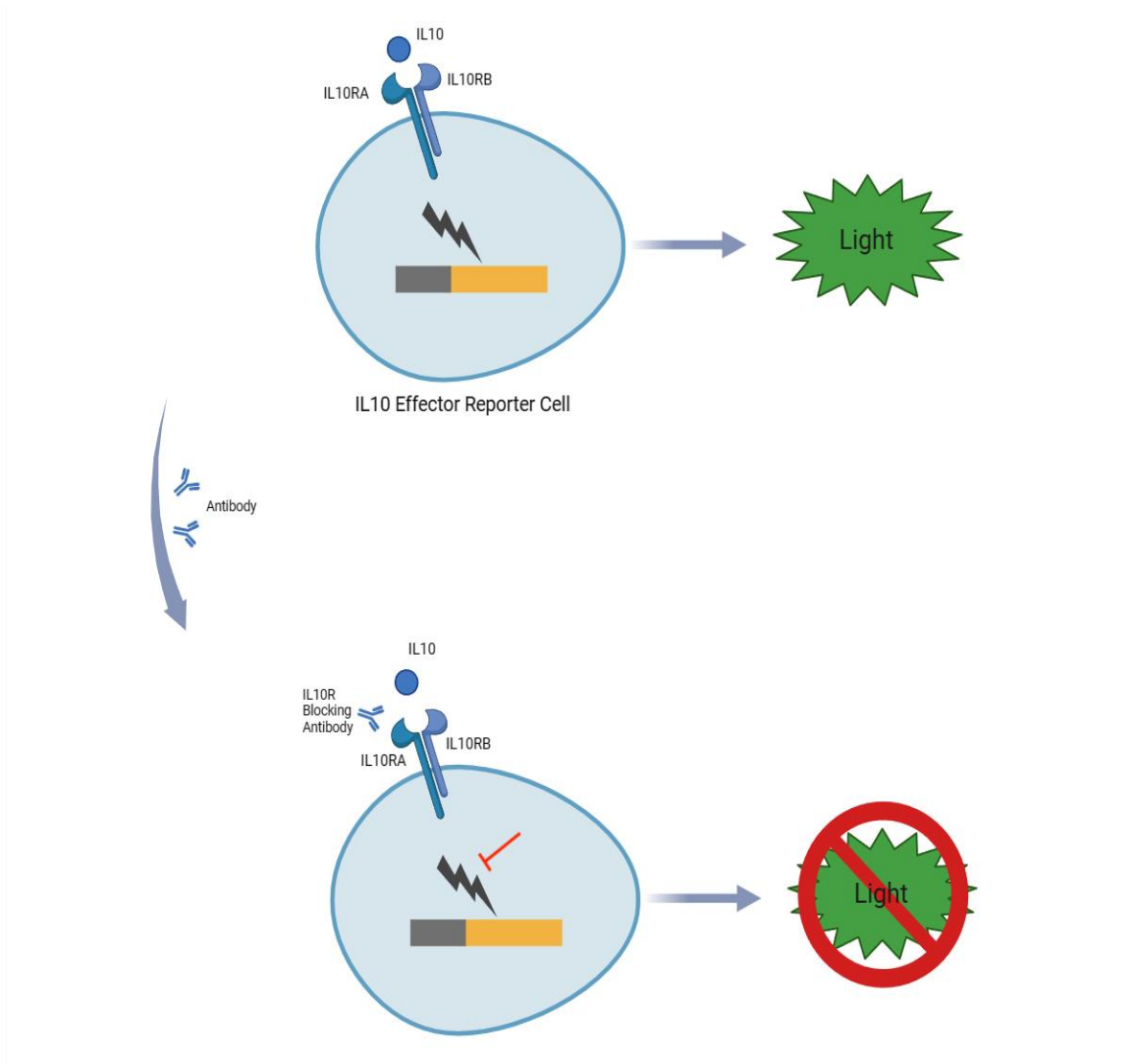


图 3: IL10 Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: IL10R

传代培养基: DMEM+10%FBS+2ug/ml puromycin+5ug/ml blasticidin+200ug/ml hygromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态：贴壁

支原体检测：阴性

稳定性：32 代（室内测试结果，不表示超过 32 代以上不稳定）

保存条件：液氮保存

应用：细胞水平 IL10 信号传导的激活剂的活性检测，可用于高通量筛选或 QC 放行

4. 主要仪器试剂耗材

名称	品牌	货号
IL10 Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74158M
Recombinant Human IL10	/	/
IL-10R Blocking Ab	/	/
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
Ultra Luciferase Detection Kit	Cobioer	CBPH0001
96 Well Assay Plate (White Plate, Clear Bottom with Lid Tissue Culture Treated Polystyrene 1/Pack)	Costar	3610
Synergy H1 多功能酶标仪	Biotek	/

5. 细胞培养

5.1 细胞复苏

- 1) 在 37°C 水浴中快速融化细胞约 60 秒。一旦细胞解冻（可能比 60 秒稍快或稍慢），快速将冻存管中的细胞吸入装有 10 ml 预热 IL10 Effector Reporter Cell 完全培养基的 15 ml 离心管中。
- 2) 1000 转、5 分钟离心细胞，除去培养基并将细胞重悬于 5 ml 预热的完全培养基中。
- 3) 加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中。
- 4) 复苏 24-36 小时左右换液或传代，将未贴壁的死细胞去掉。

5.2 细胞传代

- 1) 当细胞密度符合传代要求时，PBS 清洗细胞，加入 1ml 胰酶，消化细胞传代。当 80%以上细胞培养瓶轻轻晃动能脱落时，加培养基终止消化，吹打成单细胞，吸入 15ml 离心管，1000 转离心 5 分钟。
- 2) 离心后弃上清，加入新培养基吹打重悬细胞成单细胞，加入新的培养瓶中继续培养。

5.3 细胞冻存

每个 T75 或 10cm 培养皿的细胞消化离心后弃上清。加 2ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入 2 个细胞冻存管。立即放入细胞冻存盒(Nalgene 5100-0001)，加异丙醇到刻度线，放-80°C 冰箱。24 小时后将冻存管转到液氮中长期保存。

6. 细胞实验流程

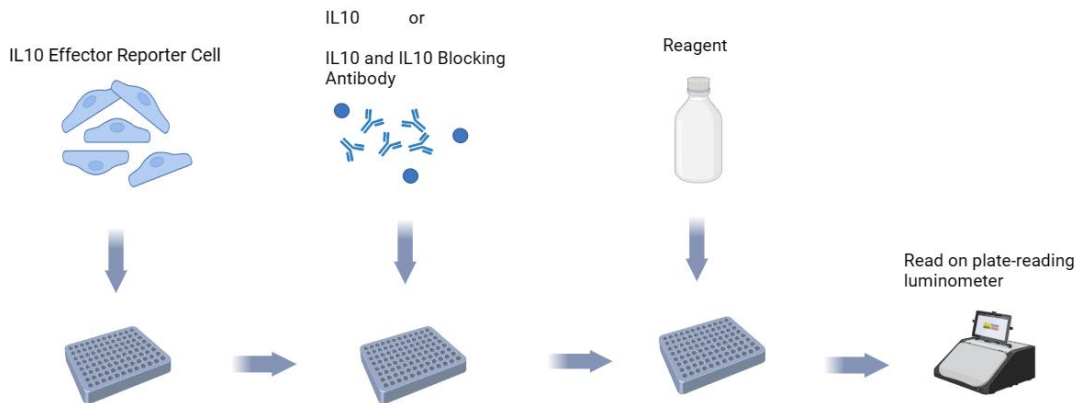


图 4: IL10 Stimulation Assay 流程示意图

6.1 IL10 Stimulation Assay

IL10 Stimulation Assay 由报告细胞 IL10 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74158 开展，本实验中使用 Recombinant Human IL10 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

- 1) 取对数期生长的 IL10 Effector Reporter Cell 细胞消化离心去上清，重悬于新鲜 DMEM+10%FBS 培养基中，细胞密度调整为 5×10^5 Cells/ml。
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中，100ul/孔细胞悬液。

- 3) 第二天,用 DMEM+10%FBS 培养基对样品进行梯度,加入梯度稀释的 10*浓度样品 (11.1 ul/孔) 到接种好细胞的 96 孔板中,样品从最高浓度开始,3 倍稀释 11 个浓度梯度,每个浓度设置双复孔或三复孔,并设置 0 浓度对照,继续在 37°C 细胞培养箱培养 5.5 到 6 小时。(注意:样品浓度及梯度设置跟样品本身的特性及客户的实验需求高度相关,客户应根据自身的实际情况优化设置,我们不做具体推荐,本梯度稀释方案仅适用我们本次验证实验涉及样本)
- 4) 将 96 孔板从培养箱中取出,加入 100ul/孔 Ultra Luciferase Detection Kit, Cat.#CBPH0001 放置 3 到 5 分钟,放入酶标仪中读取数值。
- 5) 根据每个梯度浓度孔对应的读值,利用 Prism Graphpad 软件拟合样品对细胞激活的梯度曲线,并且计算样品的 EC50。

6.2 IL10 Inhibition Assay

IL10 Stimulation Assay 由报告细胞 IL10 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74158 开展,本实验中使用 IL-10R Blocking Ab 作为测试样本,对本模型的生物功能进行验证。

- 1) 取对数期生长的 IL10 Effector Reporter Cell 细胞消化离心去上清,重悬于新鲜 DMEM+10%FBS 培养基中,细胞密度调整为 3.75×10^5 Cells/ml。
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中,80ul/孔细胞悬液。
- 3) 第二天,用 DMEM+10%FBS 培养基对样品进行梯度,加入梯度稀释的 10*浓度样品 (10 ul/孔) 到接种好细胞的 96 孔板中,样品从最高浓度开始,3 倍稀释 10 个浓度梯度,每个浓度设置双复孔或三复孔(可根据实验需求设定样品浓度,稀释倍数,浓度梯度,复孔数等),并设置 0 浓度对照(96 孔板 1 到 10 列为梯度稀释的抗体样品孔,11,12 列为抗体 0 浓度只加相同体积培养基的对照孔)。
- 4) 用 DMEM+10%FBS 培养基配制 10*浓度的配体(配体在板内的终浓度可根据实验需要进行配制,我们通常建议的配体浓度范围为配体的 EC80 到 EC90 之间),加入 6.2 步骤 2) 的 96 孔板中(10 ul/孔,只加 1 到 11 列,12 列加入等体积的培养基做为不加配体刺激的阴性对照孔),然后将 96 孔板放入细胞培养箱继续培养 5.5 至 6 小时。(备注:对于 IL10 的阻断抗体,建议加入抗体后马上加入配体刺激;对于 IL10 受体的阻断抗体,建议加入抗体后,让抗体与细胞孵育 1 小时后,再加入配体刺激)
- 5) 将 96 孔板从培养箱中取出,加入 100ul/孔 Ultra Luciferase Detection Kit, Cat.#CBPH0001

放置 3 到 5 分钟，放入酶标仪中读取数值。

- 6) 根据每个梯度浓度孔对应的读值，计算对应每个孔样品的抑制率，然后根据计算的抑制率及对应的样品浓度，利用 Prism Graphpad 软件拟合样品对细胞抑制的梯度曲线及 IC50 值。

孔板排布：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
B	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
C	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
D	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
E	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
F	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
G	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
H	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照

图 5： 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

Dose Response of Recombinant IL-10 in IL-10 Effector Reporter Cells (C1)

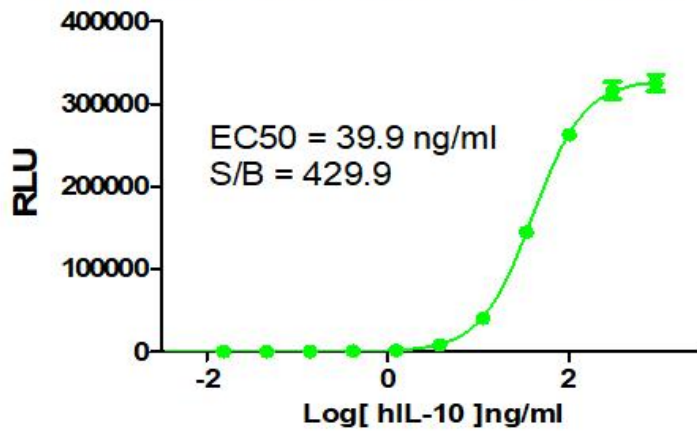


图 6： IL10 Stimulation Assay 验证结果

Inhibition of hIL-10 Induced Reporter Activity By IL-10R Blocking Ab in IL10 Effector Reporter Cells (Clone1)

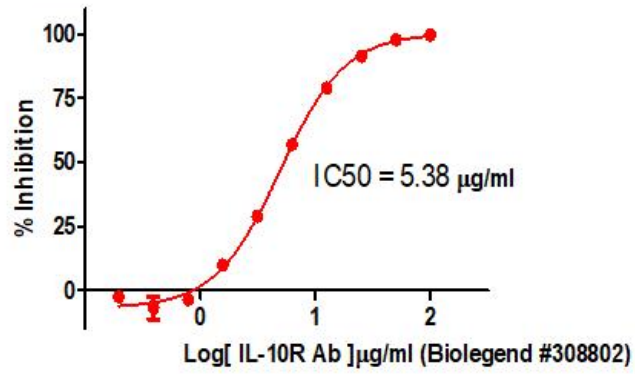


图 7: IL10 Inhibition Assay 验证结果

8. 相关产品

N/A