

# IL12 Effector Reporter Cell

## CBP74134

### 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 .....                  | 2 |
| 4. 主要仪器试剂耗材 .....                | 3 |
| 5. 细胞培养 .....                    | 3 |
| 5.1 细胞复苏 .....                   | 3 |
| 5.2 细胞传代 .....                   | 3 |
| 5.3 细胞冻存 .....                   | 3 |
| 6. 细胞实验流程 .....                  | 4 |
| 6.1 IL12 Stimulation Assay ..... | 4 |
| 6.2 IL12 Inhibition Assay .....  | 5 |
| 7. 数据展示 .....                    | 6 |
| 8. 相关产品 .....                    | 7 |

## 1. 背景信息

白细胞介素-12 (IL-12)是由两个独立基因 IL-12A (p35)和 IL-12B (p40)编码的一种多效能细胞因子，它们以一种活性异源二聚体(p70)或 p40 的同型二聚体(p80)形式存在，主要由抗原刺激的树突状细胞、巨噬细胞和中性粒细胞产生，其受体由 IL12RB1 和 IL12RB2 组成。

IL-12 是先天抵抗和适应性免疫的重要调节因子。IL-12 参与了 naive T 细胞向 Th1 细胞的分化，被认为是 T 细胞刺激因子，可诱导 T 细胞增殖。同时可以增强对细胞毒性淋巴细胞和自然杀伤细胞(NK)的激活以及增加干扰素(IFN)- $\gamma$  的产生。由于其促炎和免疫调节的能力，它可以使肿瘤由“冷”变成“热”。IL-12 是一种前景广阔的抗肿瘤药物。然而，未经修饰的 IL-12 可能无法特异的在肿瘤微环境中累积，使其药效受到限制，并可能导致免疫相关副作用。因此，对 IL-12 进行修饰或与其他靶点药物联合使用，也许可以提高其有效性并克服安全性问题。除此之外，阻断 IL-12 信号通路也是银屑病、肠炎等自身免疫疾病的一个潜在治疗方向。

## 2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 IL12 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 IL12R。

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。

IL12 Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 IL12 的信号转导过程，原理见图 1 所示。

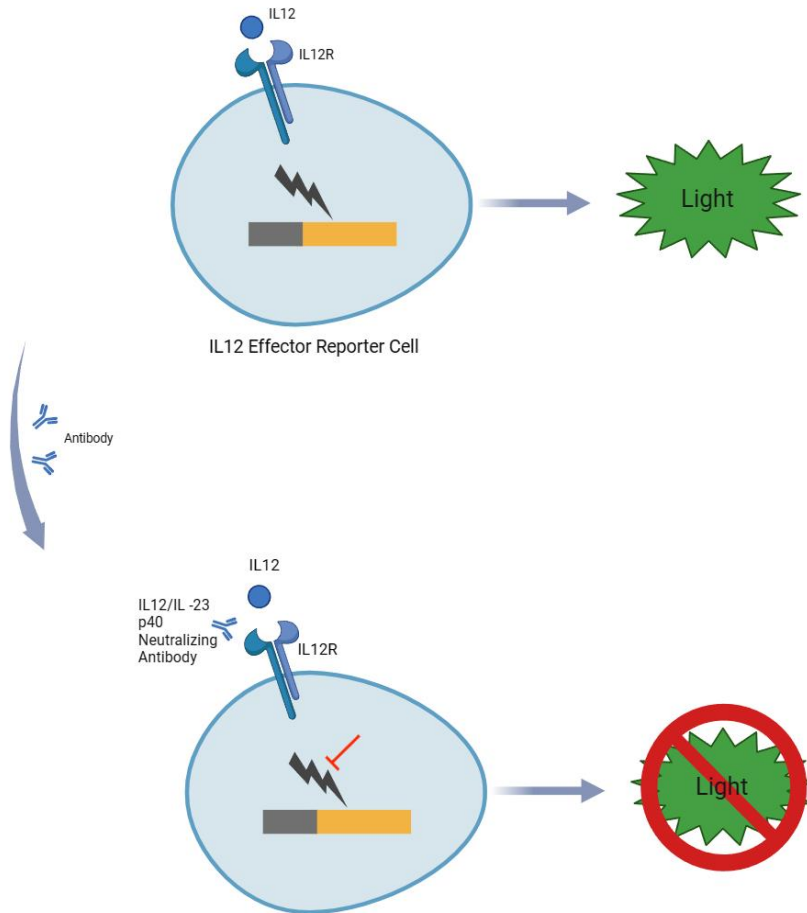


图 1: IL12 Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

### 3. 细胞基本信息

表达基因: IL12R

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

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 IL12 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        |
|--|---------|-----------|
| IL12 Effector Reporter Cell 完全培养基  | Cobioer | CBP74134M |
| Recombinant Human IL12   | /       | /         |
| IL12/IL -23 p40 Neutralizing Antibody  | /       | /         |
| 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 IL12 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% CO<sub>2</sub> 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

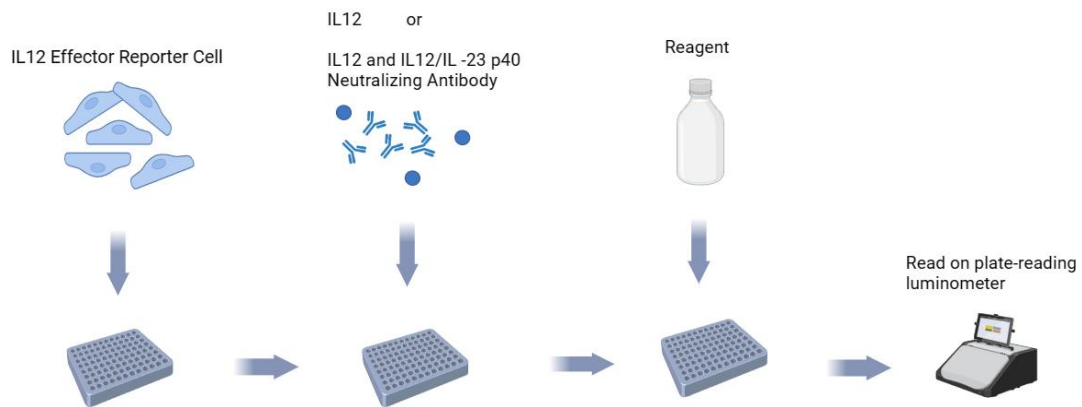


图 2: IL12 Bioassay 流程示意图

### 6.1 IL12 Stimulation Assay

IL12 Stimulation Assay 由报告细胞 IL12 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74134 开展, 本实验中使用 Recombinant Human IL12 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 IL12 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  $3 \times 10^5$  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 IL12 Inhibition Assay

IL12 Stimulation Assay 由报告细胞 IL12 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74134 开展, 本实验中使用 Recombinant Human IL12 和 IL12/IL -23 p40 Neutralizing Antibody 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 IL12 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  $3.75 \times 10^5$  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 IL12 的阻断抗体, 建议加入抗体后马上加入配体刺激; 对于 IL12 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 3:96 孔板排布建议案例展示

## 7. 数据展示

**Dose Response of Recombinant Human IL12 in Human IL12 Effector Reporter Cells (C2)**

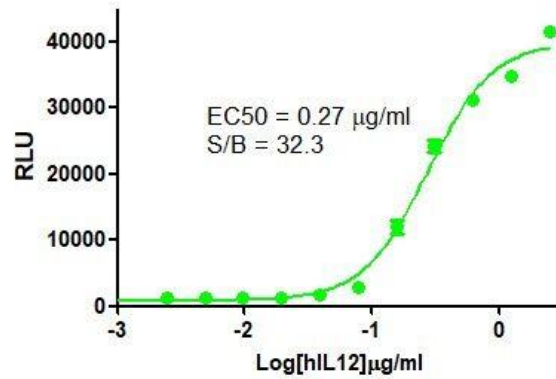


图 4: IL12 Stimulation Assay 验证结果



Inhibition of IL12-induced Reporter Activity by IL-12/IL-23 p40 Neutralizing Antibody in IL12 Effector Reporter Cells (Clone2)

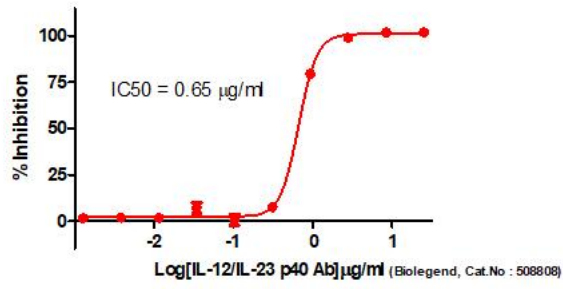


图 5: IL12 Inhibition Assay 验证结果

## 8. 相关产品

N/A