

IL22 Effector Reporter Cell

CBP74175

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	4
5.3 细胞冻存	4
6. 细胞实验流程	5
6.1 IL22 Stimulation Assay	5
6.2 IL22 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 22 (IL-22)是 IL-10 细胞因子超家族一员，与大多数白介素不同，不直接调节免疫细胞功能，而是作用于组织屏障上的细胞，诱导他们产生抗菌蛋白和特定的趋化因子，是抗感染免疫的重要蛋白。它与这个家族的其他成员，IL-10、IL-19、IL-20、IL-24 和 IL-26 在细胞信号传导中共同使用 IL-10R2，但功能各不相同。IL-22 蛋白由 146 个氨基酸组成，是调节组织反应的关键细胞因子，在许多慢性炎症性疾病患者中上调，包括银屑病、类风湿性关节炎和炎症性肠病(IBD)等，成为治疗这些疾病的潜在靶点。IL-22 的受体为异源二聚体，由 IL-22R1 和 IL-10R2 构成，IL-22R1 同时也是另一种 IL-10 家族细胞因子 (IL-24) 的受体亚基。IL-22 除了细胞膜上常规表达的受体外，还有一个单链分泌性受体 IL-22BP，与 IL-22 配体具有极高的亲和力，可通过结合细胞外的 IL-22 阻断其信号。IL-22 分两步与其受体复合物结合，先在细胞膜表面，IL-22 与 IL-22RA1 结合，引起 IL-22 蛋白构象改变，使之与 IL-10RB2 结合，IL-10RB 结合可使 IL-22 与 IL-22RA1 的结合更加稳定。IL-22/IL-22RA1/IL-10RB 复合物的形成可使下游 JAK1 和 TYK2 磷酸化，激活的 JAK1 使 STAT3 磷酸化，STAT3 转运至细胞核中，与反应元件结合，调节其靶基因的表达，同时也可激活 STAT1 和 STAT5，还可激活 MAPK 和 Akt-mTOR 信号通路。IL-22 介导的信号通路能够增强细胞抗感染、抗炎、加强有丝分裂、增殖和抗凋亡基因的表达，促进局部组织再生和宿主防御，加快各种组织和器官的增殖、重塑和修复，以维持控制病原体入侵的固有宿主防御机制。

2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 IL22 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 IL22R 和 IL10RB。见图 1 流式验证 IL22R 表达。见图 2 流式验证 IL10RB 表达。

	Population Name	Mean , FL4-A
	IL22 Effector Reporter Cell+anti-IL22R	1.10E5
	Control cell+anti-IL22R	2484

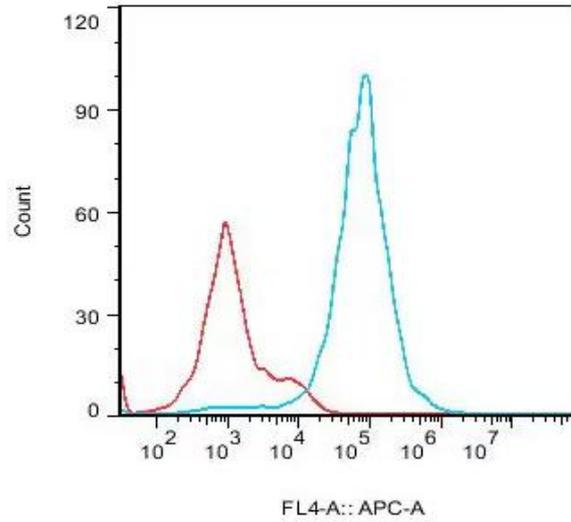


图 1: IL22 Effector Reporter Cell 细胞表达人 IL22R。

	Population Name	Mean , FL4-A
	IL22 Effector Reporter Cell+anti-IL10RB	4.62E5
	Control cell+anti-IL10RB	1.68E4

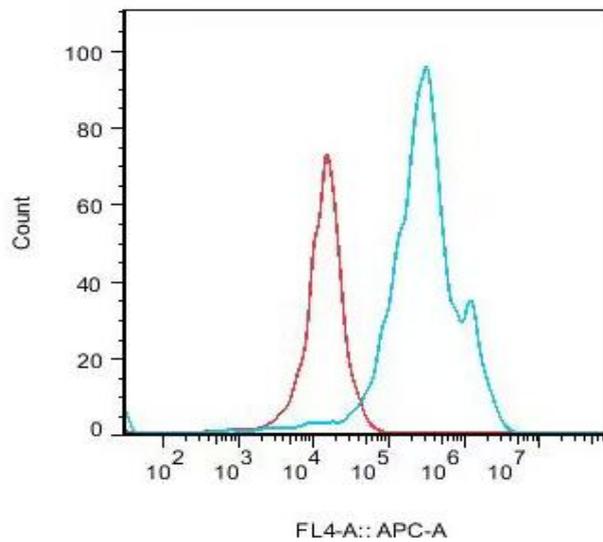


图 2: IL22 Effector Reporter Cell 细胞表达人 IL10RB。

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。

IL22 Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 IL22 的信号转导过程，原理见图 3 所示。

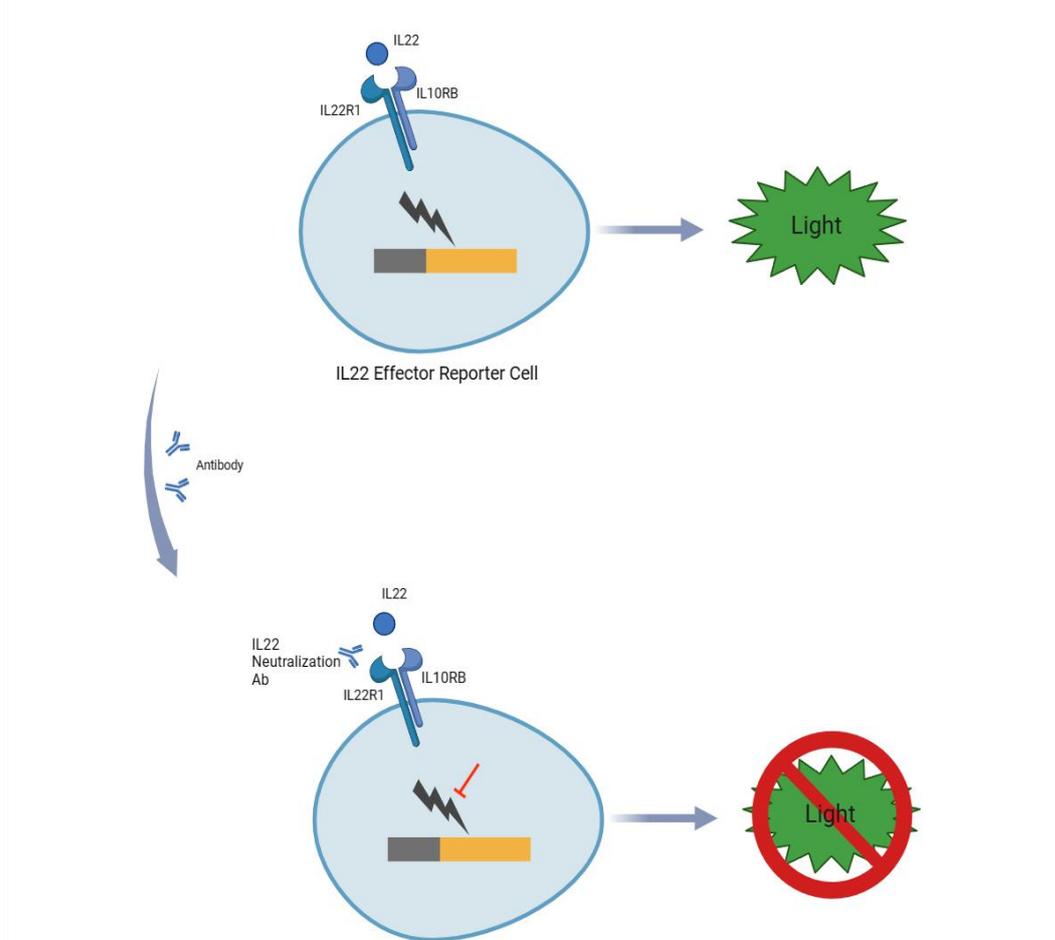


图 3: IL22 Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: IL22R IL10RB

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 IL22 信号传导的激活剂、中和抗体的活性检测, 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
IL22 Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74175M
Recombinant Human IL22	/	/
IL-22 Neutralization 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 IL22 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

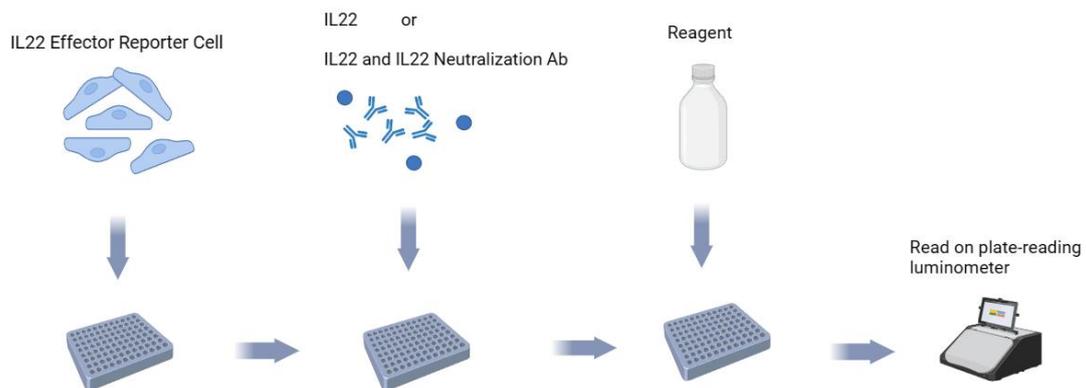


图 4: IL22 Bioassay 流程示意图

6.1 IL22 Stimulation Assay

IL22 Stimulation Assay 由报告细胞 IL22 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74175 开展，本实验中使用 Recombinant Human IL22 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 IL22 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 3×10^5 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 细胞培养箱培养培养过

夜（16 至 24 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 IL22 Inhibition Assay

IL22 Stimulation Assay 由报告细胞 IL22 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74175 开展，本实验中使用 Recombinant Human IL22 和 IL-22 Neutralization 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 IL22 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过夜（16 至 24 小时）。（备注：对于 IL22 的阻断抗体，建议加入抗体后马上加入配体刺激；对于 IL22 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 Human IL-22 in Human IL22 Effector Reporter Cells (C8)

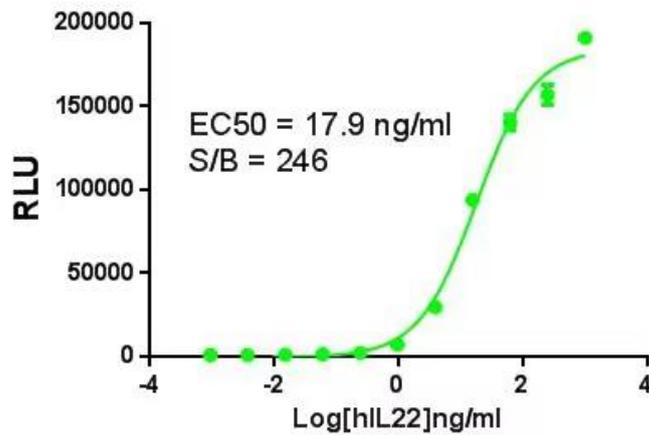


图 6： IL22 Stimulation Assay 验证结果

Inhibition of hIL-22-induced Reporter Activity by IL-22 Neutralization Ab in IL22 Effector Reporter Cells (C8)

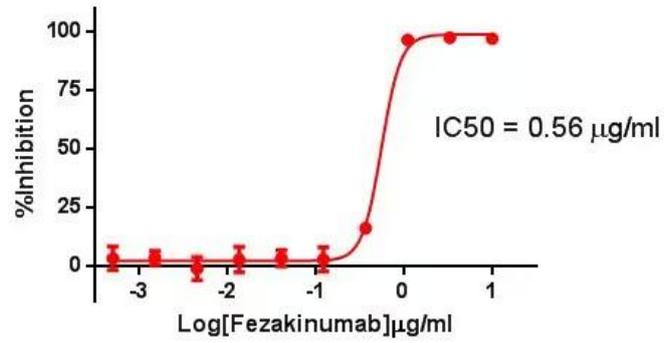


图 7: IL22 Inhibition Assay 验证结果

8. 相关产品

N/A