

# IL23 Effector Reporter Cell

## CBP74130

## 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 IL23 Stimulation Assay .....	5
6.2 IL23 Inhibition Assay .....	5
7. 数据展示 .....	7
8. 相关产品 .....	8

## 1. 背景信息



白介素-23 (IL-23) 于 2000 年首次被报道，当时发现了一个新的序列 (p19)，该序列与 IL-12 的 p40 亚单位结合，可产生一种新的具有活性的细胞因子复合物。它由激活的树突状细胞分泌产生，与 IL-12 相比其生物学特性既有共性也有区别。

IL-23 是 IL-12 细胞因子家族中的一员，该家族还包括 IL-12、IL-27、IL-35 和 IL-39 等成员，它们是一组独特的异二聚体细胞因子，通常是由一个 $\alpha$ 链亚基 (p19、p28 或 p35) 和一个 $\beta$ 链亚基组成 (p40 或 Epstein-Barr 病毒诱导的基因 3)，并通过 JAK/STAT 途径转导信号。IL-23 通过其 p19 亚基与由 IL-23R 以及 p40 亚基构成的异二聚体受体复合物结合并传递信号，与此类似的是，IL-12 则通过其 p35 和 p40 亚基分别与 IL12 受体的 IL-12R $\beta$ 2 和 IL-12 $\beta$ 1 亚基结合来转导信号。

IL-23 受体主要表达在自然杀伤细胞、巨噬细胞、记忆性 T 细胞 (Th17) 和角质形成细胞上，而作为对微生物病原体或伤口愈合信号的一种应答反应，IL-23 的产生是由活化的树突状细胞和巨噬细胞分泌形成并伴随中性粒细胞募集。

## 2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 IL23 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 IL23R。见图 1 流式验证 IL23R 表达。见图 2 流式验证 IL12R $\beta$ 1 表达。

	Population Name	Mean , FL4-A
	IL23 Effector Reporter Cell+anti-IL23R	2152
	Control Cell+anti-IL23R	439

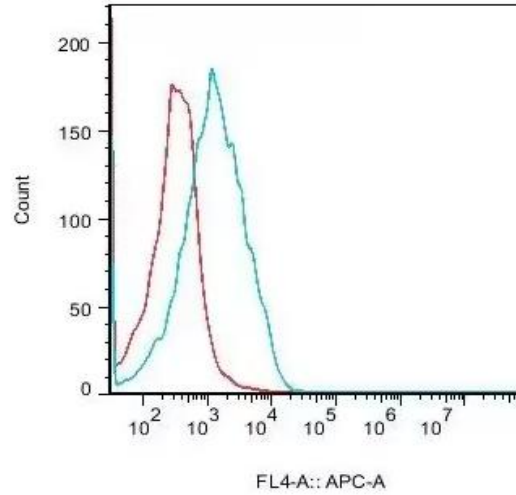




图 1: IL23 Effector Reporter Cell 细胞表达人 IL23R

	Population Name	Mean , FL4-A
	IL23 Effector Reporter Cell+anti-IL12β1	5.34E4
	Control Cell+anti-IL12β1	583

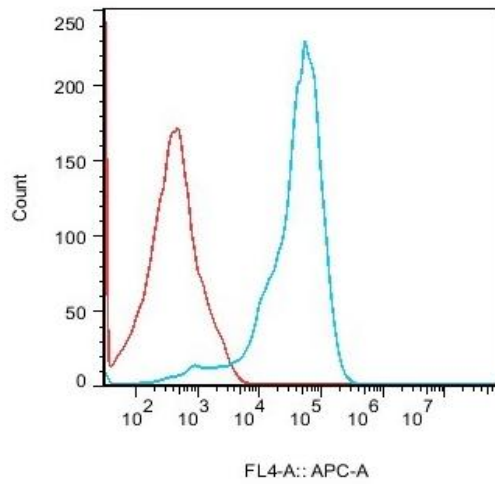


图 2: IL23 Effector Reporter Cell 细胞表达人 IL12Rβ1

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。

IL23 Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 IL23 的信号转导过程，原理见图 2 所示。

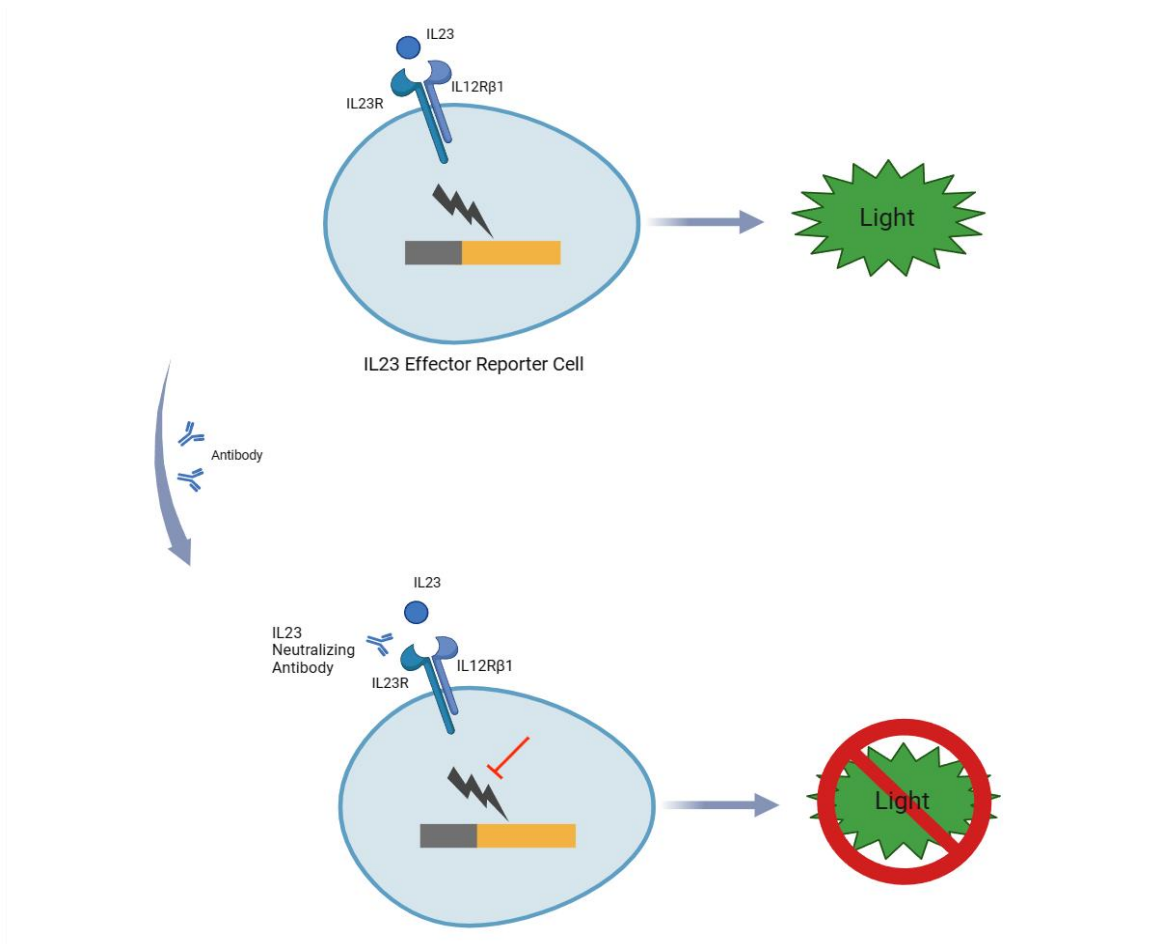


图 3: IL23 Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

### 3. 细胞基本信息

表达基因: IL23R

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 IL23 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
IL23 Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74130M
Recombinant Human IL23	/	/
IL23 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 IL23 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

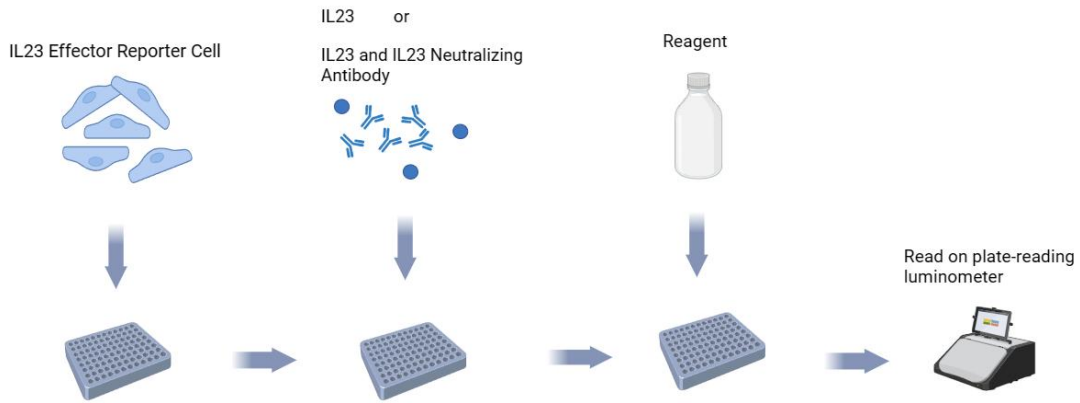


图 4: IL23 Bioassay 流程示意图

### 6.1 IL23 Stimulation Assay

IL23 Stimulation Assay 由报告细胞 IL23 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74130 开展, 本实验中使用 Recombinant Human IL23 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 IL23 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 IL23 Inhibition Assay

IL23 Stimulation Assay 由报告细胞 IL23 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74130 开展，本实验中使用 Recombinant Human IL23 和 IL23 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 IL23 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 IL23 的阻断抗体，建议加入抗体后马上加入配体刺激；对于 IL23 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 IL23 in Human IL23 Effector Reporter Cells (C6)**

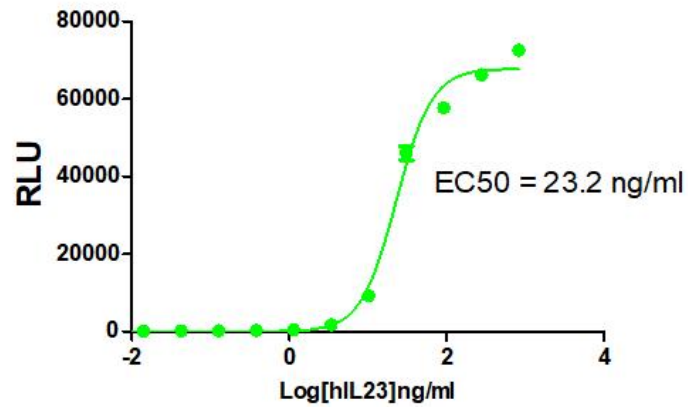


图 6: IL23 Stimulation Assay 验证结果

Inhibition of IL23-induced Reporter Activity by IL23 Neutralizing Antibody in IL23 Effector Reporter Cells (Clone6)

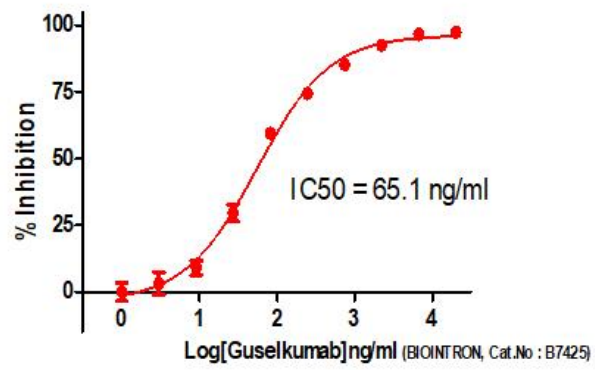


图 7: IL23 Inhibition Assay 验证结果

## 8. 相关产品

N/A