

# IL31 Effector Reporter Cell

## CBP74159

### 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 IL31 Stimulation Assay .....	5
6.2 IL31 Inhibition Assay .....	6
7. 数据展示 .....	7
8. 相关产品 .....	8

## 1. 背景信息

T 细胞来源的细胞因子白细胞介素-31 (IL-31) 于 2004 年首次被发现。动物模型研究表明, IL-31 在瘙痒、皮肤炎症和气道超敏反应中观察到的皮肤和上皮体征和症状中起作用。IL-31 的过表达已被证明与促进感觉神经元生长和刺激 有关, 从而增加对可导致持续瘙痒的最小瘙痒刺激的敏感性。IL-31 在皮肤中的表达也与丝聚蛋白的严重抑制有关, 丝聚蛋白对角质形成细胞的分化和皮肤屏障的维持至关重要。IL-31 的受体是由 IL-31 受体 A (IL-31RA) 和 oncostatin M 受体 (OSMR) 组成的异二聚体复合物;IL-31 与其受体的结合激活细胞信号通路, 包括 Jak / STAT, PI3K / AKT 和 MAPK。在角质形成细胞中, IL-31 已被证明可以诱导细胞周期停滞, 从而减少增殖, 进而导致非典型皮肤发育、缺陷和屏障功能障碍。在其他器官和生理系统中, IL-31 与造血和免疫反应的调节有关。

## 2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 IL31 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 IL31R 和 OSMR。见图 1 流式验证 OSMR 表达。见图 2 流式验证 IL31R 表达。

	Population Name	Mean , FL4-A
	IL31 Effector Reporter Cell+anti-OSMR-APC	1.37E4
	Control Cell+anti-OSMR-APC	1682

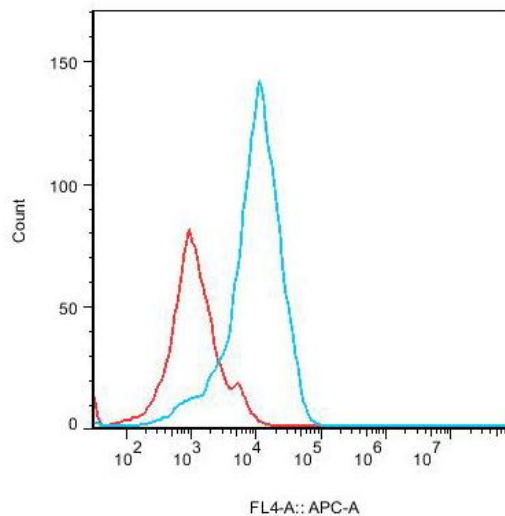




图 1: IL31 Effector Reporter Cell 细胞表达人 OSMR。

	Population Name	Mean , FL2-A
	IL31R Effector Reporter Cell+anti-IL31R-PE	5.30E4
	Control Cell+anti-IL31R-PE	1416

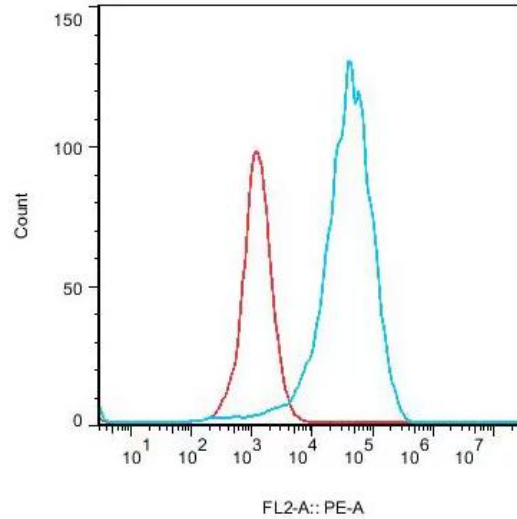


图 2: IL31 Effector Reporter Cell 细胞表达人 IL31R。

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。

IL31 Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 IL31 的信号转导过程，原理见图 3 所示。

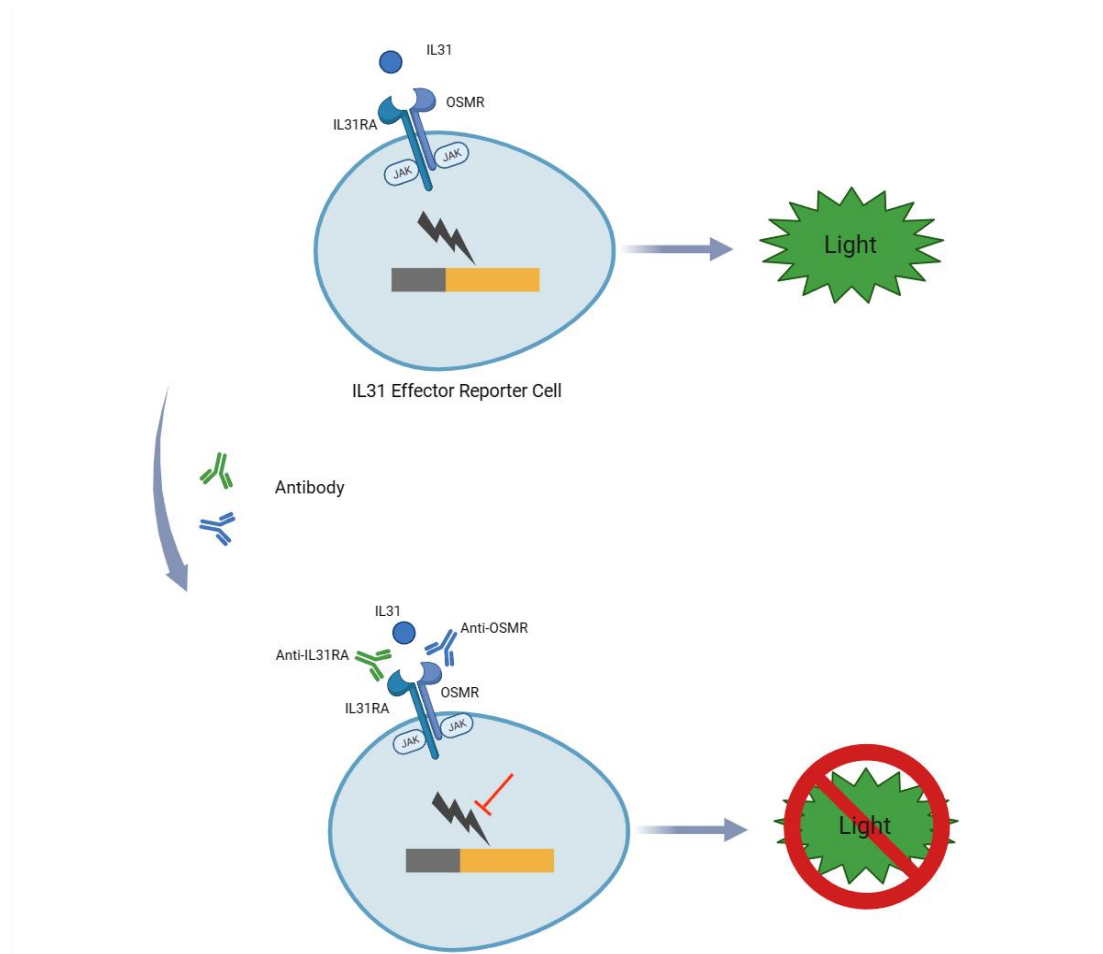


图 3: IL31 Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

### 3. 细胞基本信息

表达基因: IL31RA、OSMR

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 IL31 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
IL31 Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74159M
Recombinant Human IL31	/	/
IL-31Ra Ab	/	/
OSMR 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 IL31 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

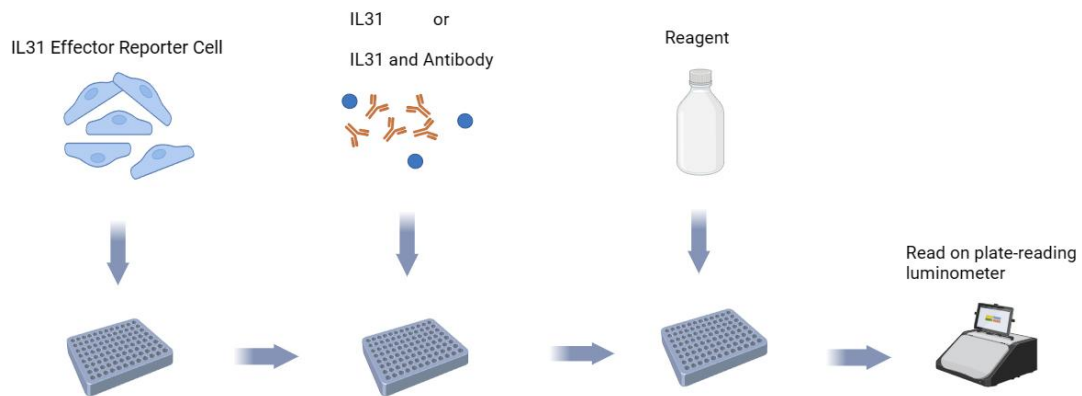


图 4: IL31 Bioassay 流程示意图

### 6.1 IL31 Stimulation Assay

IL31 Stimulation Assay 由报告细胞 IL31 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74159 开展, 本实验中使用 Recombinant Human IL31 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 IL31 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 IL31 Inhibition Assay

IL31 Stimulation Assay 由报告细胞 IL31 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74159 开展，本实验中使用 Recombinant Human IL31 和 IL-31Ra Ab 、 Recombinant Human IL31 和 OSMR 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 IL31 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 IL31 的阻断抗体，建议加入抗体后马上加入配体刺激；对于 IL31 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 IL31 in Human IL31 Effector Reporter Cell**

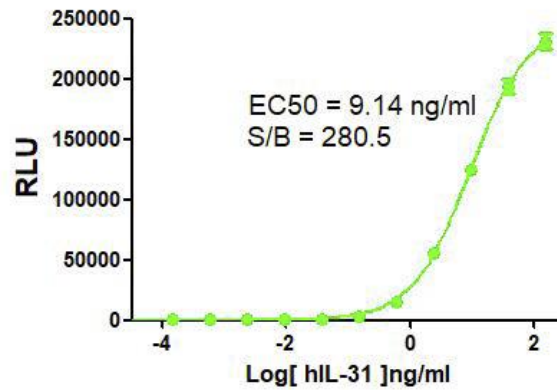


图 6: IL31 Stimulation Assay 验证结果

Inhibition of hIL-31 Induced Reporter Activity By Blocking Abs in IL31 Effector Reporter Cells (Clone11)

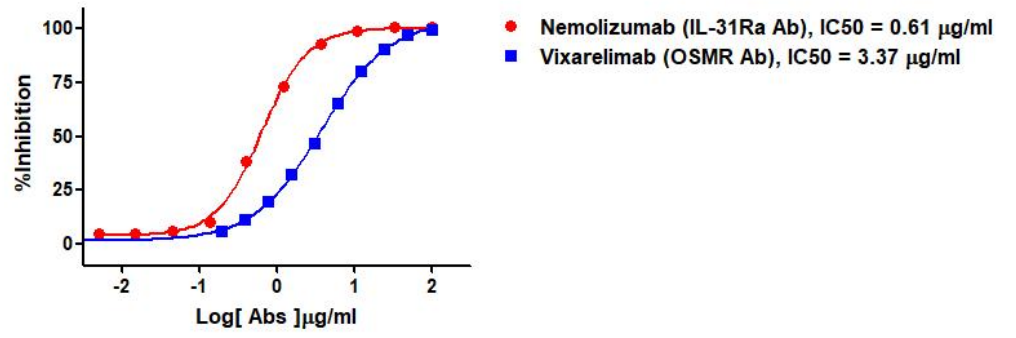


图 7: IL31 Inhibition Assay 验证结果

## 8. 相关产品

N/A