

IL36 Effector Reporter Cell

CBP74119

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	2
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	3
6.1 IL36 Stimulation Assay	3
6.2 IL36 Inhibition Assay	5
7. 数据展示	6
8. 相关产品	6

1. 背景信息

IL-36 和 IL36R 通路在人体的炎症反应中扮演着非常重要的角色，是炎症性疾病的重要因素，属于 IL-1 家族成员。IL-36 亚家族由 3 种相似的激动性配体 IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 和 IL-36 拮抗性配体(IL-36 receptor antagonist, IL-36Ra)组成。IL-36 通过 IL-36 受体(IL-36 receptor, IL-36R) 和 IL-1 受体辅助蛋白(IL-1RAcP)介导细胞内信号转导。研究表明，编码 IL-36Ra 的基因突变失活会导致 IL-36R 信号失调，主要表现为弥漫型脓疱银屑病，表明 IL-36 在银屑病的皮肤炎症中有重要作用。进一步研究表明 IL-36 在其他器官的炎症性疾病中也有重要作用，IL-36 和 IL36R 药物的开发成为炎症性疾病治疗重要方向。IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 在体内通过与 IL-36R 结合，激活 MAPK/NF- κ B 通路发挥促炎症作用，参与树突状细胞与 T 细胞的激活、成熟、极化、抗原提呈和刺激促炎因子产生等功能。而 IL-36Ra 是 IL-36R 受体拮抗剂，也可与 IL-36R 结合，可抑制和调节 IL-36R 活性。在体内如 IL-36Ra 发生突变而失活，导致 IL-36 信号无法被抑制，IL36R 持续异常激活，诱导趋化因子和细胞因子的表达，会促进各种炎症细胞如巨噬细胞、嗜中性粒细胞以及 Th17 细胞的浸润和活化，以及 IL-17、TNF 和 IL22 的等细胞因子的释放，能进一步的上调皮肤细胞和树突状细胞表达 IL36，进一步的放大炎症反应。最终皮肤表面招募大量中性粒细胞以及其他免疫细胞，形成成片的脓疱，导致脓疱型银屑病 (General pustular psoriasis, GPP)。

2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 IL36 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 IL36。

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。

IL36 Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 IL36 的信号转导过程，原理见图 1 所示。

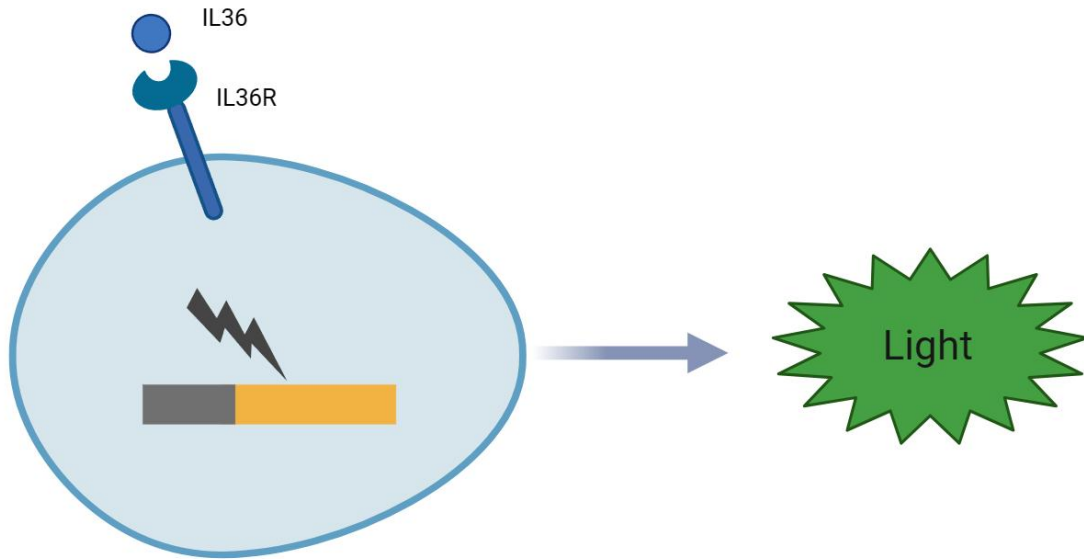


图 1: IL36 Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: IL36R

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+800ug/ml hygromycin+1ug/ml puromycin+10ug/ml blasticidin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 悬浮

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 IL36 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
IL36 Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74119M
Recombinant IL36	/	/
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 IL36 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) 调整细胞密度到 $3-6 \times 10^5$ cells/ml，加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中。

5.2 细胞传代

每 1-2 天取细胞悬液计数，当密度大于 1×10^6 cells/ml 时，请及时传代或补加新鲜完全培养基。保持细胞密度在 1×10^5 - 1×10^6 cells/ml 之间。

5.3 细胞冻存

取 $4-8 \times 10^6$ 细胞离心后弃上清。加 1ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入细胞冻存管。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

6.1 IL36 Stimulation Assay

IL36 Stimulation Assay 由报告细胞 IL36 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74119 开展，本实验中使用 Recombinant IL36 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

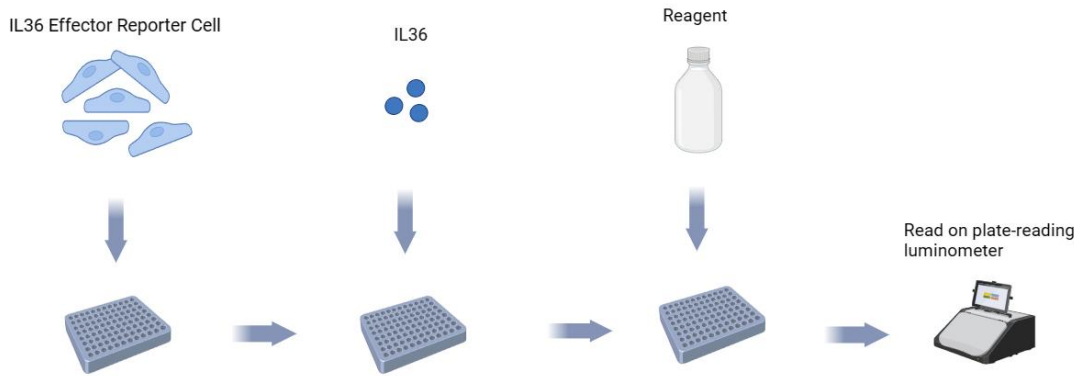


图 2:IL36 Stimulation Assay 流程示意图

- 1) 取对数期生长的 IL36 Effector Reporter Cell 细胞离心去上清，重悬于新鲜 RPMI1640+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) 然后，用 RPMI1640+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 IL36 Inhibition Assay

- 1) 取对数期生长的 IL36 Effector Reporter Cell 细胞离心去上清，重悬于新鲜 RPMI+10%FBS 培养基中，细胞密度调整为 6.25×10^5 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) 然后，用 RPMI+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 RPMI+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 IL36 的阻断抗体，建议加入样品后马上加入配体刺激；对于 IL36 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

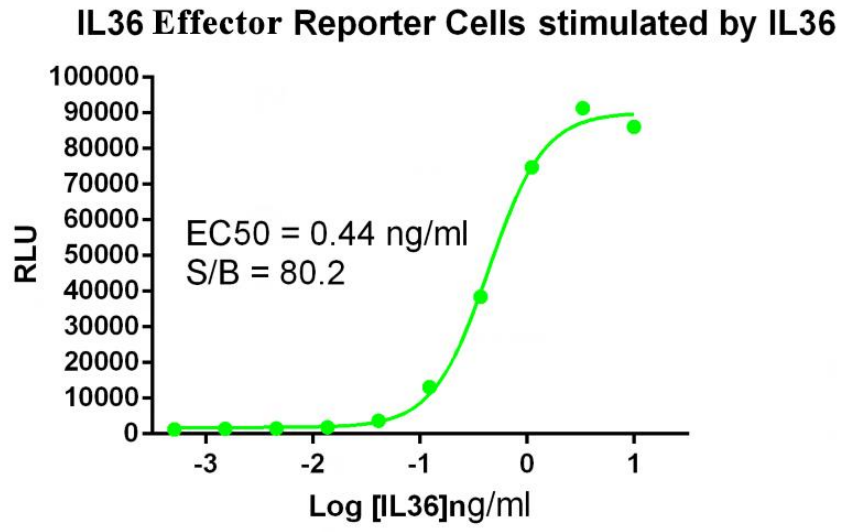


图 4: IL36 Stimulation Assay 验证结果

8. 相关产品

N/A