

hIL21 Effector Reporter Cell

CBP74183

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	4
5.3 细胞冻存	4
6. 细胞实验流程	4
6.1 hIL21 Stimulation Assay	4
6.2 hIL21 Inhibition Assay	5
7. 数据展示	6
8. 相关产品	6

1. 背景信息

白介素 21 (Interleukin-21, IL-21) 是一种重要的免疫调节剂，主要由活化的 CD4+ T 细胞、NK 细胞、滤泡辅助性 T 细胞(follicular helper T cell, TFH)、Th17 细胞分泌，通过影响多种免疫细胞来调节免疫应答。IL-21 在免疫系统中的生物学作用非常复杂和多样，已被证明具有促进和抑制免疫反应的双向能力。已有研究表明 IL-21 是开发肿瘤免疫疗法和自身免疫疾病的潜在靶点，值得高度关注。IL-21 受体 (IL-21R) 是一个由 IL21R α 蛋白和 γ 链组成的同源二聚体，在淋巴细胞和造血细胞表面广泛表达，也表达在其他多种免疫细胞，它与 IL-21 结合会激活下游信号通路，产生各种免疫调节作用。IL-21 与 IL21R 受体复合物结合后，会激活多个下游信号分子，包括 JAK1、JAK3、STAT1、STAT3、STAT5、MAPK、PI3K 信号通路，其中对 STAT 信号通路的激活最为重要。主要通过活化 JAK1 和 JAK3，随后磷酸化 STAT1、STAT3 和 STAT5 转录因子，最后转录因子进入细胞核内调节相应基因的表达，从而影响免疫应答。同时 MAPK、PI3K 信号通路的激活，可影响免疫细胞的增殖，存活和活化。

2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 hIL21 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 hIL21R。见图 1 流式验证 hIL21R 表达。

	Population Name	Mean , FL4-A
	hIL21 Effector Reporter cells+anti-IL21R	5.35E4
	Control cell+anti-IL21R APC	146

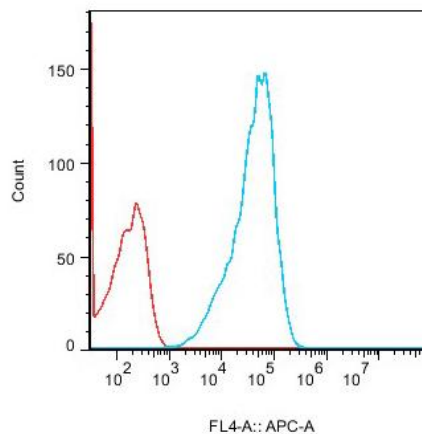


图 1: hIL21 Effector Reporter Cell 细胞表达人 hIL21R。

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。

hIL21 Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 hIL21 的信号转导过程，原理见图 2 所示。

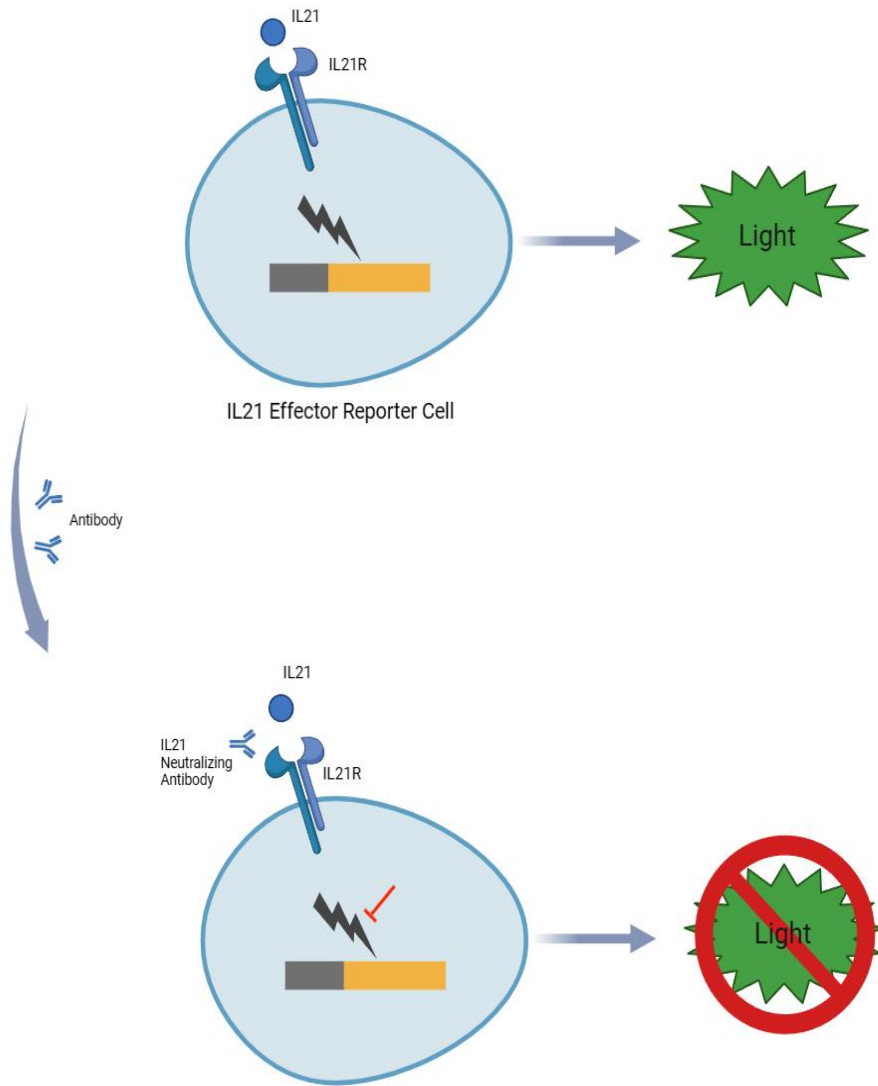


图 2: hIL21 Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: hIL21R

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

blastidicin+400ug/ml G418

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 hIL21 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
hIL21 Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74183M
Recombinant Human hIL21	/	/
IL21 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 hIL21 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

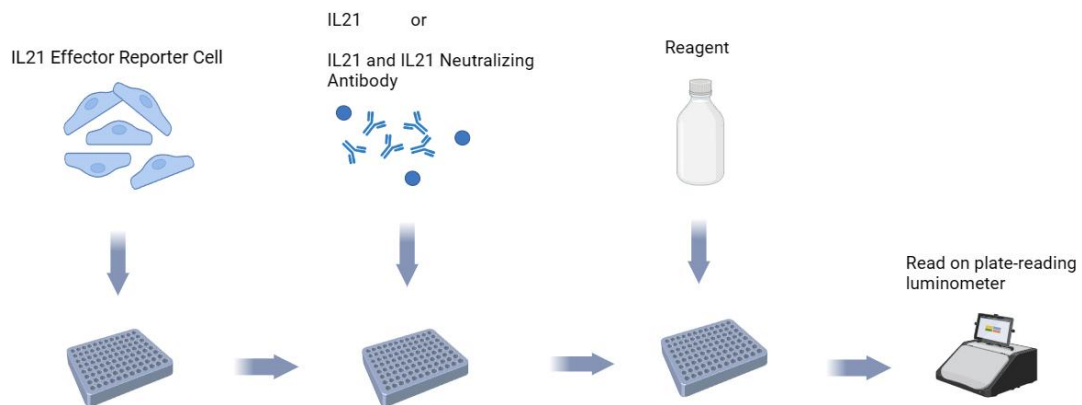


图 3: hIL21 Bioassay 流程示意图

6.1 hIL21 Stimulation Assay

hIL21 Stimulation Assay 由报告细胞 hIL21 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74183 开展，本实验中使用 Recombinant Human hIL21 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 hIL21 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 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 hIL21 Inhibition Assay

hIL21 Stimulation Assay 由报告细胞 hIL21 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74183 开展，本实验中使用 Recombinant Human hIL21 和 IL21 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 IL21 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 5.5 至 6 小时。（备注：对于 IL21 的阻断抗体，建议加入抗体后马上加入配体刺激；对于 IL21 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 4： 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

Dose Response of Recombinant Human IL21 in hIL21 Effector Reporter Cells (C11)

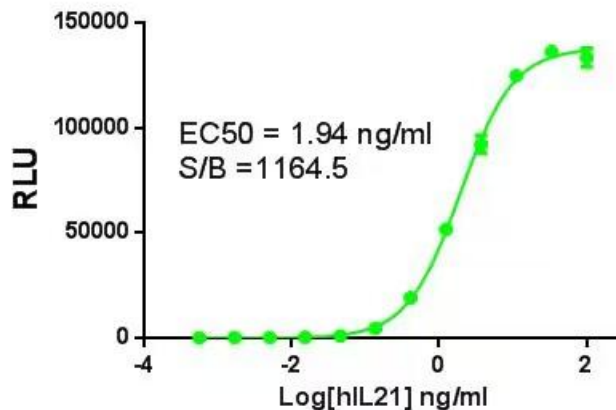


图 5： hIL21 Stimulation Assay 验证结果

Inhibition of hIL21-Induced Reporter Activity by IL21 Neutralization Ab in hIL21 Effector Reporter Cells (C11)

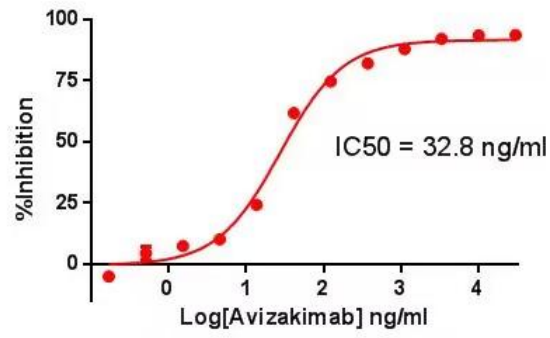


图 6: hIL21 Inhibition Assay 验证结果

8. 相关产品

N/A