

hIL33 Effector Reporter Cell

CBP74176

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 hIL33 Stimulation Assay	5
6.2 hIL33 Inhibition Assay	5
7. 数据展示	7
8. 相关产品	8



1. 背景信息

白细胞介素 33 (IL-33)是一种来自 IL-1 家族的组织源性核细胞因子，在内稳态和炎症过程中均在内皮细胞、上皮细胞和成纤维细胞样细胞中大量表达。IL-33 在体内的主要靶点是组织免疫细胞，如肥大细胞、第 2 组固有淋巴样细胞(ILC2)和调节性 T 细胞(Tregs)。其他细胞靶标也包括 Th2 细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、树突状细胞、Th1 细胞、CD8+T 细胞、NK 细胞、INKT 细胞、B 细胞、中性粒细胞和巨噬细胞。它是细胞损伤或组织损伤时释放的报警信号，向表达 ST2 受体(IL-1RL1)的免疫细胞发出警报。因此，IL-33 正在成为一种重要的免疫调节剂，在 2 型、1 型和调节性免疫反应中具有多效活性，在过敏性、纤维化、感染性和慢性炎症性疾病中发挥重要作用。

IL-33 主要有三个结构域，N 端核定位结构域，中间感知蛋白酶的结构域，以及 C 端的细胞因子结构域。IL-33 的 C 端部分有一个由 12 条 β 股组成的三维结构，构成一个 β -三叶折叠，具有 IL-1/FGF 家庭成员特征。IL-33 是孤儿受体 IL-1RL1b/ST2 的细胞外配体，具有细胞因子活性，但 IL-33 与其他 IL-1 家族成员没有共同祖先，这使得 IL-33 成为 IL-1 细胞因子超家族的非典型成员。

2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 hIL33 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 hIL33。见图 1 流式验证 hIL33R 表达。图 2 流式验证 IL1RAP 表达。

	Population Name	Mean , FL4-A
	hIL33 Effector Reporter Cell+anti-IL33R	1.68E4
	Control cell+anti-IL33R	158

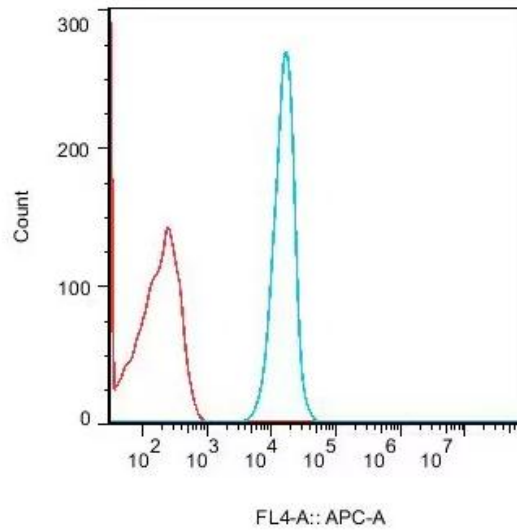




图 1: hIL33 Effector Reporter Cell 细胞表达人 hIL33R

	Population Name	Mean , FL4-A
	hIL33 Effector Reporter cell+anti-IL1RAP	1.32E5
	Control cell+anti-IL1RAP	3594

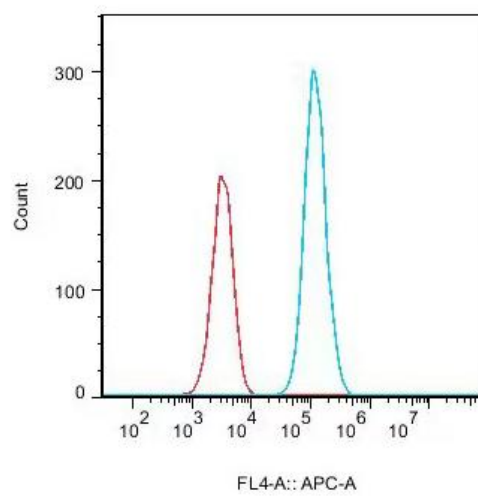


图 2: hIL33 Effector Reporter Cell 细胞表达人 IL1RAP

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。

hIL33 Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 hIL33 的信号转导过程，原理见图 3 所示。

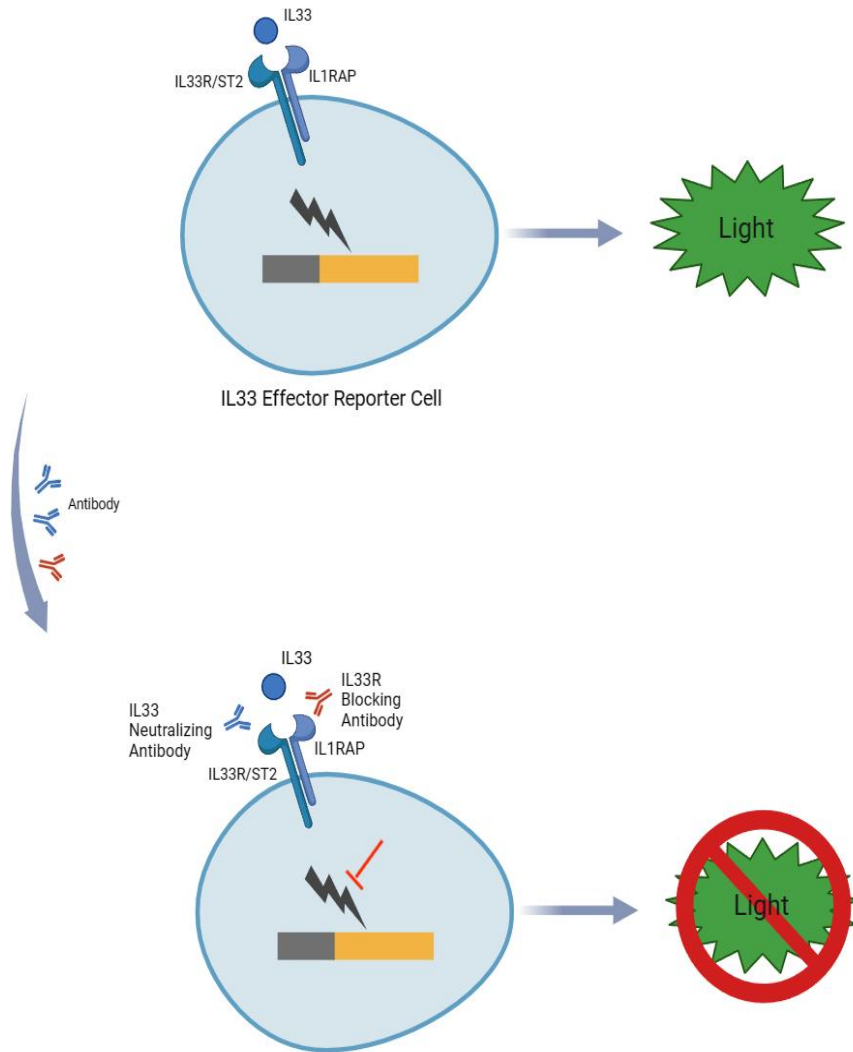


图 3: hIL33 Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+1ug/ml puromycin+800ug/ml hygromycin+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 hIL33 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
hIL33 Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74176M
Recombinant Human IL33	/	/
Etokimab	/	/
Melrilimab	/	/
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 hIL33 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

培养基. 保持细胞密度在 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 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

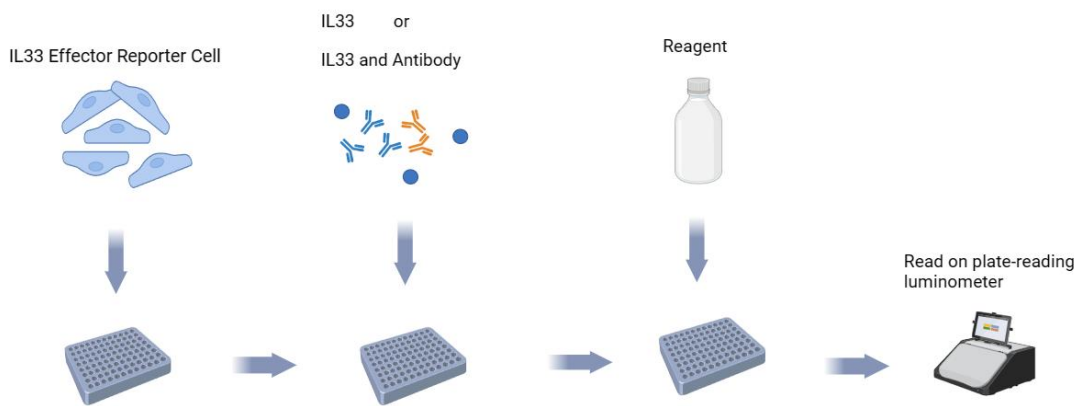


图 4: hIL33 Bioassay 流程示意图

6.1 hIL33 Stimulation Assay

hIL33 Stimulation Assay 由报告细胞 hIL33 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74176 开展, 本实验中使用 Recombinant hIL33 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 hIL33 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 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) 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 IL33 Inhibition Assay

IL33 Stimulation Assay 由报告细胞 hIL33 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74176 开展, 本实验中使用 Recombinant Human IL33 和 Etokimab 或 Recombinant Human IL33 和 Melrilimab 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 IL33 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 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) 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 IL33 的阻断抗体, 建议加入样品后马上加入配体刺激; 对于 IL33 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 IL33 in hIL33 Effector Reporter Cells (C12)

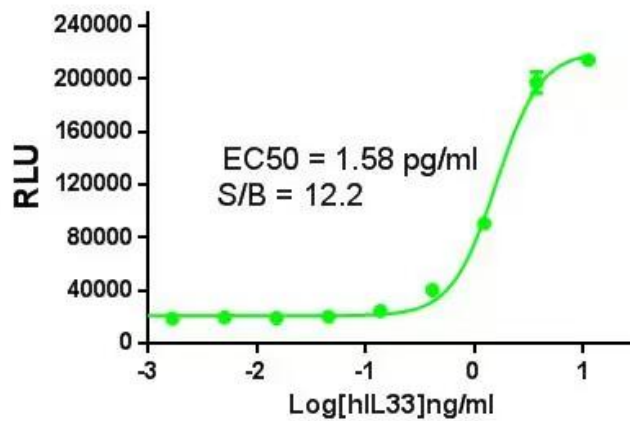


图 6: hIL33 Stimulation Assay 验证结果

Inhibition of hIL33-Induced Reporter Activity by IL33 Neutralization Ab in hIL33 Effector Reporter Cells (C12)

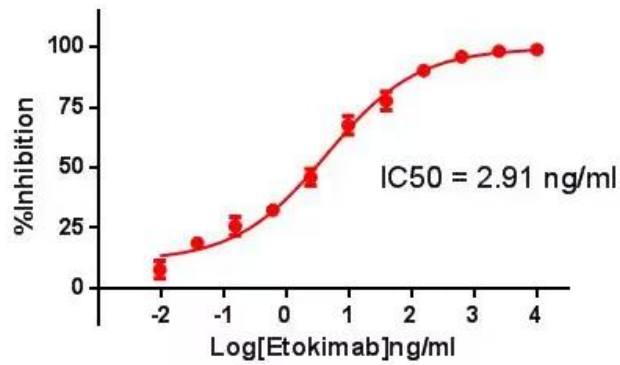


图 7: IL33 Inhibition Assay 验证结果(测试样本: Recombinant Human IL33 和 Etokimab)

Inhibition of hIL33-Induced Reporter Activity by IL33R Blocking Ab in hIL33 Effector Reporter Cells (C12)

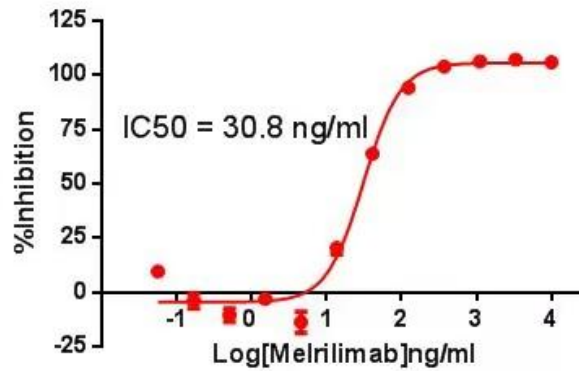


图 8: IL33 Inhibition Assay 验证结果(测试样本: Recombinant Human IL33 和 Melrilimab)

8. 相关产品

N/A