

hIL4/IL13 Dual Effector Reporter Cell CBP74110 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	3
5.3 细胞冻存	4
6. 细胞实验流程	4
6.1 hIL4/IL13 Dual Stimulation Assay	4
6.2 hIL4/IL13 Dual Inhibition Assay	5
7. 数据展示	6
8. 相关产品	7

1. 背景信息

白细胞介素-13 (Interleukin-13) 是白介素家族的重要成员, 是由 IL-13 基因编码生成的蛋白质, 分子量约 10KD。IL-13 可由多种细胞分泌, 如 CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和自然杀伤细胞。特别是 2 型辅助性 T 细胞 (Th2)。IL-13 对单核巨噬细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞和血管内皮细胞等具有多种生物学作用, 是机体免疫反应的调节的介质。白细胞介素-4 (IL-4) 是一种糖基化的 I 型细胞因子, 具有三个链内二硫键, 采用捆绑式四 α 螺旋结构。由 Th2 偏向的 CD4+T 细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞表达。IL-4 和 IL-13 的功能重叠可能是由于受体和细胞因子表达模式所致。IL-4 的 1 型异二聚体受体由 IL-4R α 和 γ c 组成, 2 型异二聚体受体由 IL-4R α 和 IL-13R α 1 组成。这个 2 型异二聚体也是 IL-13 的受体之一。

2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 hIL4/IL13 Dual 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 hIL4R 和 IL13R。

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。

hIL4/IL13 Dual Effector Reporter Cell 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 hIL4/IL13 的信号转导过程, 原理见图 1 所示。

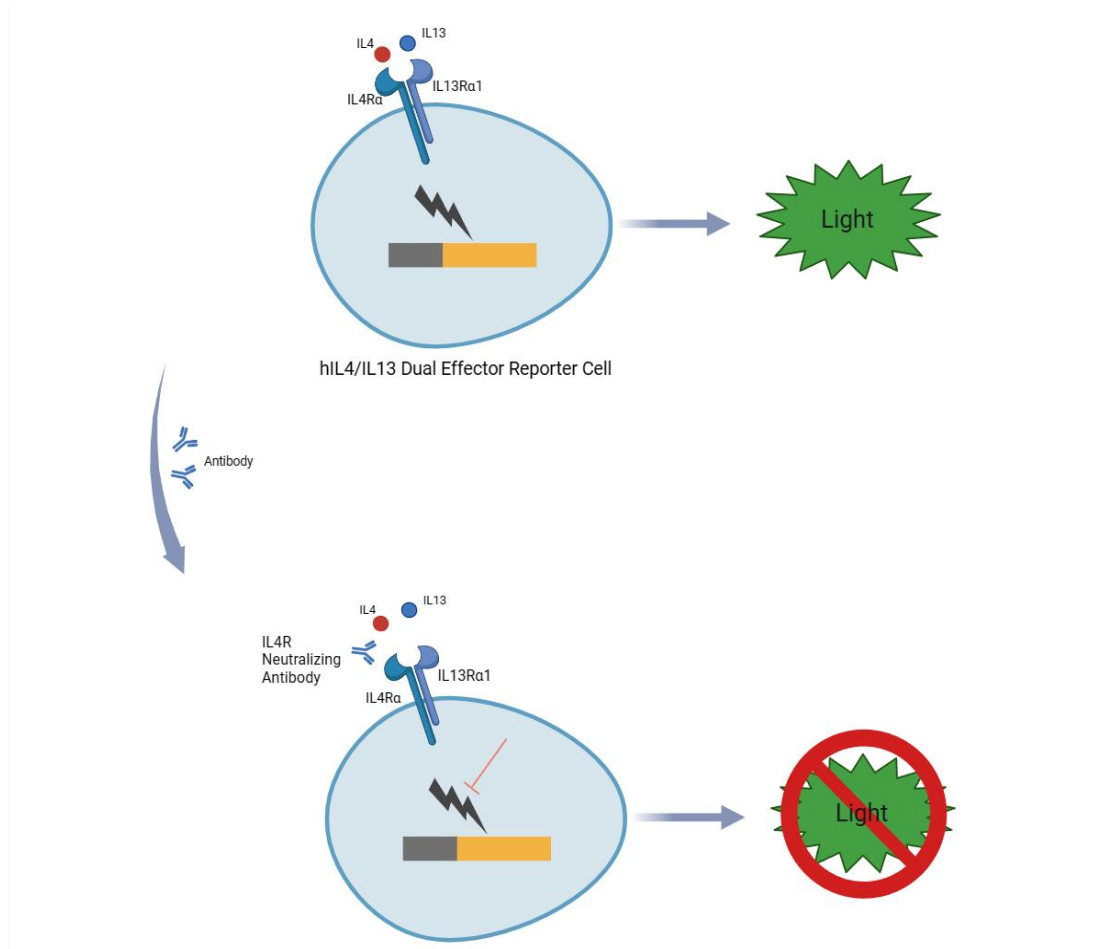


图 1:hIL4/IL13 Dual Effector Reporter Cell 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: hIL4R IL13R

传代培养基: DMEM+10%FBS+2 ug/ml Puromycin+ 100ug/ml Hygromycin

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 hIL4/IL13 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
hIL4/IL13 Dual Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74110M
Recombinant Human hIL4	/	/
Recombinant Human hIL13		
IL4R 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 hIL4/IL13 Dual 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

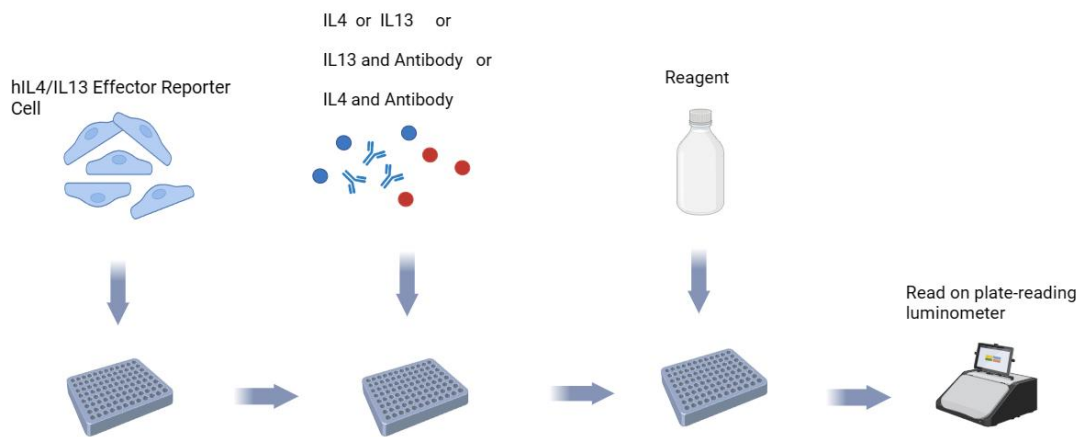


图 2:hIL4/IL13 Dual Bioassay 流程示意图

6.1 hIL4/IL13 Dual Stimulation Assay

hIL4/IL13 Dual Stimulation Assay 由报告细胞 hIL4/IL13 Dual Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74110 开展, 本实验中使用 Recombinant Human hIL4 、 Recombinant Human hIL13 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 hIL4/IL13 Dual 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 细胞培养箱培养过夜 (16 至 24 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 hIL4/IL13 Dual Inhibition Assay

hIL4/IL13 Dual Stimulation Assay 由报告细胞 hIL4/IL13 Dual Effector Reporter Cell, Cat.#CBP74110 开展，本实验中使用 Recombinant Human hIL4 和 hIL4R Neutralizing Antibody、Recombinant Human hIL13 和 hIL4R Neutralizing Antibody 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

- 1) 消化对数生长的细胞，将消化下来的细胞重悬于 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 PDL coating 96 孔细胞培养板中，80ul/孔细胞悬液，37°C 培养箱过夜培养。
- 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 中步骤 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过夜（通常为 16 至 24 小时）。（备注：对于 IL4 的阻断抗体，建议加入抗体后马上加入配体刺激；对于 IL4R 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 Bright-Glo™ 荧光素酶检测试剂放置 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

Dose Response of Recombinant Human IL13 in Human hIL4/IL13 Dual Effector Reporter Cells

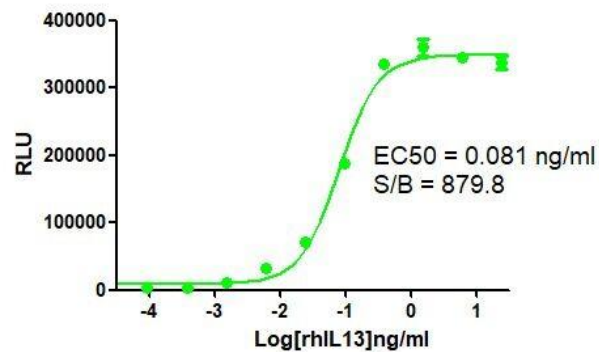


图 4: hIL4/IL13 Dual Stimulation Assay 验证结果(测试样本: Recombinant Human IL13)

Dose Response of Recombinant Human IL4 in hIL4/IL13 Dual Effector Reporter Cells (C7)

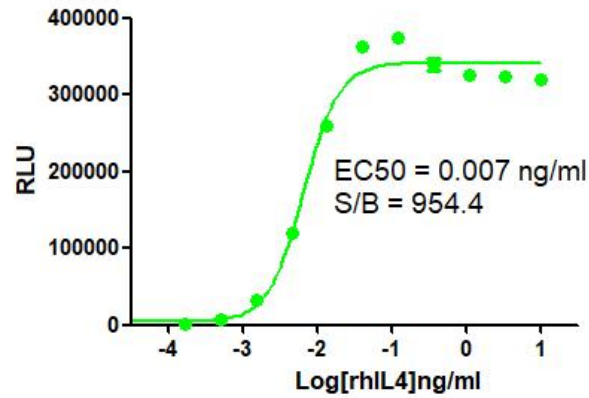


图 5: hIL4/IL13 Dual Stimulation Assay 验证结果(测试样本: Recombinant Human IL4)

Inhibition of IL-4-induced Reporter Activity by IL-4R Neutralizing Antibody in hIL4/IL13 Dual Effector Reporter Cells (Clone 7)

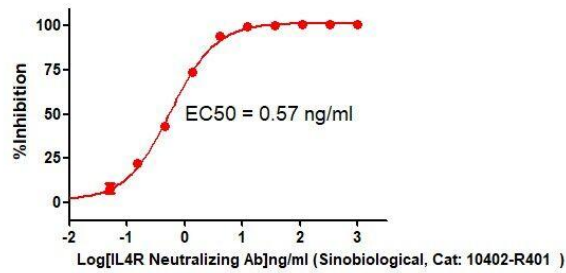


图 6: hIL4/IL13 Dual Inhibition Assay 验证结果 (测试样本: Recombinant Human hIL4 和 hIL4R Neutralizing Antibody)

Inhibition of IL-13-induced Reporter Activity by IL-4R Neutralizing Antibody in hIL4/IL13 Dual Effector Reporter Cells

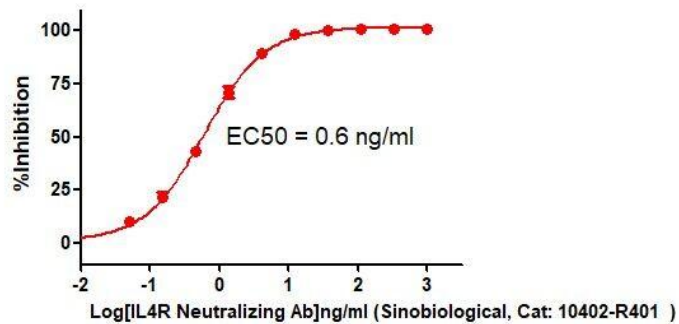


图 7: hIL4/IL13 Dual Inhibition Assay 验证结果 (测试样本: Recombinant Human hIL13 和 hIL4R Neutralizing Antibody)

8. 相关产品

N/A