Genomeditech (Shanghai) Co., Ltd.
Order: +86 021-50432825/50432826
Email: service@genomeditech.com

产品手册

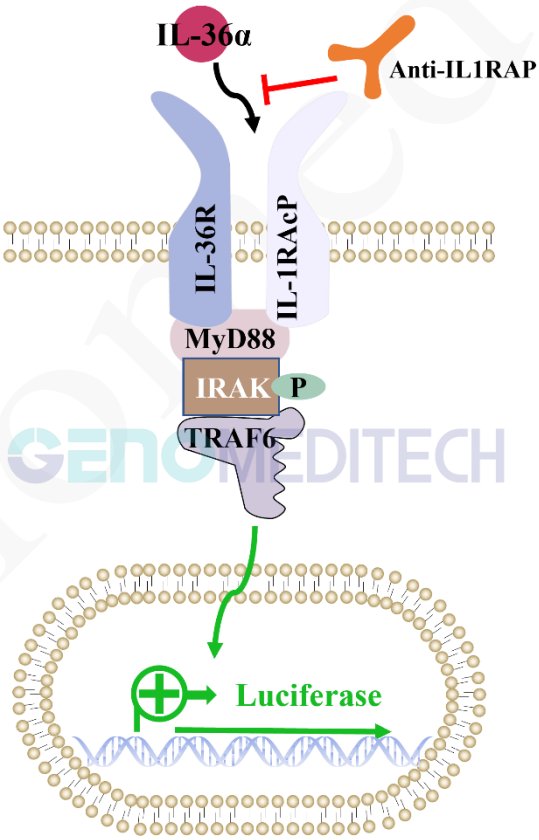
H_IL-36 Reporter 293 Cell Line

货号: GM-C46318

版本号：4.0.26.929

IL-36 是 IL1 细胞因子家族的一员。目前发现 4 个亚型：IL-36α（IL-1F6），IL-36β（IL-1F8），IL-36γ（IL-1F9），IL-36Rα（IL-1F5）；前三者为 IL-36 受体激动剂，促进炎症；IL-36Rα 是受体拮抗剂，拮抗炎症。IL-36α，IL-36β，和 IL-36γ 蛋白经过剪切成为活性形式。结合 IL-36 受体，通过信号通路，释放细胞因子，趋化因子，促进炎症。IL-36Rα 的活性形式，不能结合 IL-36 受体，不能启动信号传导，只起到拮抗炎症的效果。

吉满生物 H_IL-36 Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系。配体结合 IL-36R、IL-1RAcP 亚基组成的异源二聚体受体复合物，然后激活信号通路，从而激活荧光素酶（Luciferase）的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 IL-36 相关药物的体外效果评价。



本公司产品仅供科研用途，严禁用于人体治疗！

规格参数

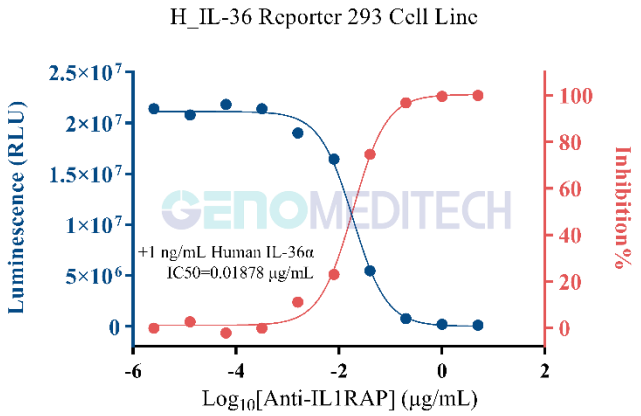
数量	5E6 Cells per vial,1 mL
产品形式	1 支冻存细胞
储运条件	干冰运输，–196°C 以下长期储存
复苏培养基	DMEM+10% FBS+1% P.S
生长培养基	DMEM+10% FBS+1% P.S+4 μg/mL Blasticidin+0.75 μg/mL Puromycin
培养备注	无
细胞冻存液	90% FBS+10% DMSO
生长特性	贴壁
培养条件	37°C, 5% CO_2
支原体检测	该细胞系已通过支原体检测，结果为阴性。
生物安全等级	Biosafety Level 2
备注	建议尽早扩增该细胞，并冻存至少 10 支，以便后续使用。

实验材料与仪器

名称	**Manufacturer/Catalogue No.**
DMEM	Gibco/C11995500BT
Fetal Bovine Serum	ExCell/FSP500
Pen/Strep	Thermo/15140-122
Blasticidin	Genomeditech/GM-040404
Puromycin	Genomeditech/GM-040401
Recombinant Human IL-36 alpha/IL-1F6 Protein	Sino Biological/10607-HNCE1
Anti-IL1RAP hIgG1 Antibody (48D2_VH5.GL_VL4)	Genomeditech/GM-88388AB
Anti-IL1RL2(IL-36R) hIgG1 Antibody(spesolimab)	Genomeditech/GM-88478AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	Genomeditech/GM-040513
SpectraMax® L Microplate Luminometer	Moleculardevices/SpectraMax L
Countess 3 Automated Cell Counter	ThermoFisher/A49891
96 well round cell culture plate	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	Saining/1014010

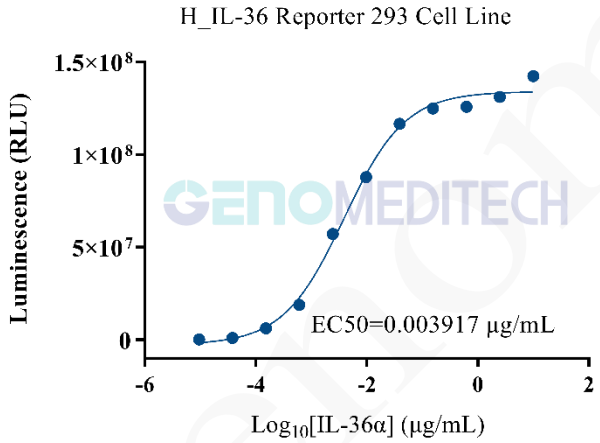
验证结果

应用



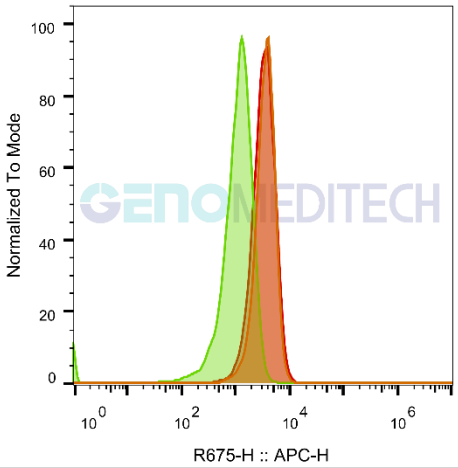
Anti-IL1RAP hIgG1 Antibody (48D2_VH5.GL_VL4) 抑制 IL-36 alpha/IL-1F6 诱导的报告基因活性。将 H_IL-36 Reporter 293 细胞系（GM-C46318）按 1.5E4 细胞/孔接种于 96 孔板，将梯度稀释的 Anti-IL1RAP hIgG1 Antibody (48D2_VH5.GL_VL4)（GM-88388AB）与细胞孵育 1 小时，随后加入 Human IL-36 alpha/IL-1F6 Protein（Sinobiological/10607-HNCE1）（1 ng/mL），继续孵育 6 小时，采用 Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) 检测萤火虫荧光素酶活性。数据以药物质量浓度表示。 [protocol]

信号通路



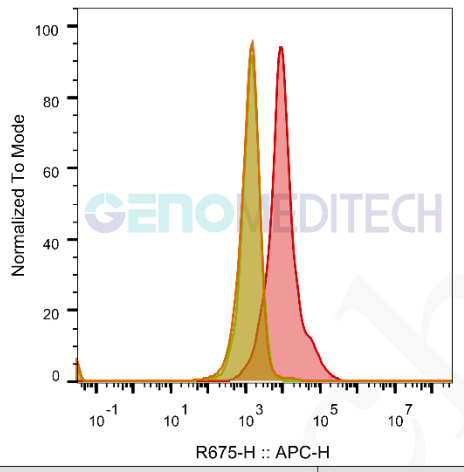
IL-36 alpha/IL-1F6 Protein 激活验证。H_IL-36 Reporter 293 细胞系（GM-C46318）按 1.5E4 细胞/孔接种于 96 孔板，加入梯度稀释的 Human IL-36 alpha (Sinobiological/10607-HNCE1)，于 assay buffer（DMEM+1% FBS+1 %P.S）中孵育 6 小时后，采用 Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) 检测萤火虫荧光素酶活性，最大诱导倍数约为 [1478.6]，数据以药物质量浓度表示。 [protocol]

表达



	SampleID	Geometric Mean : R675-H
	293 Anti-IL1RAP+APC-2nd Ab	3493
	H_IL-36 Reporter 293 H_IgG+APC-2nd Ab	987
	H_IL-36 Reporter 293 Anti-IL1RAP+APC-2nd Ab	3259

IL1RAP 流式表达验证。采用流式细胞术，用 Anti-IL1RAP hIgG1 抗体(48D2_VH5.GL_VL4)（GM-88388AB）检测 H_IL-36 Reporter 293 细胞系（GM-C46318）的 IL1RAP 表达。



	SampleID	Geometric Mean : R675-H
	293 Anti-IL1RL2(IL-36R)+APC-2nd Ab	1123
	H_IL-36 Reporter 293 H_IgG+APC-2nd Ab	1223
	H_IL-36 Reporter 293 Anti-IL1RL2(IL-36R)+APC-2nd Ab	9766

IL1RL2(IL-36R)流式表达验证。采用流式细胞术，用 Anti-IL1RL2(IL-36R) hIgG1 抗体(spesolimab)（GM-88478AB）检测 H_IL-36 Reporter 293 细胞系（GM-C46318）的 IL1RL2(IL-36R)表达。

Genomeditech

细胞复苏

复苏培养基：DMEM+10% FBS+1% P.S

为确保最高存活率，应在收到冻存细胞后立即解冻并复苏培养。如果在收到细胞后需要继续储存，将其置于液氮罐中，严禁储存在-70°C，因为在-70°C 下储存会导致活性丧失。

a) 37°C水浴锅预热复苏培养基，加入预热后的复苏培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。

b) 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37°C恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下轻轻摇动解冻，直到刚刚融化（通常 2-3 分钟）。

c) 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a）的离心管中，轻轻混匀，176 × g，离心 5 min，使细胞沉淀，弃上清。

d) 使用 1 mL 复苏培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，活细胞≥ 3E6 cells/mL。

e) 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 2-3E5 cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中。

细胞冻存

细胞冻存液：90% FBS+10% DMSO

a) 使用 176 × g，3 min 离心收集细胞。

b) 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5E6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。

c) 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中，-80°C下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

细胞传代

生长培养基： DMEM+10% FBS+1% P.S+4 μg/mL Blasticidin+0.75 μg/mL Puromycin

细胞复苏后的 1 至 2 代，使用复苏培养基，待细胞状态稳定后，再更换为含有抗生素的生长培养基。

a) 细胞为上皮细胞，贴壁生长。培养箱中孵育 16-24 h 后，镜下观察细胞贴壁情况，当细胞密度达到 80%，需要进行细胞传代。注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。

b) 将皿或培养瓶中的培养液弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。

c) 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液，37°C 消化 30-60 s，显微镜下观察。

d) 待细胞变圆，细胞间隙明显，部分细胞刚开始脱离瓶壁时，加 2 mL 左右生长培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，176 × g 室温离心 3 min。

e) 弃上清，细胞沉淀用生长培养基重悬，根据传代前细胞密度分盘（根据培养皿面积和细胞密度计算，传代后细胞密度为 30-40%）。

细胞传代比例为 1:3-1:4，3 天传代。

培养备注

a) 细胞刚复苏，会有一定比例的死细胞，属于正常现象，经调整会有明显好转，状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定。

b) 注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。

c) FBS 需 56°C 水浴 30 分钟，可热灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

实验方案

抗体阻断实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_IL-36 Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5 × 10^4 cells/孔。本次实验分别使用 Human IL-36α 作为激活药物（定浓 10 ng/mL），Anti-IL1RAP hIgG1 Antibody (48D2_VH5.GL_VL4)作为 block 抗体（150 kDa；以下简称为 Anti-IL1RAP）。Conc.01 终浓度分别为 5 μg/mL，5 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.10 分别排布在 B2-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μL PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	Anti-IL1RAP	PBS	5.00 μg/mL	1.00 μg/mL	200.00 ng/mL	40.00 ng/mL	8.00 ng/mL	1.60 ng/mL	320.00 pg/mL	64.00 pg/mL	12.80 pg/mL	2.56 pg/mL	0
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

加样步骤

a) 在实验前 16-24 h，将细胞从培养瓶中取出，消化离心收集细胞沉淀，使用适量完全培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以完全培养基调整细胞浓度为 1.5 × 10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜使用。

b) 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。

c) 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。

d) 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-36α	0.25 mg/mL	0.0025 mg/mL	取 2 μL 储液 + 198 μL Assay Buffer
Anti-IL1RAP	4.86 mg/mL	0.486 mg/mL	取 2 μL 储液 + 18 μL Assay Buffer

e) 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 加入 75 μL Assay Buffer，B3-B12 孔，加入 60 μL Assay Buffer。

f) 吸取不同体积的待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2 加入 1.58 μL Anti-IL1RAP），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 15 μL，加入次孔										对照组
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.58 μL Anti-IL1RAP	加入	75 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL
C													
D													
E													
F													
G													
H													

g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 15 μL，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀；

h) 以此类推，直至第 10 个梯度稀释孔（B11）。

i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。加入步骤 h 梯度稀释好的抗体，每孔 50 μL，盖上盖板，放入培养箱中孵育 1 h。

j) 配置激活药物 Human IL-36α（2 × 激活浓度），2 ng/mL Human IL-36（1.92 μL 0.0025 mg/mL Human IL-36α 母液加入到 2400 μL Assay Buffer 中，混匀后使用）。

k) 1 h 后，将步骤 i 细胞孔板取出，加入步骤 j 准备好的激活药物，每孔 50 µL。

l) 盖上板盖，于 37℃ CO_2 培养箱中培养 6 h。

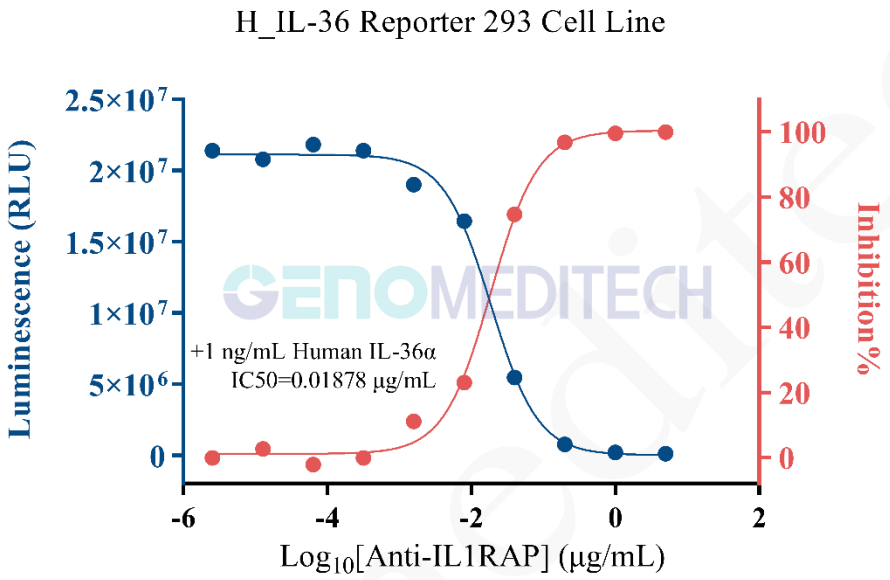
m) 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_IL-36 Reporter 293 Cell Line	1 ng/mL H_IL-36α +0 µg/mL Anti-IL1RAP	1 ng/mL H_IL-36α + 5.00 µg/mL Anti-IL1RAP	1 ng/mL H_IL-36α + 2.56 pg/mL Anti-IL1RAP
	21356734	108425	21381742

验证结果



蛋白激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_IL-36 Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5 × 10^4 cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human IL-36 alpha/IL-1F6 Protein（17.2 kDa；以下简称 IL-36α）作为阳性药物， Conc.01 浓度为 10 μg/mL，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μL PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	IL-36α	10.00 μg/mL	2.50 μg/mL	625.00 ng/mL	156.25 ng/mL	39.06 ng/mL	9.77 ng/mL	2.44 ng/mL	610.35 pg/mL	152.59 pg/mL	38.15 pg/mL	9.54 pg/mL	0
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

加样步骤

a) 在实验前 16-24 h，将细胞从培养瓶中取出，消化离心收集细胞沉淀，使用适量完全培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以完全培养基调整细胞浓度为 1.5 × 10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜使用。

b) 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。

c) 每个待测药物，使用一行（如 B1-B11）。

d) 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
IL-36α	0.25 mg/mL	/	直接使用储液

e) 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1 孔加入 160 μL Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 120 μL Assay Buffer。

f) 吸取不同体积的待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B1 中加入 6.67 μL IL-36α），混匀。

	母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 40 μL，加入次孔									对照组
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	6.67 μL IL-36α	160 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL
C													
D													
E													
F													
G													
H													

g) 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 40 μL，加入到第二个梯度稀释孔 B2，充分混匀。

h) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11）。

i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。

j) 加入梯度稀释好的药物，100 μL 每孔。

k) 盖上板盖，于 37℃ CO_2 培养箱中培养 6 h。

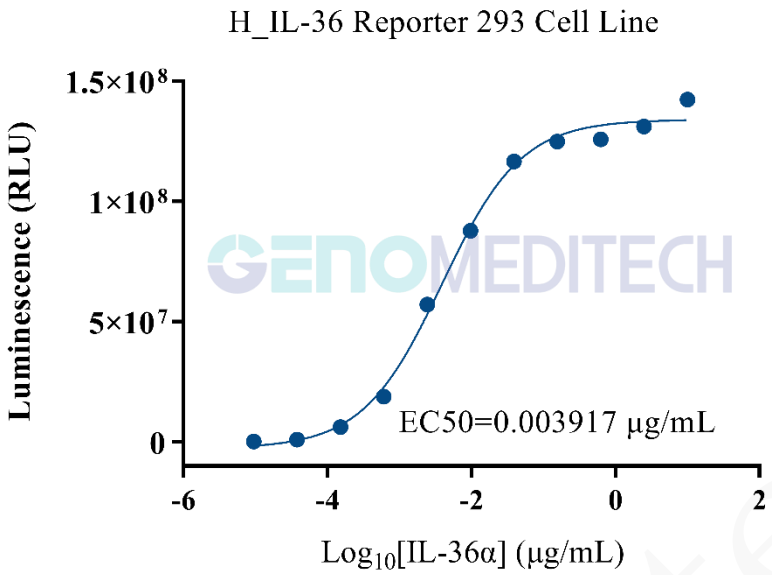
l) 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_IL-36 Reporter 293 Cell Line	0.00 μg/mL	10.00 μg/mL	9.54 pg/mL
	96270	142349398	224084

验证结果



相关产品

IL-36	
H_IL-36 Reporter 293 Cell Line (old version)	Cynomolgus_IL-36R(IL1RL2) HEK-293 Cell Line
H_IL-36R(IL1RL2) CHO-K1 Cell Line	H_IL-36R(IL1RL2) HEK-293 Cell Line
Anti-IL1RL2(IL-36R) hIgG1 Antibody(recibokibart)	Anti-IL1RL2(IL-36R) hIgG1 Antibody(spesolimab)

使用许可协议

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策：

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。