

技术手册

H_TIGIT /CD155 Reporter Blockade Assay (Jurkat; Raji)

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.8.240522

Table of Contents

一、	产品描述.....	3
二、	产品基本信息及组分.....	4
三、	包装、运输及储存.....	4
四、	细胞信息.....	4
五、	实验仪器及试剂.....	5
1.	试剂和耗材.....	5
2.	重要仪器.....	5
3.	细胞复苏、传代、冻存.....	5
六、	使用方法.....	7
1.	概要.....	7
2.	准备 H_PVR(CD155) Raji Cell Line	7
3.	准备 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line	7
4.	试剂准备.....	7
5.	稀释步骤.....	8
6.	H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line 与抗体孵育	8
7.	H_PVR(CD155) Raji Cell Line 与 SEE 孵育	9
8.	共培养.....	9
9.	报告基因检测.....	9
10.	验证结果.....	9
	使用许可协议:	10

一、 产品描述

TIGIT (T cell Ig and ITIM domain) 是脊髓灰质炎病毒受体(PVR) / Nectin 家族的成员。它由细胞外免疫球蛋白可变区(IgV)结构域, 1 型跨膜结构域和具有经典免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM) 和免疫球蛋白酪氨酸尾(ITT)基序的细胞内结构域组成。CD155 (PVR) 是 TIGIT 的高亲和力配体。肿瘤表面高表达的 CD155 一旦与 NK 和 T 细胞表面的 TIGIT 结合, 它们对肿瘤细胞的杀伤作用就会被抑制。基于 TIGIT 轴的原理和肿瘤微环境中的复杂免疫抑制模式, 如何在临床上安全有效地阻断 TIGIT 正成为许多医学研究者想要攻克的技术难关, Anti-TIGIT 抗体药物的体外活性检测则是迈入临床的第一道门槛。

H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line 使用工程改造的 Jurkat 细胞作为效应细胞, 该细胞稳定表达了 H_TIGIT/ H_CD226 受体和由应答元件驱动表达的萤火虫萤光素酶。Anti-TIGIT 在 TIGIT 作用机制中的生物活性通过萤光素酶定量, 而效应细胞中的萤光素酶活性通过生物发光读数定量。因此可用于靶向 TIGIT 功能性抗体的活性检测。

吉满生物依靠多年研究经验, 利用巧妙的载体设计和第三代慢病毒报告基因系统, 推出 TIGIT Reporter 相关细胞系和 TIGIT 活性检测服务, 并可接受 TIGIT 细胞系定制服务。

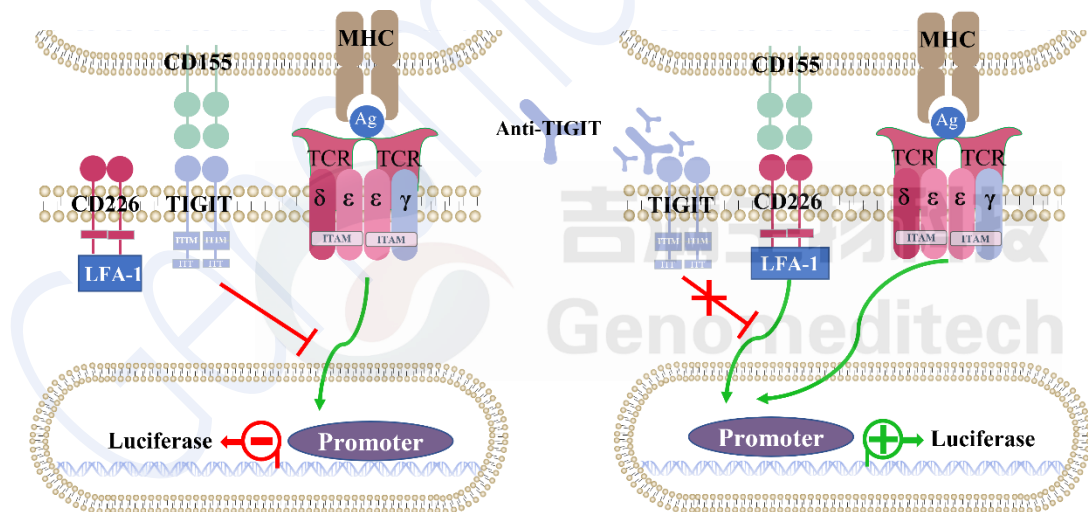


Fig 1. 原理示意图

二、产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-032AS002	H_TIGIT /CD155 Reporter Blockade Assay (Jurkat; Raji)	1 kit

组成成分

名称	Cat.	数量
H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line	GM-C20072	1 管 (5E6 Cell/mL)
H_PVR(CD155) Raji Cell Line	GM-C09243	1 管 (5E6 Cell/mL)

三、包装、运输及储存

1. 细胞系产品干冰运输，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
2. 接触产品请戴手套。请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
3. 本产品相关 Assay，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

四、细胞信息

H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line

细胞复苏培养基: RPMI 1640+10% FBS+1% P.S

细胞生长培养基: RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+3.5 µg/mL Blasticidin+200 µg/mL Hygromycin+0.75 µg/mL Puromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

Jurkat 来自中国科学院细胞库，悬浮细胞

H_PVR(CD155) Raji Cell Line

细胞复苏培养基: RPMI 1640+10% FBS+1% P.S

细胞生长培养基: RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+0.25 µg/mL Puromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

Raji 来自中国科学院细胞库，悬浮细胞

Assay Buffer

RPMI 1640+1% FBS+1% P.S

五、 实验仪器及试剂

1. 试剂和耗材

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech /GM-040404-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
RPMI 1640	500 mL	Biological Industries/01-100-1ACS
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Luciferase Assay Kit	100 tests	Genomeditech/GM-040501A
Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody	10 µg	Genomeditech/GM-24029AB
SEE	100 µg	Toxin Technology /ET404

2. 重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

3. 细胞复苏、传代、冻存

1) Raji 细胞和 Jurkat 细胞复苏

- a) 细胞冻存密度为 5×10^6 cells/mL, 冻存管分装 1 mL。
- b) 在 37°C 水浴锅预热培养基, 加入预热完全培养基 5 mL 到 15 mL 离心管。
- c) 从液氮中取出冻存的细胞并迅速放入 37°C 恒温水浴锅, 将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。
- d) 用 70% 乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。
- e) 在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到预先加有预热好的 15 mL 离心管中, 轻轻混匀, 1000 rpm, 离心 5 min 使细胞沉淀, 弃上清。
- f) 使用 1 mL 完全培养基重悬细胞沉淀, 可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞, 细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。

- g) 调整活细胞密度到 $4-6 \times 10^5$ cells/mL, 将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中 (3-5 mL, 培养面积 25 cm^2), 竖瓶培养。首次复苏后, 约 48-72 h 可进行第一次传代, 此次传代后细胞培养基可调整为添加抗生素的完全培养基。若 48 h 未传代, 建议适当补加培养基, 瓶体改为横向放置。
- 2) Raji 细胞和 Jurkat 细胞传代
- a) 推荐细胞接种密度在 $2.5-4 \times 10^5$ cells/mL, 对于 Raji 细胞而言, 当细胞密度达到 $1-1.2 \times 10^6$ cells/mL、1 传 3-1 传 4, 2-3 天传代, 不要让其密度超 1.5×10^6 cells/mL。对于 Jurkat 细胞而言, 当细胞密度达到 $1.5-2 \times 10^6$ cells/mL 时进行传代, 1 传 3, 2-3 天传代, 不要让其密度超过 2×10^6 cells/mL。推荐使用 T25 瓶进行传代培养, 也可通过计数控制细胞传代密度。
- b) 该细胞为悬浮细胞, 传代时推荐使用【半换液法】对细胞状态较为有利。传代时可以直接向培养瓶中添加新鲜培养液, 然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。
- c) 细胞倍增率稳定后再用于检测或冻存, 一般在 7-10 天左右。常规的稳定倍增率是 24 ± 8 小时。细胞在 20 代之内能够保持其功能。增殖时一般细胞活力在 80%。
- d) 该细胞对细胞密度较为敏感, 培养、传代时请注意保持细胞密度在合适的范围。
- e) 注意营养, 不处理时务必隔天适当补加培养基。
- 3) Raji 细胞和 Jurkat 细胞冻存
- a) 细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO。
- b) 使用 1000 rpm, 3 min 离心收集细胞。
- c) 使用预冷细胞冻存液重悬细胞, 细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL。
- d) 每管 1 mL 分装到细胞冻存管中, 冻存体积为 1 mL, 冻存密度为 5×10^6 cells/mL。拧紧盖子, 适当标记后, 将细胞冻存管置于梯度降温盒中, 在 -80°C 下保存至少 1 天, 尽快转移至液氮中。

六、 使用方法

1. 概要

本实验使用 1×10^5 cells/Well 的 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line 和 2×10^4 cells/Well 的 H_PVR(CD155) Raji Cell Line (接种密度)进行实验。

针对不同抗体样品和细胞的话,可调整优化操作步骤以获得更好的结果。如果是针对固定的抗体和细胞进行检测,建议先优化两种细胞之间的比例。

2. 准备 H_PVR(CD155) Raji Cell Line

在实验前 1-2 h,检测 H_PVR(CD155) Raji Cell Line 活力并计数。离心 $130-200 \times g$ (根据不同细胞可调整转速)收集细胞,再以新鲜培养基调整细胞浓度为 8×10^5 cells/mL。以排枪加 25 μ L 细胞/孔至 10 个孔。周围的孔加 100 μ L PBS。孵育箱中孵育待用。孔板排布参考 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line。

3. 准备 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line

在实验前 1-2 h,检测 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line 活力并计数。离心 $130-200 \times g$ (根据不同细胞可调整转速)收集细胞,再以新鲜培养基调整细胞浓度为 4×10^6 cells/mL。以排枪加 25 μ L 细胞/孔至 10 个孔,周围的孔加 100 μ L PBS (如检测样品数大于 1 个,铺板可以按下图示例进行铺板)。孵育箱中孵育待用。

4. 试剂准备

本实验使用 Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody (150 kDa) 作为阳性药物,Conc.01 浓度为 30 μ g/mL (200 nM),4 倍梯度稀释,Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody	30 μ g/mL	7.5 μ g/mL	1.88 μ g/mL	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.3 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 pg/mL	0	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

5. 稀释步骤

- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行，单重复可以检测 6 个药物）。
- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。以 Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody 为例，如 B2 孔中加入 34.8 μL 的 Assay buffer，B3-B11 加入 27.5 μL 的 Assay Buffer。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody	2.4 mg/mL	/	直接使用储液

- 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）。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 9.2 μL ，加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.83 μL Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody	加入 34.8 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL	27.5 μL
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- 在 B2 孔中加入 1.83 μL 的 Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody 抗体，混匀。对于不同浓度的抗体，首孔加入抗体量不同，首孔后的梯度稀释操作是相同的，可以使用排枪进行实验。
- 以此类推，直至 B10 孔，B11 为不加抗体的对照。
- 将装有稀释好的抗体的多孔板盖上盖板。

6. H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line 与抗体孵育

- 使用排枪将之前准备好的抗体梯度稀释液取 25 μL 加入到对应孔的 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line 中。
- 孵育箱中孵育 30 min。

7. H_PVR(CD155) Raji Cell Line 与 SEE 孵育

- 使用排枪取 25 μL SEE 加入到对应孔的 H_PVR(CD155) Raji Cell Line 中 (SEE 浓度为 0.6 ng/mL)。
- 孵育箱中孵育 30 min。

8. 共培养

- 使用排枪将孵育好的 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PVR(CD155) Raji Cell Line 混合孵育 (50 μL +50 μL)。
- 盖上检测板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 16 h。

9. 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line	PBS Control	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	457.76 pg/mL
	3457	8791	3485

10. 验证结果

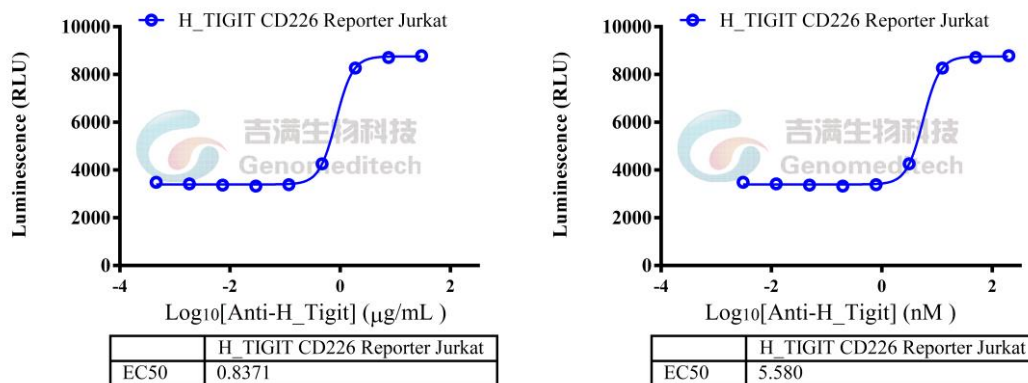


Fig2. 使用 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line 和 H_PVR(CD155) Raji Cell Line, 验证 Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody 的结果示例
(右图对药物或抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

使用许可协议:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech