

产品手册

H_TIGIT /CD155 Reporter Blockade Assay (Jurkat; CHO)

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.2

目录

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、	材料准备.....	5
1.	试剂耗材准备.....	5
六、	细胞培养、复苏、冻存.....	6
1.	Jurkat 细胞复苏.....	6
2.	Jurkat 细胞传代.....	6
3.	Jurkat 细胞冻存.....	6
1.	CHO-K1 细胞复苏.....	7
2.	CHO-K1 细胞传代（以 10 cm 皿为例）.....	7
3.	CHO-K1 细胞冻存.....	7
七、	使用方法.....	8
1.	Assay 验证（示例）.....	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	10
	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。

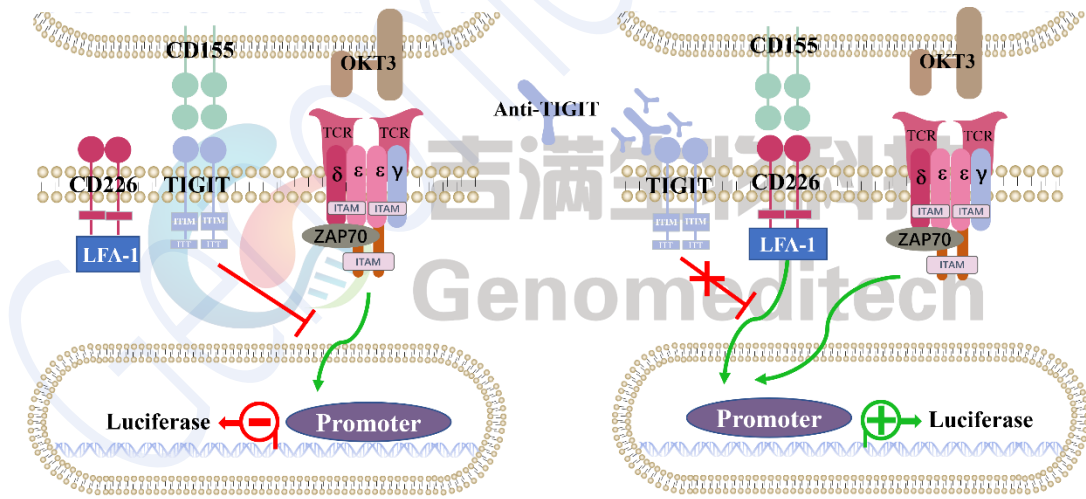


Fig 1. 原理示意图

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; CHO)	2 管 (5E6 Cells/mL)

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C20072	H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C
GM-C24690	H_PVR(CD155) aAPC CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C

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. 接触产品请带手套。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

H_PVR(CD155) aAPC CHO-K1 Cell Line

细胞复苏培养基: F12K+10% FBS+1% P.S

细胞生长培养基: F12K+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin+4 µg/mL Puromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

Assay Buffer

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

五、 材料准备

1. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
96 well round cell culture plate	Plate	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	Plate	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	Plate	Saining/1014010
Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody(Vibostolimab)	10 µg	Genomeditech/GM-24029AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	Genomeditech/GM-040513C

重要仪器

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

六、 细胞培养、复苏、冻存

1. Jurkat 细胞复苏

- 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。
- 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）。
- 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， $176 \times g$ ，离心 5 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 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，细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $4-6 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL 悬液），竖瓶培养。

3. Jurkat 细胞冻存

- 使用 $176 \times g$ ，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- 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。

2. Jurkat 细胞传代

注：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。

- 此细胞为淋巴细胞状，悬浮生长。
- 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生长培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加复苏培养基，瓶体改为横向放置。
- 当细胞密度达到 $1.5-2 \times 10^6$ cells/mL，1 传 3，隔 2-3 天继续传代，不要让其密度超 2×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养。
- 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生长培养基，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。

注意事项：

- 该细胞对密度较为敏感，培养、传代时请注意保持细胞密度在合适的范围。
- 首次传代时注意营养，不处理时务必隔天适当补加复苏培养基。
- 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。

1. CHO-K1 细胞复苏

- f) 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。
- g) 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）。
- h) 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。
- i) 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 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- j) 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $2-3 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中。

3. CHO-K1 细胞冻存

- d) 使用 176 × g，3 min 离心收集细胞。
- e) 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- f) 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。

2. CHO-K1 细胞传代（以 10 cm 皿为例）

注：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) 此细胞呈梭状，贴壁生长。培养箱中孵育 16-24 h 后，镜下观察细胞贴壁情况。当细胞密度大于 60%，即可进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:4-1:5，2-3 天传代。
- 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 2-3 min，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 20-30%）。

注意事项：

- a) 细胞状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定，细胞形态均匀，胞体健壮。
- b) 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。

七、使用方法

1. Assay 验证 (示例)

操作步骤可调整优化, 本实验推荐使用 5×10^4 cells/孔的 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line 和 1×10^4 cells/Well 的 H_PVR(CD155) aAPC CHO-K1 Cell Line 进行实验。

使用 Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody(Vibostolimab)(以下简称为 Vibostolimab; 约 150 kDa), 起始浓度(Conc.01)为 $5 \mu\text{g/mL}$, 3 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照。周围为 $100 \mu\text{L}$ PBS, 以防止边孔蒸发。

孔板布局:

	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	Vibostolimab	PBS	5.00 $\mu\text{g/mL}$	1.67 $\mu\text{g/mL}$	555.56 ng/mL	185.19 ng/mL	61.73 ng/mL	20.58 ng/mL	6.86 ng/mL	2.29 ng/mL	762.08 pg/mL	0	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D													
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 16–24 h, 消化离心收集 H_PVR(CD155) aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞, 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密度到 1×10^5 cells/mL, 以排枪加 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔, 周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS, 盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备抗体稀释。
- 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B10)。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Vibostolimab	4.742 mg/mL	0.4742 mg/mL	取 $2 \mu\text{L}$ 储液+ $18 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 U 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 $90 \mu\text{L}$ Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 $60 \mu\text{L}$ 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 中加入 1.94 μL Vibostolimab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 30 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.94 μL Vibostolimab	加入	90 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 30 μL ，加入到第二个稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- i) 实验前 1-2 h，离心收集 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line，以 Assay Buffer 重悬细胞，计算细胞密度及活力，通过补加 Assay Buffer 的方式，调整 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line 到 1×10^6 cells/mL，以排枪加 50 μL 细胞/孔至中间孔，周围的孔加 100 μL PBS。
- j) 取出步骤 i 准备好的 H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line 细胞孔板，分别加入步骤 h 准备好的药物，每孔 50 μL ，孵育 1 h。
- k) 1 h 后，取出步骤 a 的 H_PVR(CD155) aAPC CHO-K1 Cell Line 细胞孔板，吸弃上清，然后加入将步骤 j 准备好混合液，每孔 100 μL ，盖上盖板，继续孵育 6 h。
- l) 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	5.00 $\mu\text{g/mL}$	762.08 pg/mL
	8616	49932	7664

3) 验证结果

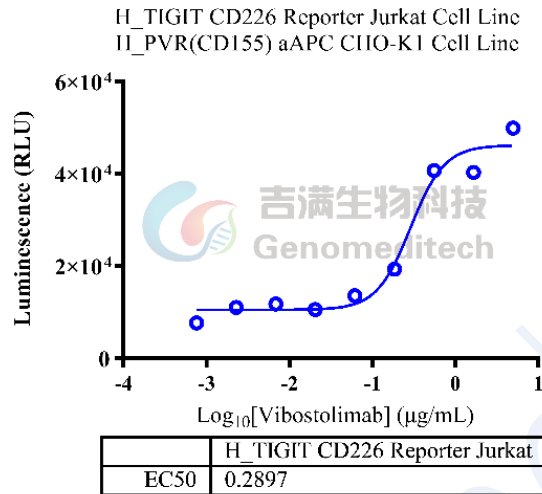


Fig 2. Response to Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody(Vibostolimab). The H_PVR(CD155) aAPC CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C24690) were seeded at a density of 1E4 cells per well in a 96-well plate and incubated overnight. The next day, serial dilutions of Anti-H_Tigit hIgG1 Antibody(Vibostolimab)(Cat. GM-24029AB) and the H_TIGIT CD226 Reporter Jurkat Cell Line(Cat. GM-C20072) at a density of 5E4 cells per well were added to the pre-seeded cells. The mixture was incubated for an additional 6 hours. Firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech).

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。