

CD47/PD-L1 Dual Target Cell

CBP74155

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	4
5.2 细胞传代	5
5.3 细胞冻存	5
6. 细胞实验流程	4
6.1 SIRP α &PD-1 Blockade Assay	4
7. 数据展示	6
8. 相关产品	7

1. 背景信息

Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1),一种在激活的 T 细胞上表达的受体, 与其配体 PD-L1 和 PD-L2 结合, 负向调节免疫反应。PD-1 配体存在于大多数癌症中, PD-1:PD-L1/2 相互作用会抑制 T 细胞活性, 并使癌细胞逃避免疫监视。PD1/PDL1 信号转导通路是肿瘤免疫抑制的重要组成部分, 可以抑制 T 淋巴细胞的兴奋, 增强肿瘤细胞的免疫耐受, 从而实现肿瘤免疫逃逸。综上所述, PD1 与 PDL1 结合可以减弱 T 细胞介导的免疫监视, 导致免疫反应缺失, 甚至导致 T 细胞凋亡。PD1/PDL1 抑制剂可解除抗肿瘤 T 细胞的免疫抑制, 从而导致 T 细胞增殖并渗透到肿瘤微环境中并诱导抗肿瘤反应。PD-1:PD-L1/2 通路还参与调节自身免疫反应, 使这些蛋白质成为多种癌症以及多发性硬化症、关节炎、狼疮和 I 型糖尿病的有希望的治疗靶点。

CD47 也称为抗原表面决定蛋白 OA3、整合素相关蛋白 (IAP) 和蛋白 MER6,为 5 次跨膜蛋白, 属于免疫球蛋白超家族, 其 N 端胞外区包含 1 个 Ig 样 V 型 (免疫球蛋白样) 结构域。CD47 广泛分布于各种组织中, 通过与信号调节蛋白 α (Signal regulatory α , SIRP α), 血小板反应蛋白 (thrombospondin-1, TSP1) 以及整合素 (Integrins) 相互作用, 影响细胞凋亡, 增殖, 免疫等一系列生理功能。

2. 产品介绍

科佰生物推出 CD47/PD-L1 Dual Target Cell 报告基因细胞, 将 PDL1、CD47 一起构建到母细胞上, 稳定表达人 PDL1(Programmed Cell Death 1 Ligand 1, CD274, B7 homolog 1 (B7-H1), GenBank accession #NM_014143) 和 CD47(Rh-associated protein, GP42, integrin-associated protein (IAP), and neurophilin)。

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。

SIRP α &PD-1 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 SIRP α &PD-1 的信号转导过程, 原理见图 1 所示。

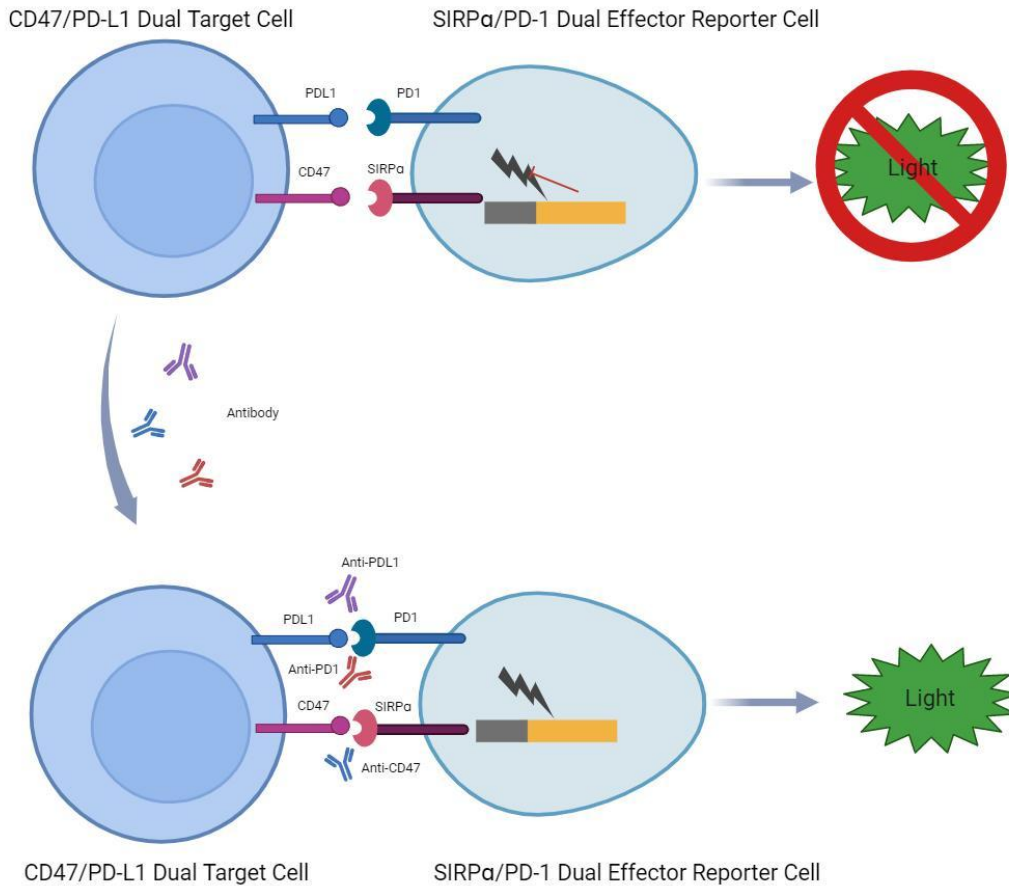


图 1: SIRPα&PD-1 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: CD47,PDL1

别名: Rh-associated protein, GP42, integrin-associated protein (IAP), and neuropilin, Programmed Cell Death 1 Ligand 1, PDL1, PD-L1, B7 homolog 1, B7H1, B7-H1, CD274, PDCD1L1

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+200ug/ml hygromycin

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 SIRPα&PD-1 信号传导的激活剂或抑制剂的活性检测, 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
CD47/PD-L1 Dual Target Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74155M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
SIRP α /PD-1 Dual Effector Reporter Cell 细胞	Cobioer	CBP74154
Anti-PD1 mAb	Cobioer	CBP74018A
Anti-SIRP α mAb	Cobioer	CBP74122A
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 CD47/PD-L1 Dual Target 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

6.1 SIRP α &PD-1 Blockade Assay

SIRP α &PD-1 Blockade Assay 由报告细胞 SIRP α /PD-1 Dual Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74154 细胞和靶细胞 CD47/PD-L1 Dual Target Cell, Cat. #CBP74155 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-PD1 mAb, Cat.#CBP74018A 和 Anti-CD47 mAb, Cat.#CBP74124A 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证(我们分别验证了单独 Anti-PD1 mAb 作用、单独 Anti-CD47 mAb 作用和 Anti-PD1 mAb、Anti-CD47 mAb 共作用的结果)。

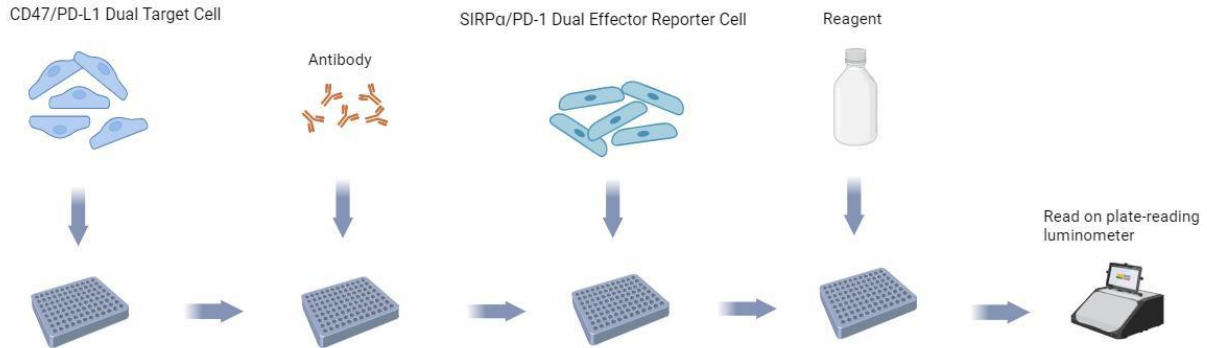


图 2: SIRP α &PD-1 Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 CD47/PD-L1 Dual Target Cell 细胞离心弃上清，重悬于新鲜的含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基中，将重悬的细胞密度调整为 2×10^6 cells/ml，然后将细胞加入步骤 3 的 96 孔板中，每孔 40 μl 。
- 2) 用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基对测试样本进行梯度稀释，加入梯度稀释的 5*浓度样品 (20 μl /孔) 到接种好细胞的 96 孔板中，样本从最高浓度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5*浓度) 开始，3 倍稀释 10 个浓度梯度，并另外设置空白培养基对照孔, 37°C 培养箱 1 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)

- 3) 取对数期生长的 SIRPα/PD-1 Dual Effector Reporter Cell 细胞离心弃上清，重悬于新鲜的 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中，将重悬的细胞密度调整为 1×10^6 cells/ml。
- 4) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中，40 ul/孔细胞悬液，放置 37°C 培养箱中继续培养 4.5 小时。
- 5) 将 Nano-Glo® Live Cell Assay System 中的 Nano-Glo® Live Cell Substrate 用 Nano-Glo® LCS Dilution Buffer 稀释 20 倍，配制成 5*检测液。
- 6) 将步骤 4) 的 96 孔板从培养箱中取出，加入 25ul/孔 步骤 5) 中配制的 5*检测液，然后剧烈震荡 15 到 30 秒，然后放置 10 到 20 分钟放入酶标仪中读取数值。
- 7) 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。

孔板排布：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer
B	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
C	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
D	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
E	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
F	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
G	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
H	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer

图 3: 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

Dose response of Blocking Antibodies in SIRP α /PD-1 Dual Effector Reporter Cells (C18) With CD47/PD-L1 Dual Target Cells

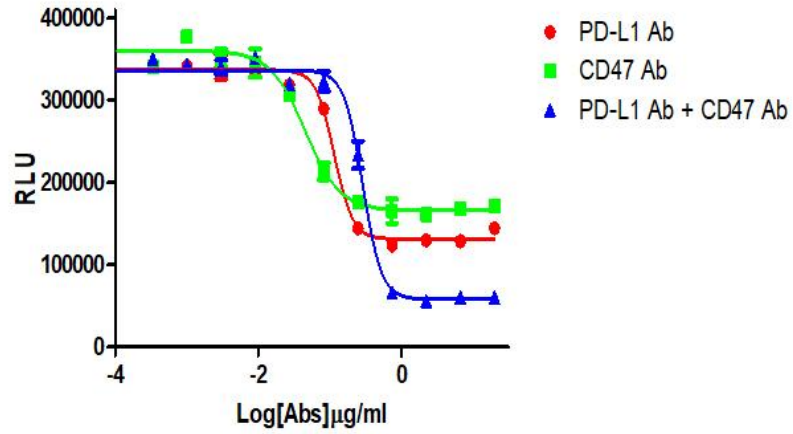


图 4: SIRP α &PD-1 Blockade Assay 验证结果

8. 相关产品

名称	货号
PD1/TIGIT Dual Effector Reporter Cell	CBP74126
PD1-IL2 Pathway Effector Reporter Cell	CBP74144
PDL1/aAPC/Raji	CBP74145
PDL1/TCR Activator/CHO	CBP74066
PDL2/TCR Activator/CHO	CBP74065
PDL1/HEK293	CBP74001
PDL1/CHO	CBP74032
PDL1/Raji	CBP74095
PDL2/CHO	CBP74064
PD1/HEK293	CBP74042
PD1/CHO	CBP74043
PD1/CTLA4 Dual Effector Reporter Cell	CBP74150
PDL1/CD80&CD86 aAPC Cells	CBP74151
PD1/LAG3 Dual Effector Reporter Cell	CBP74147

PD1/NFAT-Luc/Jurkat	CBP74018
PDL1/MHCII APC Cell	CBP74146
PD1/41BB Dual Effector Reporter Cell	CBP74172
PD1/OX40 Dual Effector Reporter Cell	CBP74163
PDL1 aAPC Cell	CBP74164
SIRP α /PD-1 Dual Effector Reporter Cell	CBP74154
CD47/PD-L1 Dual Target Cell	CBP74155
CD80/PDL1/TCR Activator/CHO	CBP74129