

LAG3/NFAT-Luc/Jurkat

CBP74060

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	2
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	3
6. 细胞实验流程	3
6.1 LAG3 Inhibitory Assay	3
7. 数据展示	5
8. 相关产品	7

1. 背景信息

LAG-3 又名 CD223 是一种免疫检查点受体蛋白，主要表达在活化的 T 细胞、NK 细胞、B 细胞和浆细胞样树突细胞。研究表明，通过与 MHC II 分子的结合，LAG3 可降低 T 细胞的活性；与此同时，LAG3 还可增强调节性 T 细胞(Treg)的抑制作用。使用治疗性抗体阻断 LAG3，可解除对 T 细胞的抑制，增强 T 细胞的免疫应答反应，因此针对其开发的抗体药物已经成为继 CTLA-4、PD-1/L1 后第三种进入临床的免疫检查点靶点抑制剂。

2. 产品介绍

科佰生物推出 LAG3/NFAT-Luc/Jurkat 报告基因细胞，在由 NFAT 调控并表达 Luc 荧光素酶报告基因的 Jurkat 重组细胞 NFAT-Luc/Jurkat 上，稳定表达人 LAG3。见图 1 流式验证 LAG3 表达。

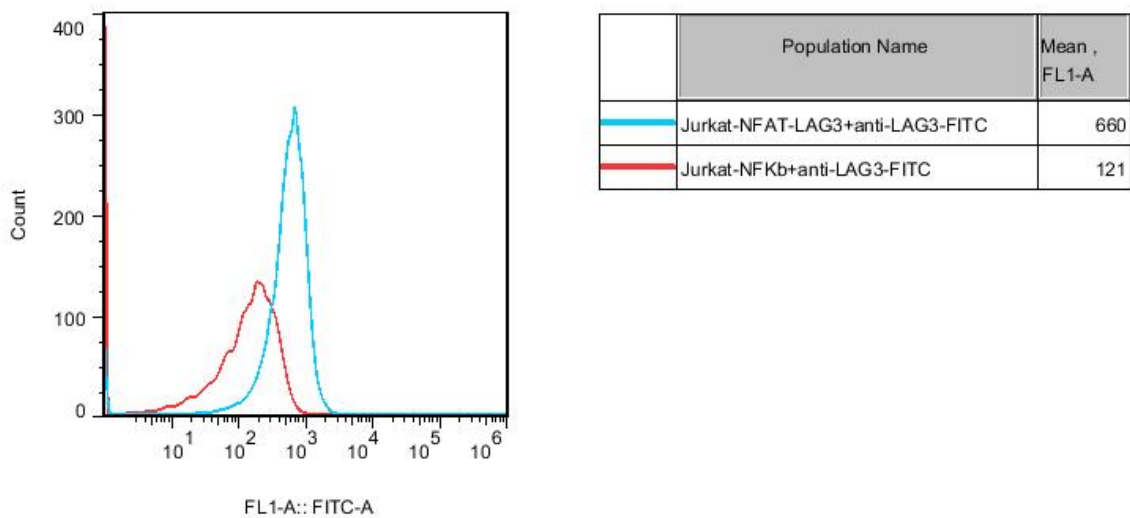


图 1: LAG3/NFAT-Luc/Jurkat 细胞表达人 LAG3

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。

LAG3/NFAT-Luc/Jurkat 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 LAG3 的信号转导过程，原理见图 2 所示。

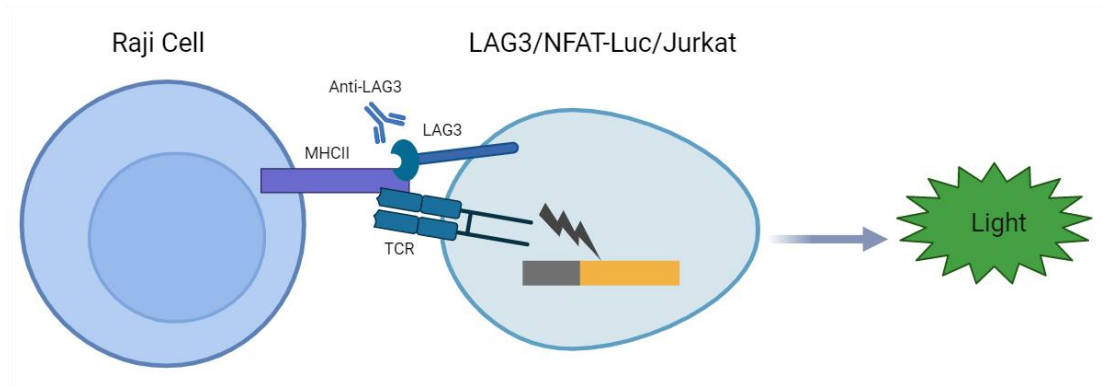


图 2: LAG3/NFAT-Luc/Jurkat 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

母细胞: Jurkat

表达基因: LAG3,NFAT-Luc

别名: CD223

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+1ug/ml puromycin+400ug/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 LAG3 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
LAG3/NFAT-Luc/Jurkat 完全培养基	Cobioer	CBP74060M
Superantigen (SEE)	Toxin Technology	ET404
Raji 细胞	ATCC	CCL-86
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089

Anti-LAG3 mAb	Cobioer	CBP74079A
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 LAG3/NFAT-Luc/Jurkat 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 1×10^5 - 1×10^6 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 LAG3 Inhibitory Assay

LAG3 Inhibitory Assay 由报告细胞 LAG3/NFAT-Luc/Jurkat, Cat. #CBP74060 开展，本实验中

使用 Anti-LAG3 mAb 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

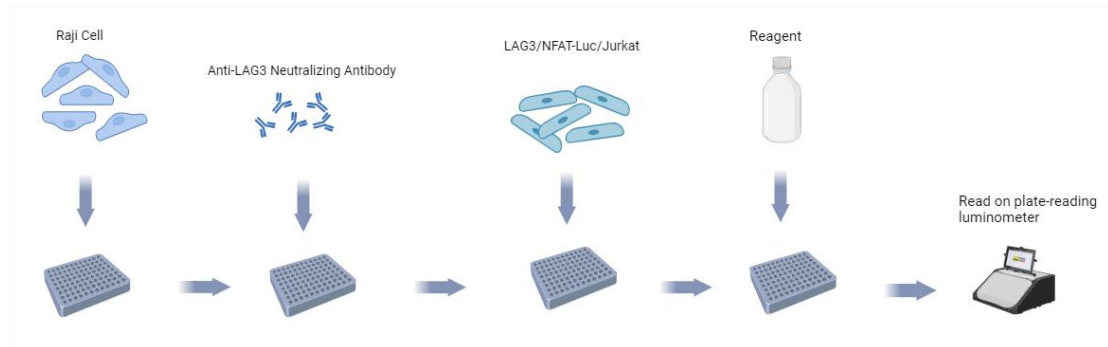


图 3: LAG3 Inhibitory Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 Raji 细胞，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 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 并加入 SEE, SEE 浓度为 0.025 ng/ml, 37 度培养箱放置 1 小时。
(备注: SEE 浓度由于厂家和批次差异, 浓度可能需要优化, 但通常其浓度范围在 0.025 至 0.25 ng/ml 之间, 如需优化请在此浓度范围中进行优化)
- 2) 取对数生长的 LAG3/NFAT-Luc/Jurkat 细胞，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 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 并将其接种到白壁的 96 孔细胞培养板中，40ul/孔。
- 3) 用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基对待测样品进行梯度稀释, 配制 5*浓度样品梯度溶液, 加入稀释的 5*浓度样品梯度稀释溶液 (20 ul/孔) 到接种步骤 2) 好细胞的 96 孔板中, 并另外设置空白培养基对照孔, 继续在 37 度细胞培养箱培养 60 分钟。(备注: 样品的最高浓度及稀释倍数, 实验者可根据实际的样品情况及实验需求设定并优化)
- 4) 取步骤 1) 中放置的 Raji 细胞加入步骤 3 的 96 孔板中, 每孔 40 ul, 放置 37 度培养箱中继续培养 5.5 到 6 小时。
- 5) 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。
- 6) 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。

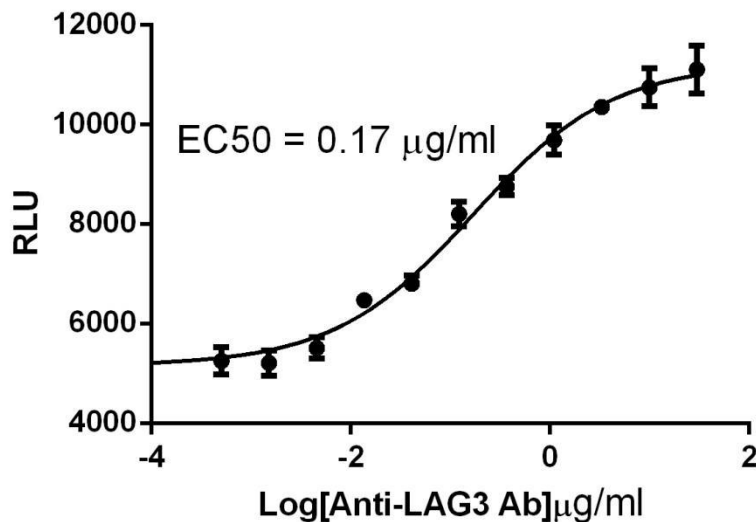
孔板排布:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	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 4: 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

Dose Response of Anti-LAG3 Neutralizing Antibody in LAG3/NFAT Reporter-Jurkat cells



Assay specifics: E:T ratio = 1:1; Raji cells as target cells;
SEE Con = 0.01 ng/ml

图 5: LAG3 Inhibitory Assay 验证结果

8. 相关产品

名称	货号
PD1/LAG3 Dual Effector Reporter Cell	CBP74147
LAG3/NFAT-Luc/Jurkat	CBP74060
LAG3/IL-2-Luc/Jurkat	CBP74079
LAG3/HEK293	CBP74051
LAG3/CHO	CBP74052