

PD1/LAG3 Dual Effector Reporter Cell

CBP74147

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	3
4. 主要仪器试剂耗材	4
5. 细胞培养	4
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	5
6.1 PD1&LAG3 Blockade Assay	5
7. 数据展示	7
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。

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。

研究表明在 T 细胞耗竭的肿瘤免疫微环境中, 经常可以发现 LAG-3 与 PD-1 共表达, 并且在 PD-1 抗体耐药的肿瘤浸润 T 细胞中 LAG3 表达显著高于不耐药的肿瘤浸润 T 细胞, 而在小鼠模型上同时阻断 LAG3 以及 PD-1/L1 两个靶点, 小鼠生存期更长, 肿瘤负荷更少, 因此提示人们同时抑制 LAG3&PD-1/L1 通路可能存在协同效应, 并且可能有助于克服 PD-1/L1 耐药。因此, 从目前公布的数据和临床实验方案来看, 在研的 LAG3 抑制剂多采用和 PD-1/L1 联合用药或者直接开发针对 PD1/L1 及 LAG3 的双抗药物。

2. 产品介绍

科佰生物推出 PD1/LAG3 Dual Effector Reporter Cell 报告基因细胞, 在由调控因子调控并表达报告基因的重组细胞上, 稳定表达人 PD1(Programmed Cell Death 1, PDCD1, SLEB2, CD279, GenBank Accession #NM_005018) 和 LAG3(lymphocyte-activation gene 3,CD223, GenBank Accession # NM_002286)。见图 1 流式验证 PD1 表达, 图 2 流式验证 LAG3 表达。

	Population Name	Mean , FL1-A
	PD-1 Dual Effector Reporter Cells	3.19E4
	Control Cells	192

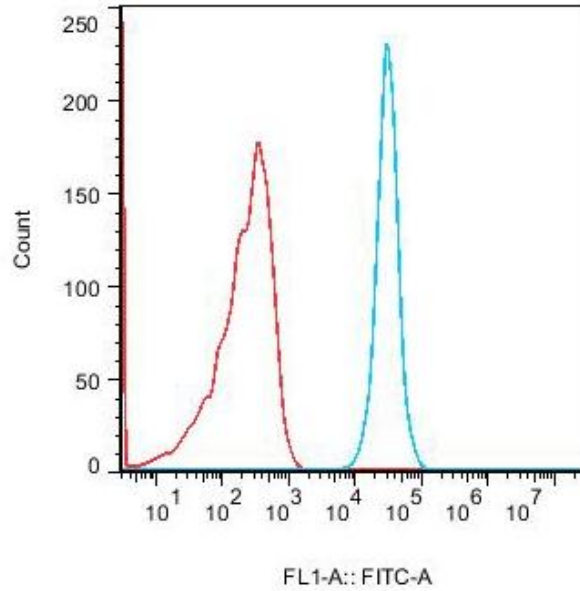




图 1: PD1/LAG3 Dual Effector Reporter Cell 细胞稳定表达人 PD1

	Population Name	Mean , FL1-A
	LAG3 Dual Effector Reporter Cells	942
	Control Cell	161

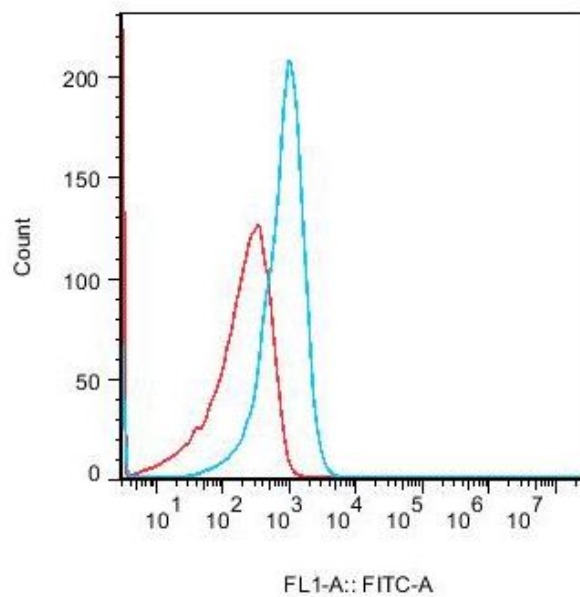


图 2: PD1/LAG3 Dual Effector Reporter Cell 细胞稳定表达人 LAG3

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。

PD1&LAG3 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 PD1&LAG3 的信号转导过程，原理见图 3 所示。

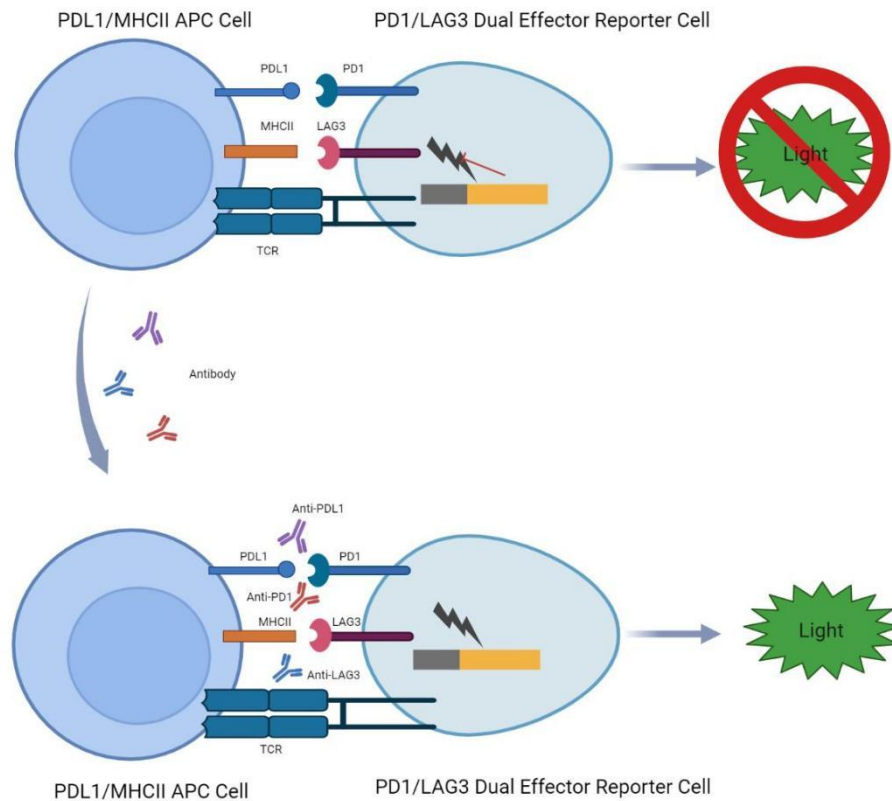


图 3: PD1&LAG3 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: PD1, LAG3

别名: Programmed cell death 1, PDCD1, PD-1, PD1, SLEB2, CD279, HPD-L, lymphocyte-activation gene 3, CD223

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+1ug/ml puromycin+800ug/ml hygromycin+10ug/ml blasticidin

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 PD1&LAG3 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
PD1/LAG3 Dual Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74147M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
PDL1/MHCII APC Cell 细胞	Cobioer	CBP74146
Anti-PD1 mAb	Cobioer	CBP74018A
Anti-LAG3 mAb	Cobioer	CBP74079A
Superantigen (SEE)	Toxin Technology	ET404
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 PD1/LAG3 Dual Effector Reporter 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 PD1&LAG3 Blockade Assay

PD1&LAG3 Blockade Assay 由报告细胞 PD1/LAG3 Dual Effector Reporter Cell，Cat. #CBP74147 细胞和靶细胞 PDL1/MHCII APC Cell，Cat. #CBP74146 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-PD1 mAb，Cat.#CBP74018A 和 Anti-LAG3 mAb，Cat.#CBP74079A 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-LAG3 mAb 作用和 Anti-PD1 mAb、Anti-LAG3 mAb 共作用的结果)。

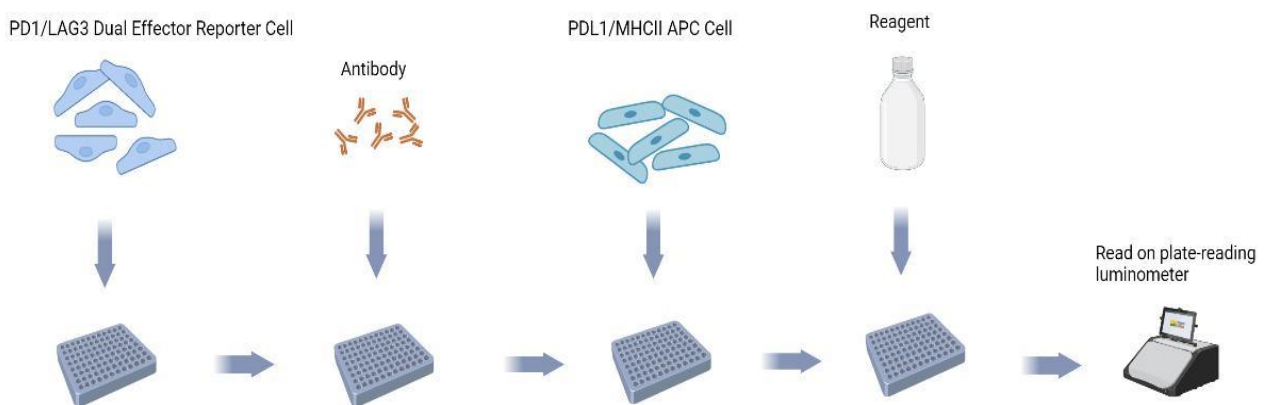


图 4: PD1&LAG3 Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 PDL1/MHCII APC Cell 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 1×10^6 /ml 并加入 SEE, SEE 浓度为 0.25 ng/ml, 37 度放置

- 1 小时。
- 2) 取对数生长的 PD1/LAG3 Dual Effector Reporter 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，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。
 - 3) 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 ul/孔）到接种好细胞的 96 孔板中，并另外设置空白培养基对照孔，继续在 37°C 细胞培养箱中培养 60 分钟。（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）
 - 4) 取步骤 1)中放置的 PDL1/MHCII APC Cell 细胞加入步骤 3)的 96 孔板中，每孔 40 ul，放置 37°C 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 100 ul/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	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 5: 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

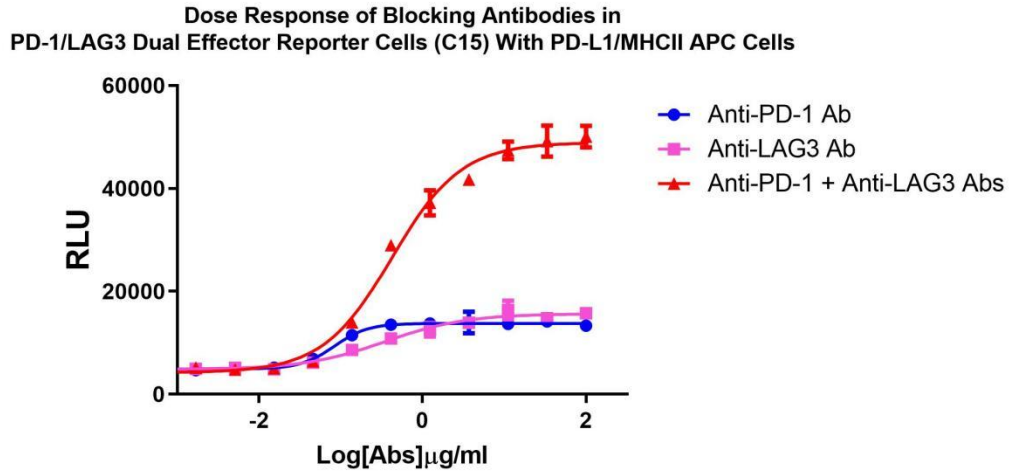


图 6: PD1&LAG3 Blockade Assay 验证结果

8. 相关产品

名称	货号
PDL1/MHCII APC Cell	CBP74146
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/TIGIT Dual Effector Reporter Cell	CBP74126
PDL1/CD155/TCR Activator/CHO	CBP74127
PD1/NFAT-Luc/Jurkat	CBP74018
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