

**PDL1/CD155/TCR  
Activator/CHO  
CBP74127  
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 .....	4
5.3 细胞冻存 .....	4
6. 细胞实验流程 .....	4
6.1 PD1&TIGIT Blockade Assay .....	4
7. 数据展示 .....	6
8. 相关产品 .....	6

## 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。

TIGIT 作为一个新的免疫检查点从功能确认到被广泛关注, 只有短短十余年的时间。它是一种在淋巴细胞上表达的免疫检查点受体, 通常在效应 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞、调节性 T 细胞和 NK 细胞上可观察到高水平的表达。TIGIT 有几种抑制淋巴细胞活化的不同作用机制: 首先, 它是一种与共刺激受体 CD226 作用完全相反的抑制性受体, 当 TIGIT 存在于淋巴细胞表面时, 与 CD226 相比, 它对其共同配体 CD155 的亲合力高于 CD226, 因此, TIGIT 将会竞争性的优先与 CD155 结合, 从而阻断 CD226 的共刺激效应; 其次, TIGIT 可以通过抑制 CD226 同源二聚体的形成, 阻断 CD226 信号; 此外, TIGIT 的胞质尾部含有一种基于酪氨酸的免疫受体抑制基序 (ITIM), 可能导致信号抑制, 部分证据表明这是 TIGIT 导致 T 细胞抑制的主要机制。

## 2. 产品介绍

科佰生物推出 PDL1/CD155/TCR Activator/CHO 报告基因细胞, 将 PDL1、CD155 和 TCR Activator 一起构建到 CHO 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 CD155(Poliiovirus receptor, Nectin-like protein 5, GenBank accession # NM\_006505)。

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

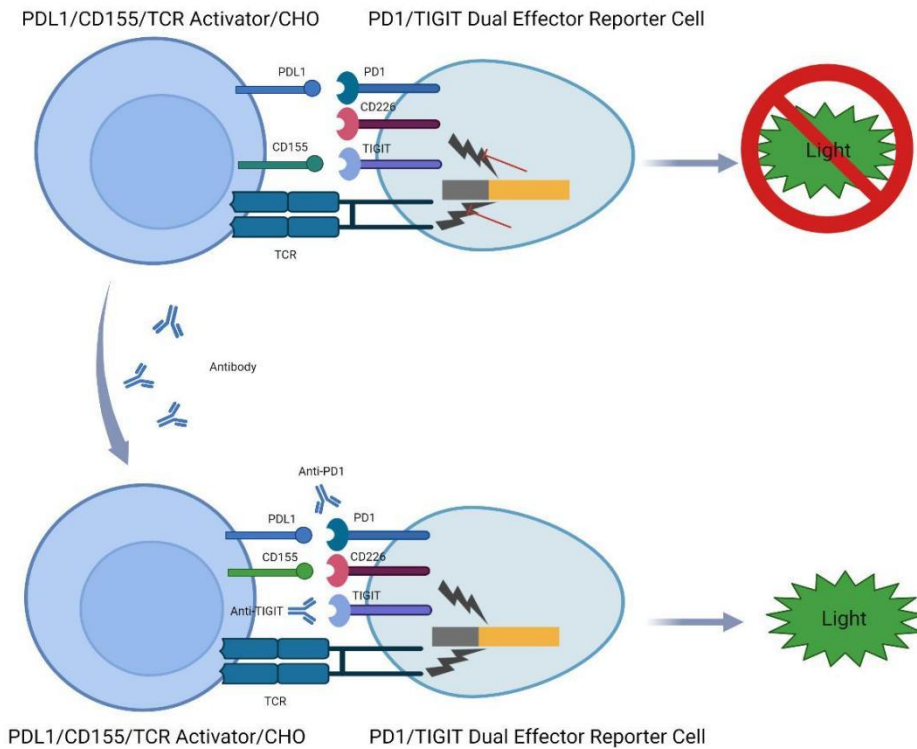


图 1: PD1&TIGIT 细胞模型原理图

### 3. 细胞基本信息

母细胞: CHO

表达基因: PDL1, CD155, TCR Activator

别名: Programmed cell death 1, PDCD1, PD-1, PD1, SLEB2, CD279, WUCAM, Vstm3, VSIG9,

Poliovirus receptor, Nectin-like protein 5

传代培养基: F12K+10%FBS+600ug/ml hygromycin+2ug/ml puromycin+5ug/ml blasticidin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 贴壁

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&TIGIT 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
PDL1/CD155/TCR Activator/CHO 完全培养基	Cobioer	CBP74127M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
PD1/TIGIT Dual Effector Reporter Cell 细胞	Cobioer	CBP74126
Anti-PD1 mAb	Cobioer	CBP74018A
Anti-TIGIT mAb	Cobioer	CBP74020A
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 PDL1/CD155/TCR Activator/CHO 完全培养基的 15ml 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) 加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。
- 4) 复苏 24-36 小时左右换液或传代，将未贴壁的死细胞去掉。

### 5.2 细胞传代

- 1) 当细胞密度符合传代要求时，PBS 清洗细胞，加入 1ml 胰酶，消化细胞传代。当 80%以上细胞培养瓶轻轻晃动能脱落时，加培养基终止消化，吹打成单细胞，吸入 15ml 离心

管，1000 转离心 5 分钟。

2) 离心后弃上清，加入新培养基吹打重悬细胞成单细胞，加入新的培养瓶中继续培养。

## 5.3 细胞冻存

每个 T75 或 10cm 培养皿的细胞消化离心后弃上清。加 2ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入 2 个细胞冻存管。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&TIGIT Blockade Assay

PD1&TIGIT Blockade Assay 由报告细胞 PD1/TIGIT Dual Effector Reporter Cell，Cat. #CBP74126 细胞和靶细胞 PDL1/CD155/TCR Activator/CHO，Cat. #CBP74127 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-PD1 mAb，Cat.#CBP74018A 和 Anti-TIGIT mAb，Cat.#CBP74020A 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-TIGIT mAb 作用和 Anti-PD1 mAb、Anti-TIGIT mAb 共作用的结果)。

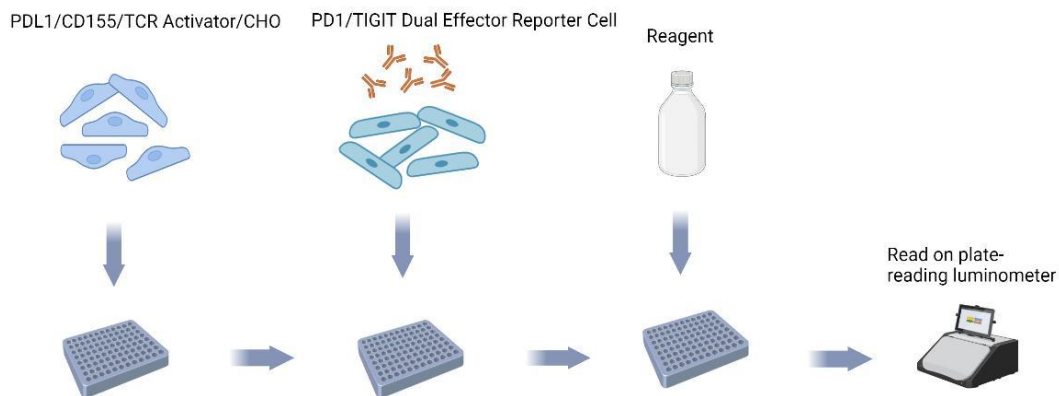


图 2: PD1&TIGIT Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 PDL1/CD155/TCR Activator/CHO 细胞，胰酶消化重悬于新鲜的含 10%FBS 的 F12K 培养基中，将重悬的细胞密度调整为  $4 \times 10^5$  cells/ml。
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中，100 ul/孔细胞悬液，37°C 培养箱培养过夜。

- 3) 第二天将接种 PDL1/CD155/TCR Activator/CHO 细胞的 96 孔板内 F12K 培养基吸干，另用 10%血清 RPMI1640 培养基对测试样本进行梯度稀释，加入梯度稀释的 2\*浓度样品（50 ul/孔）到接种好细胞的 96 孔板中，样本从最高浓度 100 ug/ml（2\*浓度）开始，5 倍稀释 11 个浓度梯度，并另外设置空白培养基对照孔。（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) 取对数期生长的 PD1/TIGIT 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  $4 \times 10^5$  cells/ml，然后将细胞加入步骤 3 的 96 孔板中，每孔 50 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 3: 96 孔板排布建议案例展示

## 7. 数据展示

Dose Response of Blocking Antibodies in PD-1/TIGIT Dual Effector Reporter Cells (Clone 7)  
With PD-L1&CD155 / TCR Activator - CHO Cells

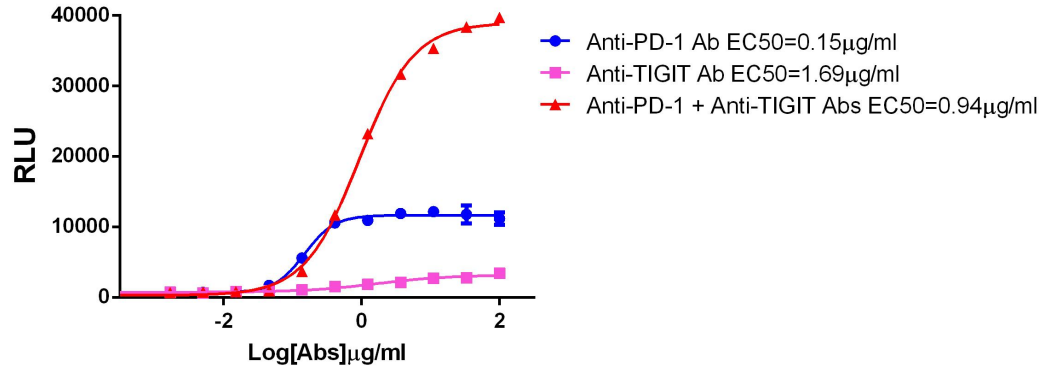


图 4: PD1&TIGIT Blockade Assay 验证结果

## 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 $\alpha$ /PD-1 Dual Effector Reporter Cell	CBP74154
CD47/PD-L1 Dual Target Cell	CBP74155
CD80/PDL1/TCR Activator/CHO	CBP74129