

SIRP α /PD-1 Dual Effector Reporter Cell

CBP74154

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 | 3 |
| 5.2 细胞传代 | 3 |
| 5.3 细胞冻存 | 4 |
| 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。

SIRP α 属于 SIRP 家族, 是一个抑制性的免疫受体, 它通常选择性的表达在髓系细胞(巨噬细胞, 粒细胞和树突细胞等)以及神经细胞的膜表面, 在其它体细胞上则较少有表达。作为一种跨膜蛋白, 其胞外区存在三种免疫球蛋白结构域, 其中 N 端氨基酸末端结构可与 CD47 结合介导细胞信号转导。

2. 产品介绍

科佰生物推出 SIRP α /PD-1 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 SIRP α (BIT, MFR, SIRP, CD172A, MYD-1, SHPS1, PTPNS1, GenBank Accession # NM_140885) 和 PD1(Programmed Cell Death 1, PDCD1, SLEB2, CD279, GenBank Accession #NM_005018)。

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。

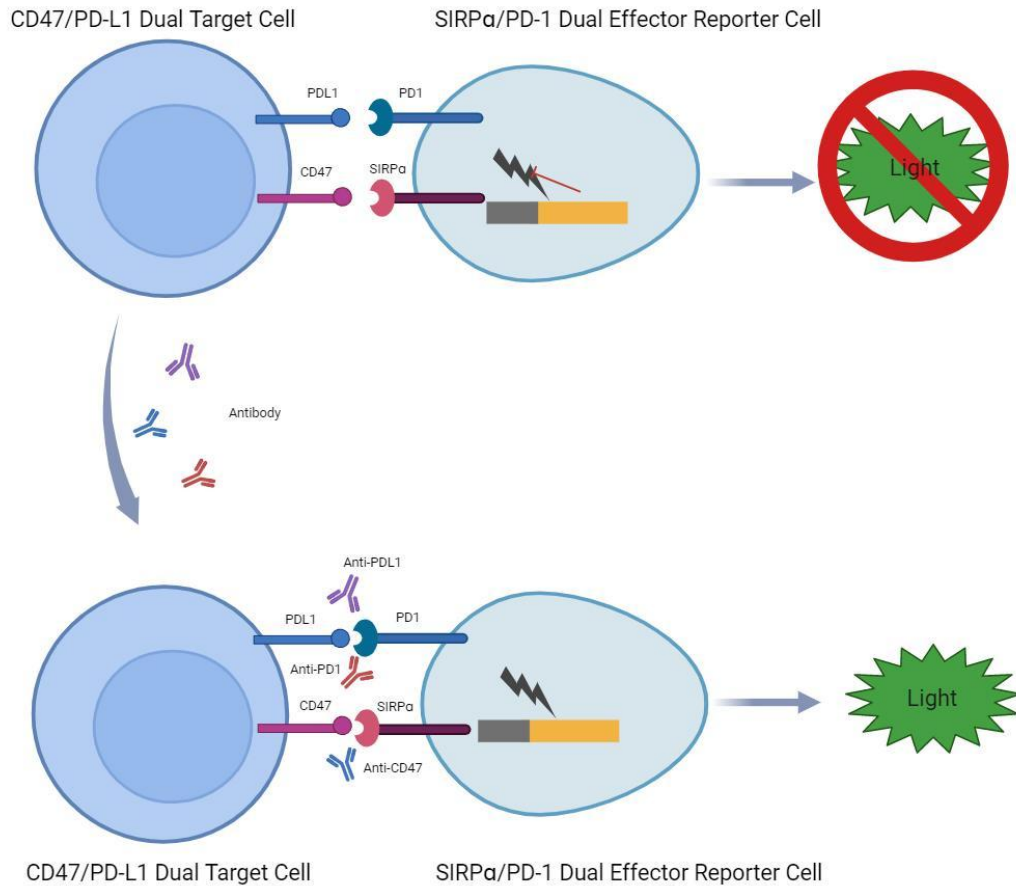


图 1: SIRPα/PD-1 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: SIRPα,PD1

别名: Programmed cell death 1, PDCD1, PD-1, PD1, SLEB2, CD279, BIT, MFR, SIRP, CD172A, MYD-1, SHPS1, PTPNS1

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+2ug/ml puromycin+5ug/ml blasticidin+ 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 |
|--|---------|-----------|
| SIRP α /PD-1 Dual Effector Reporter Cell 完全培养基 | Cobioer | CBP74154M |
| 细胞冻存液 | Cobioer | CBP50089 |
| CD47/PD-L1 Dual Target Cell 细胞 | Cobioer | CBP74155 |
| Anti-PD1 mAb | Cobioer | CBP74018A |
| Anti-CD47 mAb | Cobioer | CBP74124A |
| Nano-Glo [®] Live Cell Assay System | / | / |
| 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 SIRP α /PD-1 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 x 10⁵ 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 1x 10⁶ 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 1x 10⁵ - 1x 10⁶ 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)。

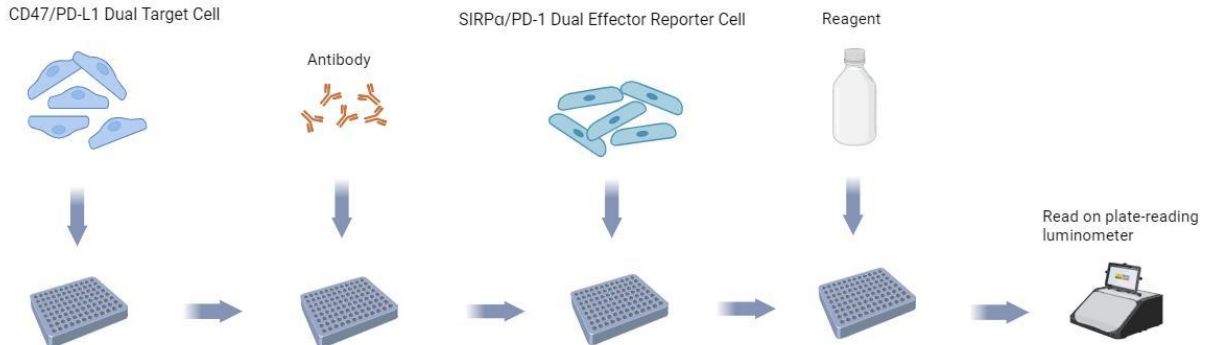


图 2: SIRP α &PD-1 Blockade Assay 流程示意图

- 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

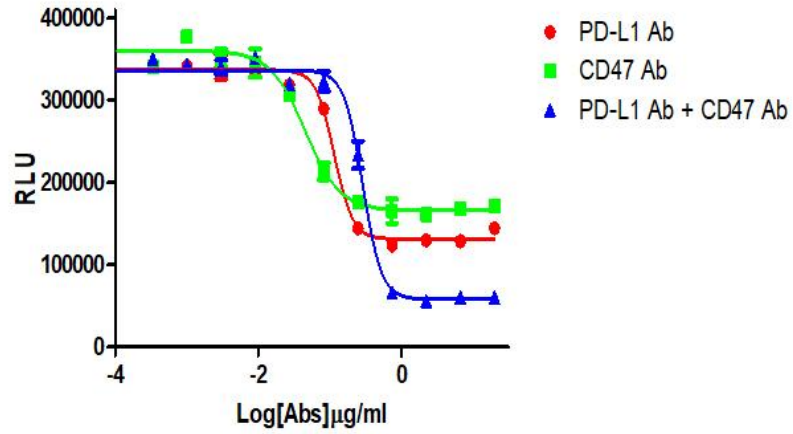


图 4: SIRP α &PD-1 Blockade Assay 验证结果

8. 相关产品

| 名称 | 货号 |
|--|----------|
| PDL1/CD155/TCR Activator/CHO | CBP74127 |
| 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 |