

TIGIT/NFAT-Luc/Jurkat

CBP74020

操作说明书



4008-750-250

目录

1. 背景信息	2
2. 产品介绍	2
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	4
5.3 细胞冻存	5
6. 细胞实验流程	5
6.1 TIGIT/CD155 Blockade Assay	5
7. 数据展示	7
8. 相关产品	7

1. 背景信息

TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain, 也称为 WUCAM, Vstm3, VSIG9) 是 Ig 超家族的一种受体, 在限制适应性和固有免疫方面起着关键作用。由细胞外免疫球蛋白可变区 (IgV) 结构域, 1 型跨膜结构域和具有经典免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM) 和免疫球蛋白酪氨酸尾 (ITT) 基序的细胞内结构域组成。TIGIT 一般在淋巴细胞中表达, 特别是在活化的 CD8+T 和 CD4+T 细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、调节性 T 细胞 (Tregs) 和滤泡辅助性 T 细胞表达。TIGIT 参与了一个复杂的调控网络, 涉及多个 IRs (例如, CD96/TACTILE, CD112R/PVRIG)、一个竞争性共刺激受体 (DNAM-1/CD226) 和多个配体 (例如, CD155 (PVR/NECL-5), CD112 (Nectin-2/PVRL2))。

2. 产品介绍

科佰生物推出 TIGIT/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 TIGIT。见图 1 流式验证 TIGIT 表达。

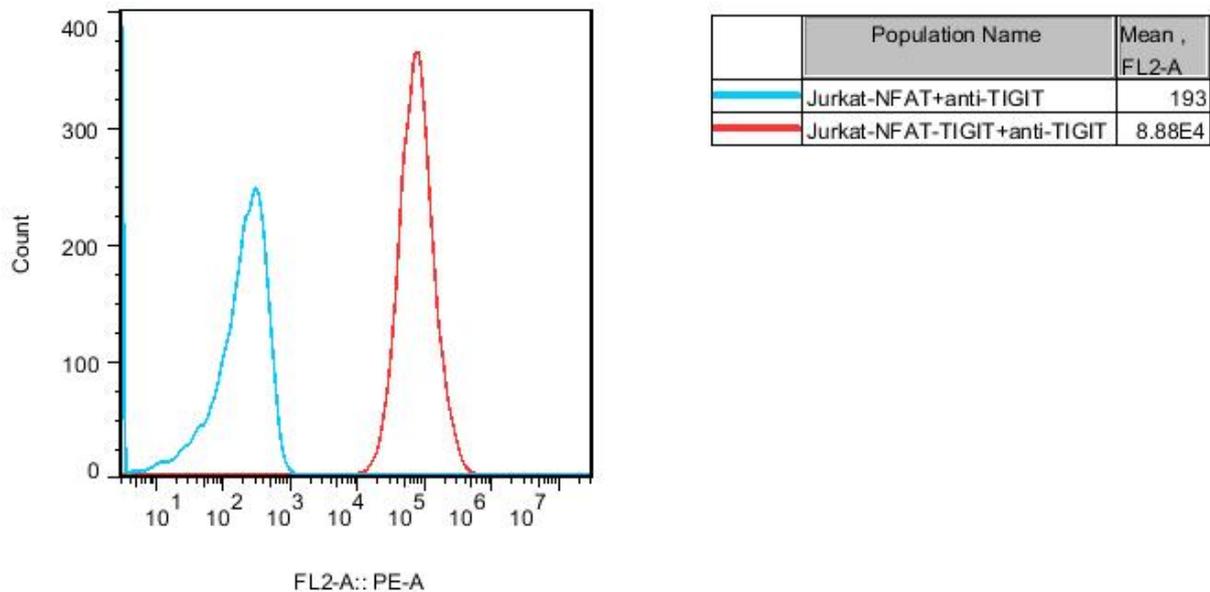


图 1: TIGIT/NFAT-Luc/Jurkat 细胞稳定表达人 TIGIT

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。

TIGIT/CD155 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 TIGIT/CD155 的信号转导过程，原理见图 2 所示。

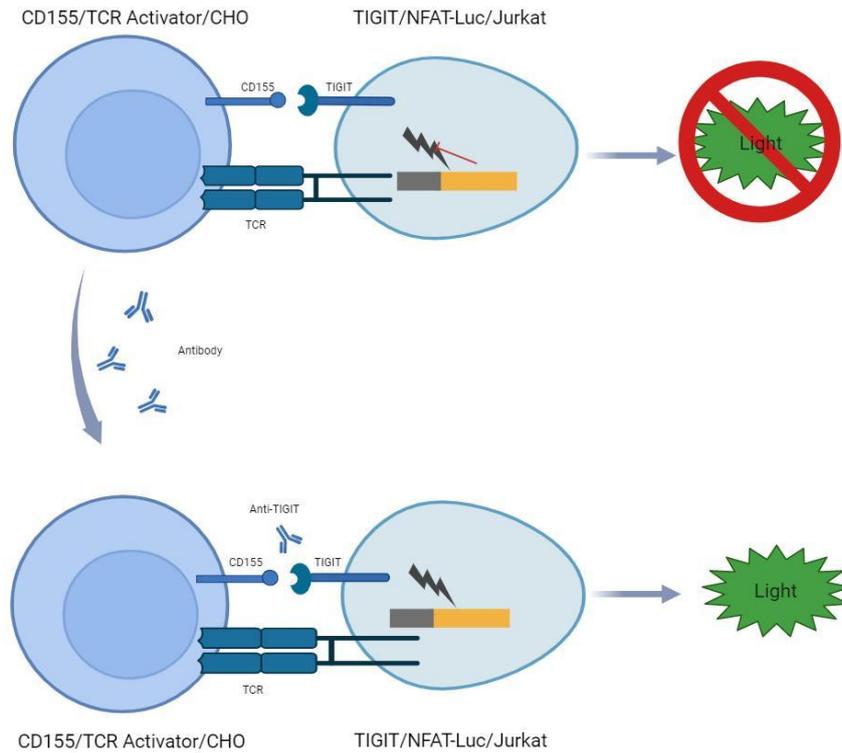


图 2: TIGIT/CD155 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

母细胞: Jurkat

表达基因: NFAT-Luciferase-TIGIT

别名: WUCAM, Vstm3, VSIG9

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

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 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
TIGIT/NFAT-Luc/Jurkat 完全培养基	Cobioer	CBP74020M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
CD155/TCR Activator/CHO 细胞	Cobioer	CBP74073
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 TIGIT/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 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 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 TIGIT/CD155 Blockade Assay

TIGIT/CD155 Blockade Assay 由报告细胞 TIGIT/NFAT-Luc/Jurkat, Cat. #CBP74020 细胞和靶细胞 CD155/TCR Activator/CHO, Cat. #CBP74073 细胞配对开展,本实验中使用 Anti-TIGIT mAb, Cat.#CBP74020A 作为测试样本,对本模型的生物功能进行验证。

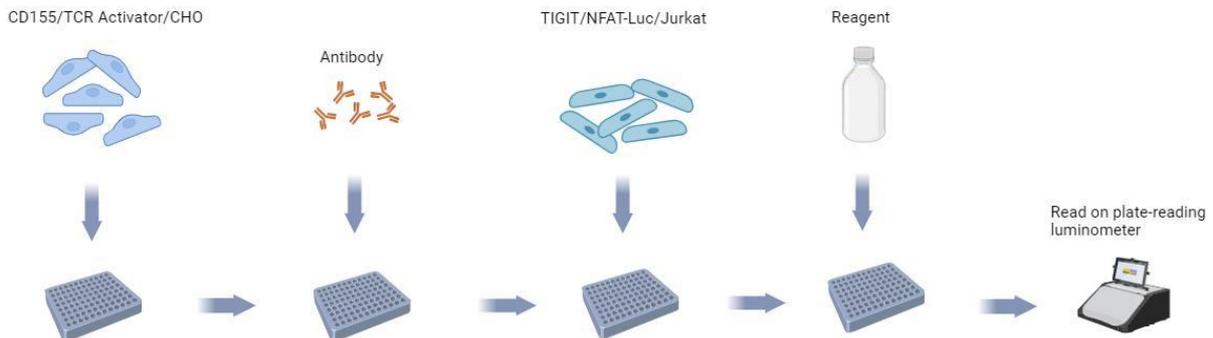


图 3: TIGIT/CD155 Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 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 4×10^5 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 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 60 ug/ml（2*浓度）开始，3 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 TIGIT/NFAT-Luc/Jurkat 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 4×10^5 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 4: 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

Dose response of anti-TIGIT neutralizing antibody in TIGIT / NFAT-Reporter Jurkat cell line (C26) with CD155 / TCR activator - CHO

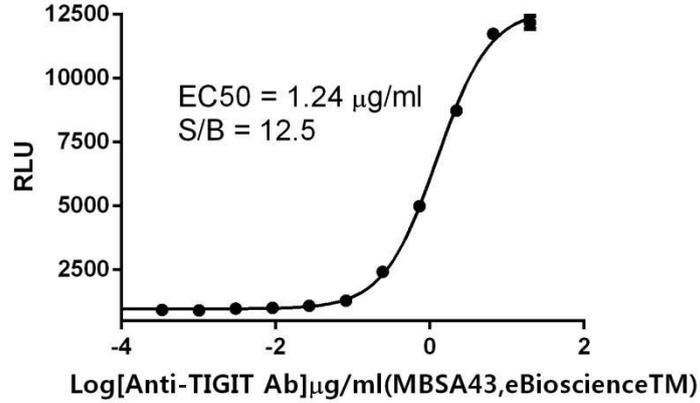


图 5: TIGIT/CD155 Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-TIGIT Ab)

8. 相关产品

名称	货号
PD1/TIGIT Dual Effector Reporter Cell	CBP74126
PDL1/CD155/TCR Activator/CHO	CBP74127
TIGIT/NFAT-Luc/Jurkat	CBP74020
CD155/TCR Activator/CHO	CBP74073
CD155/CHO	CBP74067
TIGIT/PVRIG Dual Effector Reporter Cell	CBP74167
CD112/CD155 Dual aAPC Cell	CBP74168