

TIM-3 Effector Reporter Cell

CBP74112

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 TIM-3 Bioassay	5
7. 数据展示	7
8. 相关产品	7

1. 背景信息

TIM-3 (CD366, HAVCR2) 是一种免疫检查点受体, 常表达于某些活化 T 细胞亚群上, 调节性 T 细胞 (Tregs)、巨噬细胞和树突状细胞上。临床前研究表明 TIM-3 信号调节 Th1 细胞因子反应, 其表达与自身免疫抵抗有关。尽管 TIM-3 的体内效应是明确的, 但在细胞水平上导致这些结果的机理尚不清楚。越来越多的文献表明 TIM-3 在 T 细胞活化中由于环境和细胞类型不同产生的作用比以前报道的要更复杂。在不同体外系统中, TIM-3 具有抑制或共刺激 T 细胞受体信号转导的能力。此外, TIM-3 配体及其相关功能的确定长期以来也一直是科学界激烈争论的话题。磷脂酰丝氨酸 (PS)、半乳糖凝集素-9、CEACAM-1 和其他被认为是 TIM-3 的多种配体, 给 TIM-3 信号通路的研究增加了另一层复杂性。

2. 产品介绍

科佰生物推出 TIM-3 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 TIM-3。

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。

TIM-3 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 TIM-3 的信号转导过程, 原理见图 1 所示。

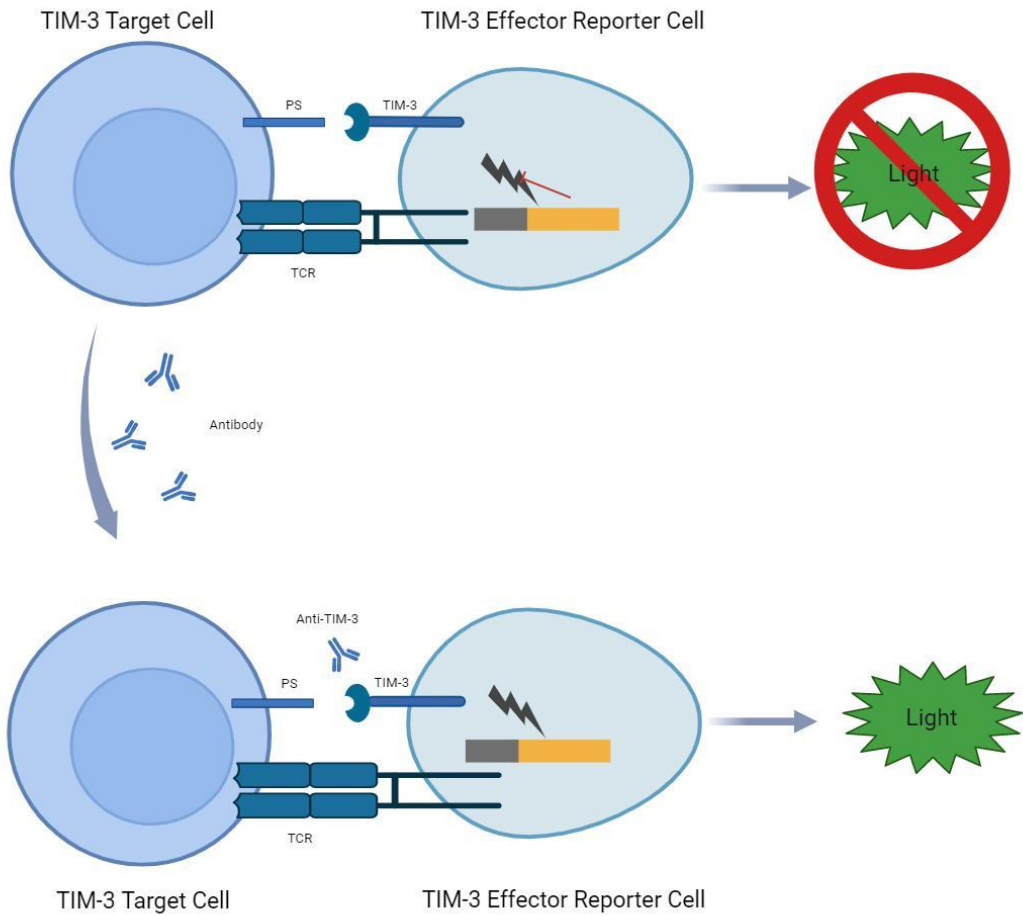


图 1: TIM-3 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: TIM-3

别名: CD366, HAVCR2

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+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 TIM-3 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
TIM-3 Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74112M
Raji 细胞	ATCC	CCL-86
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
Anti-TIM-3 mAb	Cobioer	CBP74112A
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 TIM-3 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 TIM-3 Bioassay

TIM-3 Bioassay 由报告细胞 TIM-3 Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74112 细胞和靶细胞 TIM-3 Target Cells 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-TIM-3 mAb, Cat.#CBP74112A 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

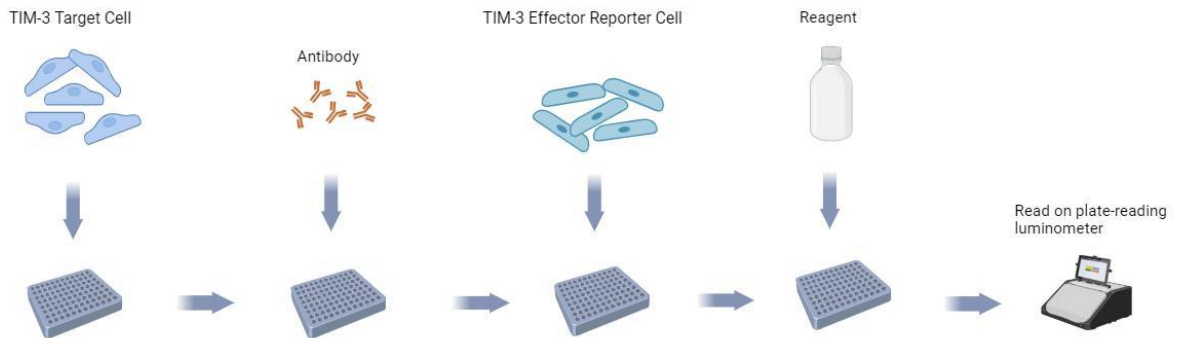


图 2: TIM-3 Bioassay 流程示意图

- 1) 取对数期生长的 TIM-3 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 2×10^6 cells/ml，然后将细胞加入步骤 3) 的 96 孔板中，每孔 40 ul。
- 2) 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 5*浓度样品 (20 ul/孔) 到接种好细胞的 96 孔板中，样本从最高浓度 50 ug/ml (5*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，37 度培养箱放置 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) 取对数生长的 TIM-3 Target Cells 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 2×10^6 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，37°C 培养箱 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 TIM-3 Antibody in TIM-3 Effector Reporter Cells With TIM-3 Target Cells

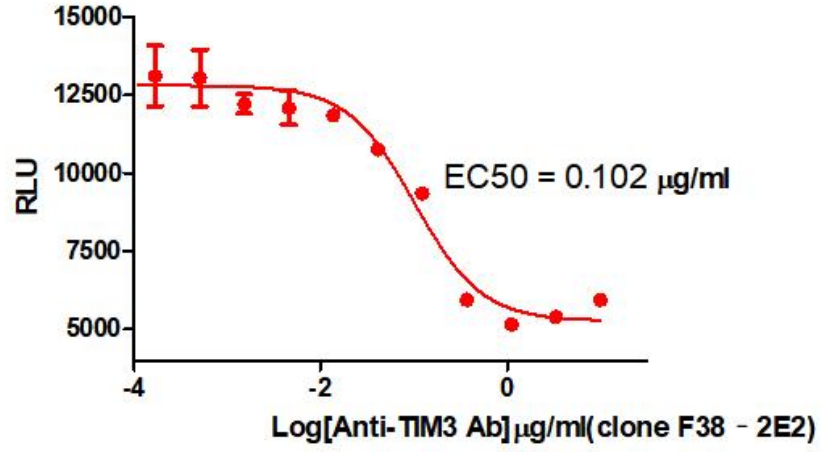


图 4: TIM-3 Bioassay 验证结果 (测试样本: Anti-TIM-3 Ab)

8. 相关产品

N/A