

# TMIGD2 Effector Reporter Cell

## CBP74202

## 操作说明书



4008-750-250

## 目录

1. 背景信息 .....	1
2. 产品介绍 .....	2
3. 细胞基本信息 .....	2
4. 主要仪器试剂耗材 .....	2
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 .....	3
6. 细胞实验流程 .....	3
6.1 TMIGD2/HHLA2(B7H7) Blockade Assay .....	3
7. 数据展示 .....	5
8. 相关产品 .....	5

## 1. 背景信息

HHLA2（也称为 B7H5、B7H7 或 B7y）是 B7 家族成员之一，与其他 B7 家族成员在氨基酸水平上具有 10-18%的同源性和 23-33%的相似性，在系统发育上与 B7x 和 B7H3 形成 B7 家族 III 组。HHLA2 于 1999 年首次被作为免疫球蛋白超家族的新成员而报道，其编码基因位于人类染色体 3q13.13 上，它是一种 I 型跨膜蛋白，含有 414 个氨基酸，由具有串联 IgV1-IgC-IgV2 结构域的细胞外部分、跨膜区和细胞质尾部组成。HHLA2 在不同物种中表达，但在小鼠和大鼠中不表达，这是其与 B7 家族的其他成员的不同之处。HHLA2 蛋白通常在抗原呈递细胞(APC)上表达，而在正常人体器官中表达有限。近年来，HHLA2 被发现在多种实体瘤和血液肿瘤中高度表达，并且，它的高表达与大多数肿瘤的预后较差呈正相关。但与之矛盾的是，也有一些研究表明，在某些肿瘤中 HHLA2 表达越高，病人的存活率越高。这种矛盾可以部分解释为 HHLA2 具有双重作用，在不同的免疫环境中存在不同的受体，与不同受体的结合导致其可以抑制或增强免疫细胞的功能。

TMIGD2 是 HHLA2 的第一个被发现的特异性受体，主要在幼稚的 T 细胞和 NK 细胞上表达，被激活后表达会迅速减少。TMIGD2 又被称为富含脯氨酸受体的免疫球蛋白

(immunoglobulin-containing and proline-rich receptor-1, IGPR-1)，相对分子量(Mr)为  $31 \times 10^7$ ，是与 CD28、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein4, CTLA-4)、诱导共刺激分子 (inducible co-stimulator, ICOS) 和程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 有 10%氨基酸相似性的膜蛋白，因此被命名为 CD28H。TMIGD2 定位于人染色体 19q13.3，和 CD28 家族其他成员一样，TMIGD2 是存在一个胞外 IgV 结构域、一个跨膜区和一个胞质尾的 Ig 总科成员之一。细胞外区域有两个可能的糖基化位点，胞质尾包含可被磷酸化的酪氨酸残基和与多重 SH3 信号分子相关的脯氨酸结构域。TMIGD2 表达于人类及灵长类动物中，而在鼠类中不表达。TMIGD2 在所有幼稚 T 细胞及多数自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)上均有表达，而在调节性 T 细胞(regulatory cell, Treg)及 B 细胞上不表达。TMIGD2 仅在约 50%的记忆 T 细胞上表达，TMIGD2 表达阴性的 T 细胞具有最终分化、衰老的表现，故而推测其在抗原递呈细胞上可能存在第二受体，但此第二受体目前尚未明确。TMIGD2 也在内皮细胞和上皮细胞表达，能促进细胞间相互作用，在细胞迁移及血管生成中起重要作用。

## 2. 产品介绍

科佰生物推出 TMIGD2 Effector Reporter Cell 报告基因细胞，在由因子调控并表达报告基因的重组细胞上，稳定表达人 TMIGD2。

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。

## 3. 细胞基本信息

表达基因: TMIGD2

传代培养基:

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 TMIGD2 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
TMIGD2 Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74202M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
HHLA2(B7H7) aAPC Cell 细胞	Cobioer	CBP74194
Anti-HHLA2 mAb	Cobioer	CBP74194A
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 TMIGD2 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% CO<sub>2</sub> 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  $1 \times 10^6$  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 TMIGD2/HHLA2(B7H7) Blockade Assay

TMIGD2/HHLA2(B7H7) Blockade Assay 由报告细胞 TMIGD2 Effector Reporter Cell，Cat. #CBP74202 细胞和靶细胞 HHLA2(B7H7) aAPC Cell，Cat. #CBP74194 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-HHLA2 mAb，Cat.#CBP74194A 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

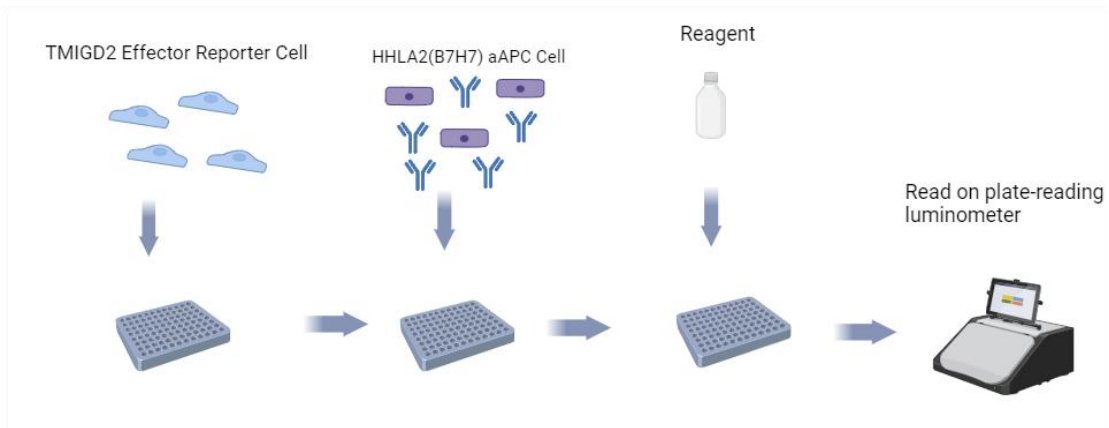


图 2: TMIGD2/HHLA2(B7H7) Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 HHLA2(B7H7) aAPC Cell 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  $2 \times 10^5$  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 HHLA2(B7H7) aAPC Cell 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，然后放置 37 度细胞培养箱 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）
- 4) 取对数期生长的 TMIGD2 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  $8 \times 10^5$  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 HHLA2 Blocking Abs in TMIGD2 Effector Reporter Cells (C1) With HHLA2(B7H7)/ aAPC Cells

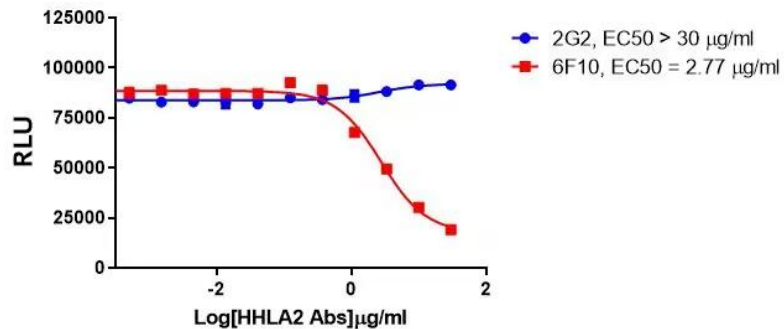


图 4: TMIGD2/HHLA2(B7H7) Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-HHLA2 Ab)

## 8. 相关产品

名称	货号
TMIGD2 Effector Reporter Cell	CBP74202
HHLA2(B7H7) aAPC Cell	CBP74194