

技术手册

H_LAG3 Reporter Blockade Assay

Genomeditech

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.1

目录

一、	产品基本信息及组分.....	3
二、	包装、运输及储存.....	3
三、	产品描述.....	4
四、	材料准备.....	5
	1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	5
	2. 试剂耗材准备.....	5
五、	细胞培养、复苏、冻存.....	6
	1. Jurkat 细胞复苏.....	6
	2. Jurkat 细胞传代.....	6
	3. Jurkat 细胞冻存.....	6
	1. Raji 细胞复苏.....	7
	2. Raji 细胞传代.....	7
	3. Raji 细胞冻存.....	7
六、	使用方法.....	8
	1. Assay 验证——Lag3 拮抗剂.....	8
	1) 细胞准备.....	8
	2) 加样步骤.....	8
	3) 报告基因检测.....	10
	4) 验证结果.....	10
附录 1:	传代稳定性.....	11
附录 2:	流式验证结果.....	11
使用许可协议:	12

一、产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-032AS012	H_LAG3 Reporter Blockade Assay	2 管 (5E6 Cell/mL)

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C20096	H_LAG3 Reporter Jurkat Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C
GM-C25385	Raji Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C

二、包装、运输及储存

1. 细胞系产品干冰运输，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
2. 接触产品请带手套。请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
3. 本产品相关 Assay，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

三、 产品描述

淋巴细胞活化基因-3(LAG-3; CD223)是一种表达在活化 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞以及 NK 和树突细胞亚群的细胞表面上的 I 型跨膜蛋白，LAG-3 与 CD4 密切相关，两种分子都具有 4 个细胞外 Ig 样结构域，但 LAG3 与 MHC II 具有更大的亲和力，较 CD4 高约 100 倍。传统观点认为，阻断 LAG-3 与 MHC II 之间的相互作用即可恢复 T 细胞活性。

吉满生物 H_LAG3 Reporter Blockade Assay 报告基因细胞系，是基于 Lag3 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。该细胞稳定表达 Lag3 基因、Luciferase 报告基因以及内源性表达 CD4。该细胞通过与 Raji Cell Line（内源性表达 MHC II 类分子）共培养，再加入 sAg 刺激 T 细胞信号，在 Lag3 的存在下阻断了 MHC II 类分子与 CD4 的结合，从而抑制了 T 细胞信号。通过加入 Anti-Lag3 Ab 后，阻断 Lag3 与 MHC II 类分子相互作用，恢复 T 细胞信号。因此，可用于研究 Lag3 相关拮抗剂药物。

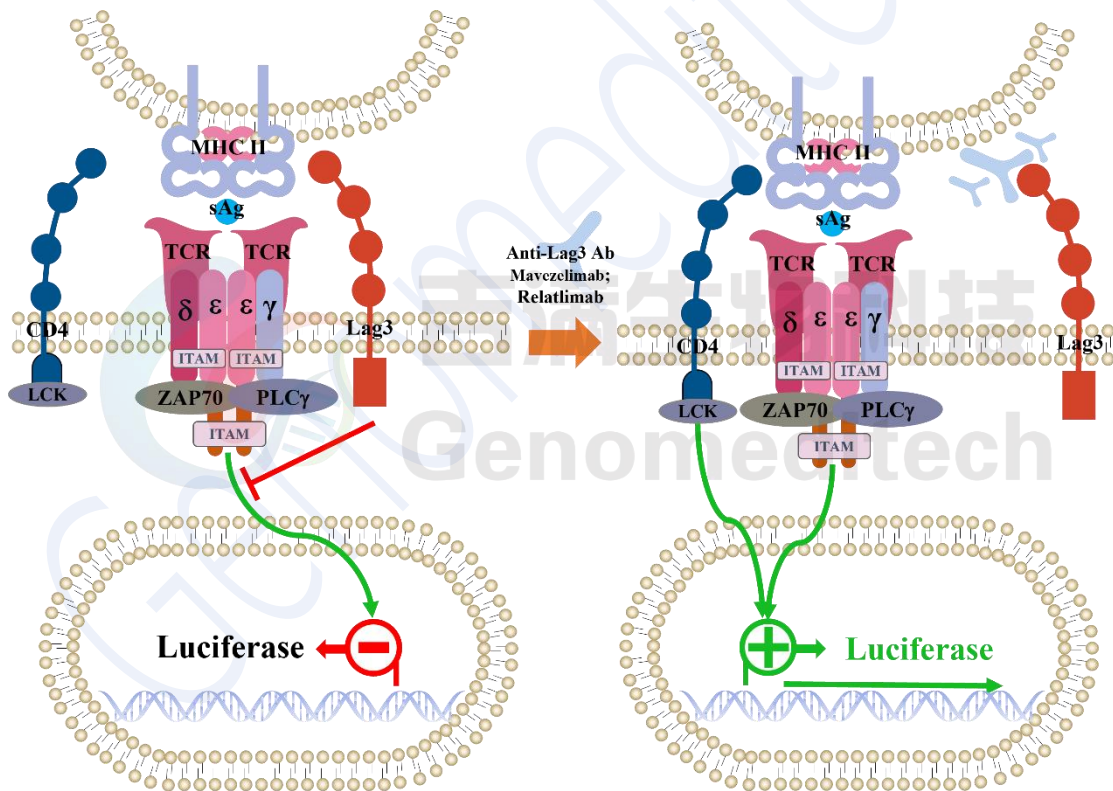


Fig 1. 原理示意图

四、 材料准备

1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

H_LAG3 Reporter Jurkat Cell Line

细胞复苏培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+3.5 µg/mL Blasticidin+400 µg/mL G418+0.75 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO

Raji Cell Line

细胞复苏培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO

Assay Buffer

RPMI 1640+1% FBS+1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
G418 Sulfate	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
金黄色葡萄球菌肠毒素 (SEE 肠毒素)	1 µg	Genomeditech/GM-H23036
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell BIOSCIENCES/C3010-0500
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-Well	Corning/3894
96 Well round Well culture plate	96-Well	NEST/701001
96 Well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-Well	Corning/3912
Switch-On Reagent(1000X)	1 mL	Genomeditech/GM-041519
Anti-H_LAG3 hIgG4 Antibody(Mavezelimab)	/	Genomeditech/GM-28753AB
Anti-Lag3 hIgG4 Antibody(Relatlimab)	/	Genomeditech/GM-51650AB
Anti-H_CD4 hIgG1 Antibody(Tregalizumab)	/	Genomeditech/GM-28752AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

五、 细胞培养、复苏、冻存

1. Jurkat 细胞复苏

- 37°C水浴锅预热复苏培养基，加入预热后的复苏培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37°C恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下轻轻摇动解冻，直到刚刚融化（通常 2-3 分钟）。
- 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀， $176 \times g$ ，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 复苏培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $4-6 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL 悬液），竖瓶培养。

3. Jurkat 细胞冻存

- 使用 $176 \times g$ ，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中，-80°C下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

2. Jurkat 细胞传代

注：细胞复苏后的 1 至 2 代，使用复苏培养基，待细胞状态稳定后，再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 此细胞为淋巴细胞状，悬浮生长。
- 首次复苏后，约 48-72 h 可进行第一次传代，此次传代后细胞培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加复苏培养基，瓶体改为横向放置。
- 当细胞密度达到 $1.5-2 \times 10^6$ cells/mL，1 传 3，隔 2-3 天继续传代，不要让其密度超 2×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养。
- 该细胞为悬浮细胞，传代时推荐使用【半换液法】对细胞状态较为有利。传代时可以直接向培养瓶中添加生长培养基，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。

注意事项：

- 该细胞对密度较为敏感，培养、传代时请注意保持细胞密度在合适的范围。
- 首次传代时注意营养，不处理时务必隔天适当补加复苏培养基。

1. Raji 细胞复苏

- 37°C水浴锅预热复苏培养基，加入预热后的复苏培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37°C恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下轻轻摇动解冻，直到刚刚融化（通常 2-3 分钟）。
- 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀， $176 \times g$ ，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 复苏培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，活细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $2.5-4 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养瓶中，刚复苏时，瓶体竖向放置。

3. Raji 细胞冻存

- 使用 $176 \times g$ ，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中，-80°C下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

2. Raji 细胞传代

注：细胞复苏后，使用复苏培养基；待细胞状态稳定后，再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 细胞为淋巴母细胞样细胞。
- 首次复苏后，约 48-72 h 可进行第一次传代，此次传代后细胞培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加复苏培养基，瓶体改为横向放置。
- 当细胞密度达到 $1-1.2 \times 10^6$ cells/mL，1 传 3-1 传 4，2-3 天继续传代，不要让其密度超 1.5×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养。
- 该细胞为悬浮细胞，传代时推荐使用【半换液法】对细胞状态较为有利。传代时可以直接向培养瓶中添加生长培养基，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。

六、使用方法

1. Assay 验证——Lag3 拮抗剂

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_LAG3 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔，Raji Cell Line 细胞量为 2×10^4 cells/孔。本次实验使用 Anti-H_LAG3 hIgG4 Antibody(Mavezelimab) (以下简称为 Mavezelimab; 分子量: 150 kDa) 和 Anti-Lag3 hIgG4 Antibody(Relatlimab)(以下简称为 Relatlimab; 分子量: 150 kDa) 作为阳性拮抗剂。Mavezelimab、Relatlimab 起始终浓度(Conc.01)分别为 50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释。SEE 作为激活药物 (激活浓度使用 100 pg/mL)。

具体孔板排布如下:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
B	Mavezelimab	PBS	50 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	3.13 $\mu\text{g/mL}$	781.25 ng/mL	195.31 ng/mL	48.83 ng/mL	12.21 ng/mL	3.05 ng/mL	762.94 pg/mL	0	PBS
C	Relatlimab	PBS	100 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{g/mL}$	1.56 $\mu\text{g/mL}$	390.63 ng/mL	97.66 ng/mL	24.41 ng/mL	6.1 ng/mL	1.53 ng/mL	0	PBS
D	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E													
F													
G													
H													

1) 细胞准备

正式实验前 48 h，按照 1000:1 的体积比将 Switch-On Reagent 诱导剂加入 H_Lag3 Reporter Jurkat 细胞中，持续培养 48 h，用于激活 Lag3 表达。

2) 加样步骤

- 实验前 1-2 h，将诱导 48 h 的 H_LAG3 Reporter Jurkat 细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用 Assay Buffer 重悬，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 4×10^6 cells/mL。
- 实验前 1-2 h，将 Raji 细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用 Assay Buffer 重悬，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 8×10^5 cells/mL。以排枪加 25 μL 细胞/孔至中间孔 (B2-B11; C2-C11)。周围的孔加 100 μL PBS。盖上市盖。

- c) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- d) 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- e) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Mavezelimab	1 mg/mL	/	直接使用储液
Relatlimab	3.3 mg/mL	/	直接使用储液
SEE	10 µg/mL	1 µg/mL	取 2 µL 储液与 18 µL Assay Buffer 混匀

- f) 在 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 9.2 µL，加入次孔										对照孔			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12	
A															
B	7.4 µL Mavezelimab 加入		29.3 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL		
C	4.5 µL Relatlimab 加入		32.2 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL	27.5 µL		
D															
E															
F															
G															
H															

- g) 吸取不同体积的待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2 中加入 7.4 µL Mavezelimab）。
- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 9.2 µL 液体，加入到第二个梯度稀释孔中 B3，充分混匀。
- i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- j) 配置激活药物 SEE：取 1.59 µL 稀释后的母液 1 µg/mL 的 SEE，加入 3958.4 µL 的 Assay Buffer 混匀，得到 400 pg/mL 的 SEE。
- k) 将步骤 a 准备好的 H_Lag3 Reporter Jurkat 细胞，加入到步骤 i 梯度稀释好的抗体中，每孔 25 µL，孵育 30 min。
- l) 将步骤 j 配置好的 SEE，加入到步骤 b 准备好的 Raji 细胞孔板中，每孔 25 µL，孵育 30 min。
- m) 30 min 后，将步骤 l 细胞孔板中的液体每孔吸取 50 µL，加入到步骤 k 细胞孔板中（B2-B11; C2-C11）。

- n) 将混匀后的孔板盖板上板盖，于 37 °C CO₂ 培养箱中培养 16 h。
- o) 使用 GMOne-Step 报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

3) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_LAG3 Reporter Jurkat Cell line+Mavezelimab	100 pg/mL SEE + 0 μg/mL Ab	100 pg/mL SEE + 50 μg/mL Ab	100 pg/mL SEE + 762.94 pg/mL Ab
	12989	76921	9884
H_LAG3 Reporter Jurkat Cell line+Relatlimab	100 pg/mL SEE + 0 μg/mL Ab	100 pg/mL SEE + 100 μg/mL Ab	100 pg/mL SEE + 1.53 ng/mL Ab
	12181	79160	12760

4) 验证结果

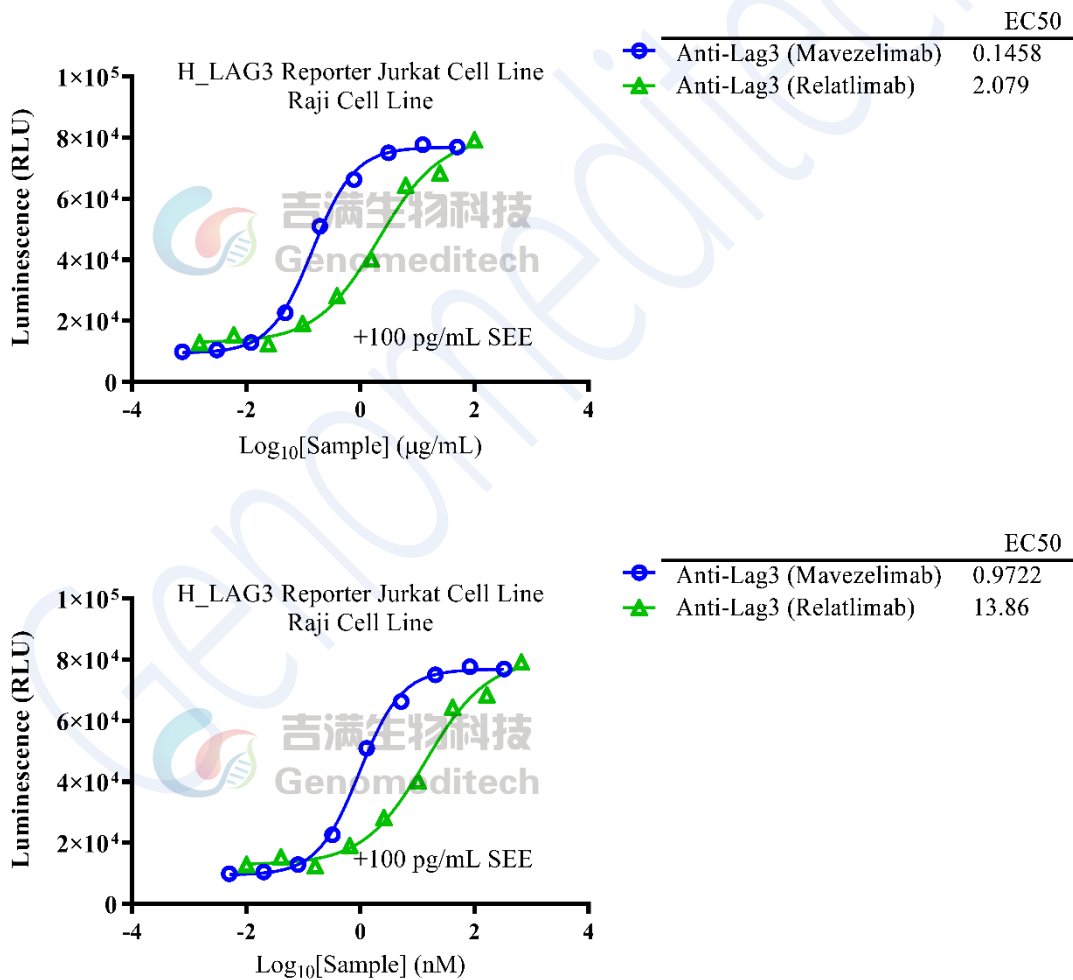


Fig 2.功能验证结果

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1: 传代稳定性

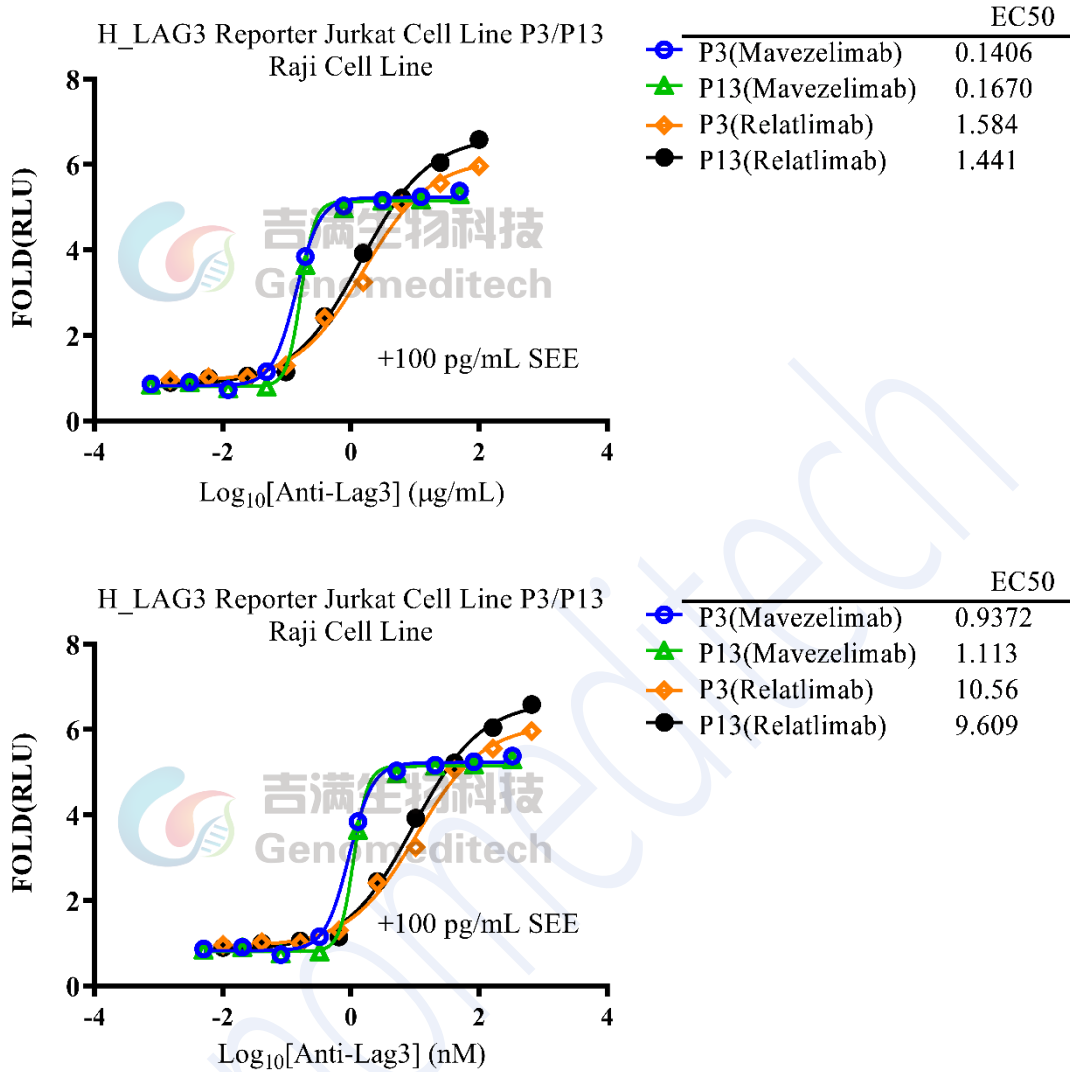


Fig 3. H_LAG3 Reporter Jurkat Cell Line 稳定性证结果 P3-P13

(下图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制；纵坐标 Luminescence 值换算为倍率)

附录 2: 流式验证结果

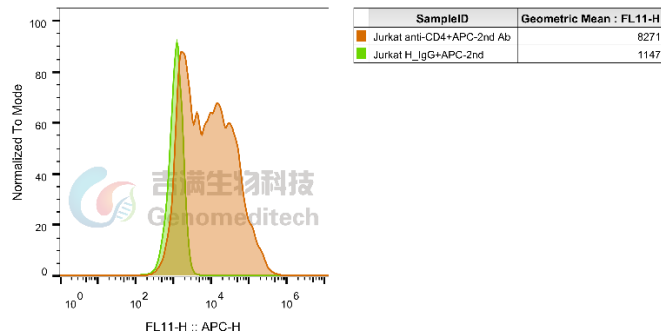


Fig 4. 流式验证结果显示 jurkat 母细胞本底表达 CD4

使用许可协议:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech