



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114045306 B

(45) 授权公告日 2024.03.19

(21) 申请号 202111328033.5

C12N 5/10 (2006.01)

(22) 申请日 2021.11.10

C12Q 1/66 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114045306 A

(56) 对比文件

CN 107384869 A, 2017.11.24

CN 102321732 A, 2012.01.18

(43) 申请公布日 2022.02.15

US 2018231523 A1, 2018.08.16

(73) 专利权人 上海市食品药品检验研究院

US 2019107537 A1, 2019.04.11

地址 200120 上海市浦东新区张衡路1500号

CA 3120103 A1, 2020.05.22

颜美平. 内皮细胞ICAM-1与SHP-2蛋白互作及其在急性肺损伤的作用.《中国博士学位论文全文数据库》.2017, (第12期), E063-7.

(72) 发明人 王盛 邵泓 陈钢 王灿 王自强 段徐华 郑璐侠

审查员 陈文丽

(74) 专利代理机构 上海申新律师事务所 31272 专利代理师 郎祺

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

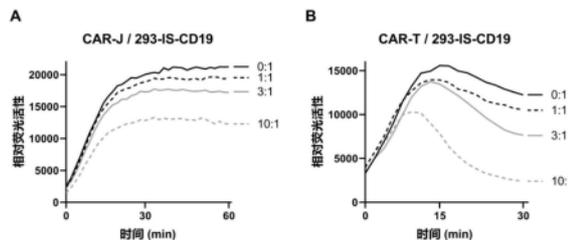
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

一种反映免疫突触相关信号蛋白的荧光素酶互补系统质粒和稳转细胞株及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种反映免疫突触相关信号蛋白的荧光素酶互补系统质粒和稳转细胞株及其在CAR修饰细胞生物学活性测定中的应用。该质粒包括含有ICAM-1基因序列和pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Nluc的质粒、含有SHP2基因序列和pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Cluc的质粒,以及含有CD19基因序列的质粒。该稳转细胞株为293-IS-CD19,其是通过将上述质粒转染至人胚胎肾细胞HEK-293细胞获得,稳定整合ICAM-1-Nluc与Cluc-SHP2报告基因以及CD19抗原。该细胞株可以实时反应免疫突触形成能力,测定过程简单,结果准确,可用于基于免疫突触形成能力的CAR修饰细胞生物学活性评估中,使得评估方法简单,耗时很短,检测费用低,测定结果的稳定性,可有利于生物学活性药物的质量控制和临床应用,具有较高的应用价值。



1. 一种反映免疫突触相关信号蛋白的荧光素酶互补系统质粒,其特征在于,由含有ICAM-1基因序列和pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Nluc的质粒、含有SHP2基因序列和pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Cluc的质粒,以及含有CD19基因序列的质粒组成;

所述含有ICAM-1基因序列和pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Nluc的质粒通过将如SEQ ID No. 1所示的序列通过酶切位点Kpn I、Xba I连接到pcDNA3.1载体上获得;

所述含有SHP2基因序列和pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Cluc的质粒通过将如SEQ ID No. 2所示的序列通过酶切位点Kpn I、Xba I连接到pcDNA3.1载体上获得;

所述CD19基因为人源CD19基因

所述含有CD19基因序列的质粒通过将CD19基因序列构建在pLV-Hygro载体上获得。

2. 一种如权利要求1所述的荧光素酶互补系统质粒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一,利用分子克隆技术依次将ICAM-1基因序列与pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Nluc通过FLAG tag与接头连接,并构建在载体上;

步骤二,利用分子克隆技术依次将pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Cluc与SHP2基因序列通过His tag与接头连接,并构建在载体上;

步骤三,利用分子克隆技术将CD19基因序列构建在pLV-Hygro载体上。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤一和步骤二中采用的接头为3×柔性linker Gly₄Ser。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤一采用的载体为pcDNA3.1载体或pLV-Neo载体。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤二采用的载体为pcDNA3.1载体或pLVX-Puro载体。

6. 一株稳转细胞株,其特征在于,为293-IS-CD19细胞株,其通过将如权利要求1所述的荧光素酶互补系统质粒转染至人胚胎肾细胞HEK-293细胞获得,稳定整合ICAM-1-Nluc与Cluc-SHP2报告基因以及CD19抗原。

7. 如权利要求6所述的稳转细胞株的构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一,利用慢病毒转染技术将如权利要求1所述的荧光素酶互补系统质粒转染入HEK-293细胞;

步骤二,在步骤一转染后的细胞中加入嘌呤霉素、遗传霉素以及潮霉素,经过加压筛选,富集阳性细胞,扩增并置于液氮介质中冻存。

8. 根据权利要求7所述的构建方法,其特征在于,所述嘌呤霉素的筛选浓度为2μg/mL,所述遗传霉素的筛选浓度为1mg/mL,所述潮霉素的筛选浓度为200μg/mL。

9. 一种基于免疫突触形成能力的CAR修饰细胞体外生物学活性评估方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一,将CAR修饰细胞加入已接种如权利要求6所述的稳转细胞株的孔板中进行共同孵育;

步骤二,迅速将化学发光底物D-luciferin加至孔板,室温震荡短时间后立即实时读取荧光值;

步骤三,通过信号差异评估基于免疫突触形成能力的CAR修饰细胞生物学活性高低。

10. 根据权利要求9所述的评估方法,其特征在于,所述CAR修饰细胞为CAR-J细胞或CAR-T细胞。

一种反映免疫突触相关信号蛋白的荧光素酶互补系统质粒和 稳转细胞株及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种反映免疫突触相关信号蛋白的荧光素酶互补系统质粒和稳转细胞株及其在CAR修饰细胞生物学活性测定中的应用。

背景技术

[0002] 近年来,细胞制品正逐渐发展成熟。细胞制品是以不同细胞为基础的用于疾病治疗的制剂、药物或产品的统称,是继小分子化学药物、大分子蛋白药物之后第三代药物,也被称为“活的药物”。目前市面上的细胞制品主要为传统体细胞,免疫细胞以及不同的干细胞等。细胞制品的体外生物学活性检测是评判细胞活性的重要指标。

[0003] 免疫细胞制品治疗中的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)T细胞免疫疗法(CAR-T疗法)是一种治疗肿瘤的新型精准靶向疗法,通过CAR-T细胞修复人体内在免疫缺陷,从而缓解甚至彻底治愈肿瘤疾病。CAR-T疗法作为目前国际上最先进的细胞免疫疗法,在美国已经被批准用于临床治疗,中国自2018年初也开始逐渐受理临床试验申请,国内两款来自复星医药和药明巨诺的CAR-T疗法先后于2021年前后申报上市。在不同效应细胞中表达的不同类型CARs显示出不同的CAR修饰细胞的有效性,这在临床试验前必须准确评估。传统的检测CAR修饰细胞介导的细胞毒性的方法都存在各自的缺陷,如体外直接杀伤活性检测方法中的同位素释放法、时间分辨荧光法以及报告基因转染法,存在着实验环境限制、信噪比低以及周期长等缺陷。间接杀伤活性检测主要有细胞因子释放法和细胞活力检测法,但也存在专属性差等缺陷。因此需要选择新的检测靶点,建立新的检测技术以便更快速地评估CAR修饰细胞的有效性。

[0004] 免疫突触是T细胞与靶细胞表面分子之间通过受体-配体相互作用得以紧密接触,形成了一个重要行使T细胞免疫学功能的精密结构。这一结构的形成有助于T细胞分辨潜在的抗原,提高了T细胞抗原受体与MHC-抗原肽复合物之间的亲和力,从而启动了T细胞的抗原识别和活化,有研究表明,只有形成免疫突触结构体的T细胞才能发生增殖。CAR-T作为一类经过基因修饰赋予免疫细胞特异性抗原受体的T细胞群体,亦能形成功能性免疫突触。近期相关研究显示CAR-T的免疫突触的形成质量可作为一种检测CAR-T的杀伤活性的指标,而目前只能借助免疫荧光技术通过评估免疫突触结构中效应细胞的F-actin、肿瘤抗原的聚集、溶解颗粒的极化和关键信号分子分布的平均荧光强度来定性分析。该方法只能在单个CAR修饰的细胞水平上研究,存在着样本分析通量低的缺陷,并且由于不同的免疫荧光信号参考标准可能导致结果很大的差异性。

[0005] 在传统的T细胞受体介导的免疫突触结构中,由效应细胞的淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)结合靶细胞的细胞内粘附受体1(ICAM-1)形成的外周超分子激活簇区域有助于维持更持久的T细胞与抗原呈递细胞相互作用,从而有效杀死靶细胞。LFA-1/ICAM-1直接结合作用在CAR-T细胞介导的免疫突触结构中未见报道,并且对下游互蛋白的影响亦未被研究。

[0006] 免疫突触结构体是很多蛋白的形成复合体,涉及很多蛋白的相互作用。荧光素酶互补技术是一种检测相互作用蛋白信号的技术,该技术通过将萤光素酶的N端和C端片段分别与待检测的相互作用蛋白进行融合。当蛋白发生互作时,该互作可以使萤光素酶的N端和C端片段重组为有活性的萤光素酶,进而催化底物(如萤光素)产生化学发光。目前还未有将该技术用于CAR修饰细胞生物学活性测定中的报道。

发明内容

[0007] 为了克服现有技术中的缺陷,本发明提供了一种反映免疫突触相关信号蛋白的荧光素酶互补系统质粒和稳转细胞株及其构建方法及在基于免疫突触形成能力的CAR修饰细胞生物学活性测定中的应用,该细胞株可以稳定整合ICAM-1-Nluc与Cluc-SHP2报告基因以及CD19抗原,可有效被以CD19为抗原的CAR-T细胞杀伤以及激活CAR- Jurkat (CAR-J) 细胞产生IL-2 (Jurkat细胞无直接杀伤能力,被激活后产生IL-2)。本发明通过与CAR修饰细胞孵育,检测该细胞株所表达的荧光素酶的活性变化来反映CAR修饰细胞免疫突触形成能力,通过此生物学活性来评估CAR修饰细胞的有效性。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0009] 本发明的第一方面是提供一种反映免疫突触相关信号蛋白的荧光素酶互补系统质粒,其包括含有ICAM-1基因序列和pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Nluc的质粒、含有SHP2基因序列和pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Cluc的质粒,以及含有CD19基因序列的质粒。

[0010] 本发明的第二方面是提供上述质粒的制备方法,包括如下步骤:

[0011] 步骤一,利用分子克隆技术依次将商品化的ICAM-1质粒目的基因序列与pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Nluc通过FLAG tag与接头连接,并构建在载体上;

[0012] 步骤二,利用分子克隆技术依次将pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列Cluc与商品化的SHP2质粒目的基因序列通过His tag与接头连接,并构建在载体上;

[0013] 步骤三,利用分子克隆技术将商品化的CD19质粒目的基因序列构建在pLV-Hygro载体上。

[0014] 进一步地,步骤一和步骤二中采用的接头为3×柔性linker Gly4/Ser。

[0015] 进一步地,步骤一中连接所得到的为序列为SEQ ID No.1的序列ICAM-1-FLAG-Nluc。

[0016] 进一步地,步骤二中连接所得到的为序列为SEQ ID No.2的序列Cluc-His-SHP2。

[0017] 进一步地,步骤一采用的载体为pcDNA3.1载体或pLV-Neo载体。

[0018] 进一步地,步骤二采用的载体为pcDNA3.1载体或pLVX-Puro载体。

[0019] 本发明的第三方面是提供一株稳转细胞株,为293-IS-CD19,其是通过将上述质粒转染至人胚胎肾细胞HEK-293细胞获得,稳定整合ICAM-1-Nluc与Cluc-SHP2报告基因以及CD19抗原。

[0020] 本发明的第四方面是提供上述稳转细胞株的构建方法,包括如下步骤:

[0021] 步骤一,利用慢病毒转染技术将上述质粒转染入HEK-293细胞;

[0022] 步骤二,在步骤一转染后的细胞中加入嘌呤霉素、遗传霉素以及潮霉素,经过加压筛选,富集阳性细胞,扩增并置于液氮介质中冻存。

[0023] 进一步地,嘌呤霉素的筛选浓度为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$,遗传霉素的筛选浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$,潮霉素的筛选浓度为 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0024] 本发明的第五方面是提供一种基于免疫突触形成能力的CAR修饰细胞生物学活性评估方法,包括如下步骤:

[0025] 步骤一,将CAR修饰细胞加入已接种上述稳转细胞株的孔板中进行共同孵育;

[0026] 步骤二,迅速将化学发光底物D-luciferin加至孔板,室温震荡短时间后立即实时读取荧光值;

[0027] 步骤三,通过信号差异评估基于免疫突触形成能力的CAR修饰细胞生物学活性高低。

[0028] 进一步地,上述CAR修饰细胞为CAR-J细胞或CAR-T细胞。

[0029] 本发明采用以上技术方案,与现有技术相比,具有如下技术效果:

[0030] (1) 与传统检测法相比,该检测方式简单,耗时很短,检测费用低,且稳转株有利于保证测定结果的稳定性;

[0031] (2) 本发明以免疫突触信号通路为研究对象,设计一种能够反应免疫突触形成后蛋白互作变化的互作荧光素酶报告基因的细胞株,能够实时反应免疫突触形成能力,测定过程简单,结果准确。

[0032] 综上所述,本发明构建的一种能够稳定整合反应免疫突触形成后蛋白互作变化的互作荧光素酶报告基因的HEK-293细胞株在与CAR修饰细胞形成免疫突触后,可影响靶细胞表达的互补荧光素酶活性变化。本发明利用上述细胞株建立一种更加简单、快速的CAR修饰细胞体外生物学活性评估方法,可有利于生物学活性药物的质量控制和临床应用,具有较高的应用价值。

附图说明

[0033] 图1是本发明一实施例中HEK-293细胞瞬时表达蛋白与免疫突触信号通路关键蛋白鉴定结果;其中,图1A为HEK-293瞬时表达在pcDNA3.1载体上的ICAM-1-FLAG-Nluc、Cluc-His-SHP2以及CD19质粒的Western blot鉴定结果,左边为阴性对照HEK-293,右边为转染了以上三个质粒的HEK-293, β -Actin为上样内参蛋白;图1B显示了LFA-1/ICAM-1抑制剂lifitegrast对CD19 CAR-T细胞杀伤靶细胞HEK-293(转染上述三个质粒)的影响;图1C显示了LFA-1/ICAM-1抑制剂lifitegrast对CD19 CAR-J细胞接触靶细胞HEK-293(转染上述三个质粒)分泌IL-2的影响;

[0034] 图2是本发明一实施例中HEK-293细胞瞬时表达信号蛋白互作及活性验证鉴定结果;其中,图2A显示了HEK-293瞬时表达在pcDNA3.1载体上的ICAM-1-FLAG-Nluc以及Cluc-His-SHP2质粒的Western blot免疫沉淀鉴定结果;图2B显示了ICAM-1(P2A4)抗体(可阻断ICAM-1与SHP2直接结合)有效抑制ICAM-1-FLAG-Nluc与Cluc-His-SHP2融合蛋白互作产生的荧光素酶活性;

[0035] 图3是本发明一实施例中稳转株293-IS-CD19的ICAM-1激活后蛋白互作情况及荧光素酶活性变化结果;其中,图3A显示了293-IS-CD19细胞ICAM-1经过抗体交联(模拟免疫突触LFA-1激活ICAM-1)后,Cluc-His-SHP2与ICAM-1-FLAG-Nluc相互作用减弱,CD19+Cluc-SHP2为阴性对照;图3B显示了293-IS-CD19细胞ICAM-1经过抗体交联后,细胞内互补荧光素

酶活性降低,Control、anti-IgG F(ab')₂以及IgG+anti-IgG F(ab')₂均为阴性对照组;
[0036] 图4是本发明一实施例中稳转株293- IS-CD19与CAR-J(图4A)、CAR-T(图4B)细胞孵育后荧光素酶活性变化结果。

具体实施方式

[0037] 本发明研究了CAR修饰细胞免疫突触结构中靶细胞ICAM-1的激活与下游结合蛋白SH2的蛋白酪氨酸磷酸酶-2(SHP2)结合的变化关系,并利用荧光素酶互补技术,构建了ICAM-1/SHP2互作的信号探针。并应用此探针,研究CAR修饰细胞免疫突触形成过程中,通过检测靶细胞中ICAM-1/SHP2蛋白互作的动态变化,来评估CAR修饰细胞的有效性。基于上述,本发明提供了一种反映免疫突触相关信号蛋白的荧光素酶互补系统质粒和稳转细胞株及其在CAR修饰细胞生物学活性测定中的应用。

[0038] 下面通过具体实施例和附图对本发明进行详细和具体的介绍,以使更好的理解本发明,但是下述实施例并不限制本发明范围。

[0039] 实施例中方法如无特殊说明的采用常规方法,使用的试剂如无特殊说明的使用常规市售试剂或按常规方法配制的试剂。

[0040] 实施例1

[0041] 本实施例提供一种反映免疫突触相关信号蛋白的荧光素酶互补系统质粒并对其进行了验证,该质粒的构建以及验证过程包括如下步骤:

[0042] (1) 质粒构建;

[0043] 1) 将序列ICAM-1-FLAG-Nluc(利用分子克隆技术依次将商品化的ICAM-1质粒目的基因序列与pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列(Nluc,aa2-416)通过FLAG tag与3×柔性linker Gly4/Ser连接获得,SEQ ID No.1)通过酶切位点Kpn I、Xba I连接到pcDNA3.1载体上,得到质粒pc3.1-ICAM-1-FLAG-Nluc。

[0044] 2) 将序列Cluc-His-SHP2(利用分子克隆技术依次将pGL3-Control质粒上的荧光素酶序列(Cluc,aa398-550)与商品化的SHP2质粒目的基因序列通过His tag与3×柔性linker Gly4/Ser连接获得,SEQ ID No.2)分别通过酶切位点Kpn I、Xba I连接到pcDNA3.1载体上,得到质粒pc3.1-Cluc-His-SHP2。

[0045] 3) 所有质粒均经过测序验证正确。

[0046] (2) 细胞转染;

[0047] HEK-293细胞种板过夜。使用Lipofectamine 3000试剂分别将pc3.1-ICAM-1-FLAG-Nluc、pc3.1-Cluc-His-SHP2和购买的pcDNA3.1载体上人源CD19表达质粒转染HEK-293细胞,置于二氧化碳培养箱培养6小时后换液,48小时后收集部分细胞制备Western blot蛋白样品,剩下细胞进行CAR修饰细胞杀伤活性试验。

[0048] (3) 细胞融合蛋白瞬时表达鉴定;

[0049] 细胞裂解液RIPA处理转染了上述三质粒的HEK-293细胞,制备Western blot蛋白上样缓冲液。采用化学发光法,分别使用原始蛋白抗体和标签蛋白抗体检测融合蛋白表达,结果如图1A所示,HEK-293细胞正常表达目标蛋白。

[0050] (4) CAR-T细胞免疫突触关键信号蛋白鉴定;

[0051] CAR-T细胞采用Eu-TDA释放试验检测其对靶细胞杀伤能力。转染上述三质粒的

HEK-293靶细胞孵育荧光染料后,以合适的密度种于U形底96孔板,CAR-T细胞预孵育 $1\mu\text{M}$ lifitegrast (LFA-1/ICAM-1抑制剂)一小时后,以不同密度加入到靶细胞中,三小时后收集上清,加入底物,使用时间分辨荧光免疫分析仪读取信号值,分析细胞染料释放法率。结果如图1B所示,lifitegrast有效抑制CAR-T对转染三质粒的HEK-293细胞杀伤能力,显示CAR-T免疫突触结构中LFA-1/ICAM-1结合的重要性。

[0052] (5) CAR-J细胞免疫突触关键信号蛋白鉴定;

[0053] CAR-J细胞采用IL-2释放检测效应细胞激活情况间接反映对靶细胞杀伤能力。转染上述三质粒的HEK-293靶细胞后以合适的密度种于U形底96孔板,CAR-J细胞预孵育 $1\mu\text{M}$ lifitegrast一小时后,以10倍细胞密度加入到靶细胞中,分别在三小时和六小时后收集上清,使用IL-2ELISA试剂盒检测上清含量,分析效应细胞激活情况。结果如图1C所示,lifitegrast有效抑制CAR-J对转染三质粒的HEK-293细胞IL-2分泌能力,显示CAR-J免疫突触结构中LFA-1/ICAM-1结合的重要性。

[0054] 综上所述,通过抑制免疫突触结构中的LFA-1/ICAM-1结合,可以有效抑制CAR修饰细胞的杀伤潜力,说明了免疫突触结构中靶细胞ICAM-1激活的重要性。

[0055] 实施例2

[0056] 本实施例对实施例1构建的免疫突触关键信号蛋白质粒进行细胞内活性验证,具体的操作步骤和结果如下:

[0057] (1) Western blot免疫沉淀试验

[0058] 收集的细胞使用Co-IP裂解液(20mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA和1% TRITON X-100, 含蛋白酶和磷酸酶抑制剂)冰上裂解细胞30min, 4°C 、12000rpm离心10min,上清与FLAG-M2 beads在 4°C 孵育过夜。然后使用TBS漂洗beads三次,加入上样缓冲液, 97°C 煮5min。之后根据依照Western blot步骤进行后续试验。

[0059] 结果如图2A所示,融合蛋白ICAM-1-FLAG-Nluc与Cluc-His-SHP2在HEK-293细胞内存在直接相互作用。

[0060] (2) 融合蛋白互补荧光素酶活性验证

[0061] 转染上述三质粒的HEK-293细胞预孵育 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ IgG或ICAM-1 (P2A4) 抗体,之后以 $1\times 10^5/\text{mL}$, $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到96孔培养板中,并立即加入终浓度 3mM D-luciferin底物,立即实时读取荧光信号值变化。

[0062] 结果如图2B显示,ICAM-1 (P2A4) 抗体有效抑制ICAM-1/SHP2互作产生的荧光信号值,表明细胞内的荧光信号来源于融合蛋白的相互作用。证明了融合质粒表达探针蛋白的特异性,并具有生物学活性价值。

[0063] 综上所述,在HEK-293细胞内,ICAM-1-FLAG-Nluc与Cluc-His-SHP2融合蛋白直接互作可产生的荧光素酶活性,证明荧光探针的特异性。

[0064] 实施例3

[0065] 本实施例提供一株稳转株293-IS-CD19,其具体的构建方法包括如下步骤:

[0066] (1) 嘌呤霉素、遗传霉素以及潮霉素最佳筛选浓度的确定;

[0067] HEK-293细胞接种于24孔细胞培养板中,加入不同筛选浓度嘌呤霉素,遗传霉素或潮霉素,浓度范围:嘌呤霉素($0.1\mu\text{g}/\text{mL} \sim 10\mu\text{g}/\text{mL}$ 培养2~3天),遗传霉素($0.1\text{mg}/\text{mL} \sim 2\text{mg}/\text{mL}$ 培养7~14天),潮霉素($10\mu\text{g}/\text{mL} \sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 培养5~7天)观察细胞生长形态,确认嘌呤霉

素筛选浓度为2 μ g/mL,遗传霉素筛选浓度为1mg/mL,潮霉素筛选浓度为200 μ g/mL。

[0068] (2) 质粒构建

[0069] 1) 将序列ICAM-1-FLAG-Nluc分别通过酶切位点EcoR I、Xba I连接到pLV-Neo载体上,得到质粒pLV-ICAM-1-FLAG-Nluc-Neo。

[0070] 2) 将序列Cluc-His-SHP2分别通过酶切位点Xho I、Xba I连接到pLVX-Puro载体上,得到质粒pLVX-Cluc-His-SHP2-Puro。

[0071] 3) 将pcDNA3.1载体上序列CD19分别通过酶切位点EcoR I、BamH I连接到pLV-Hygro载体上,得到质粒pLV-CD19-HA-Hygro。

[0072] 4) 所有质粒均经过测序验证正确。

[0073] (3) 慢病毒收集;

[0074] HEK-293T细胞种板过夜。使用Lipofectamine 3000试剂分别将pLV-CD19-HA-Hygro、pLV-ICAM-1-FLAG-Nluc-Neo或pLVX-Cluc-His-SHP2-Puro质粒与psPAX2和pMD2.G质粒转染HEK-293T细胞,置于二氧化碳培养箱培养6小时后换液,48小时后收集上清,过滤浓缩,得到高滴度慢病毒。

[0075] (4) 细胞转染及扩增;

[0076] HEK-293细胞种板过夜。加入不同滴度的慢病毒以及辅助感染试剂聚凝胺,置于二氧化碳培养箱培养24小时后换液,继续培养48小时,加入筛选剂筛选14天后,得到稳转细胞株293-IS-CD19,扩大培养,培养液条件为DMEM+10%FBS(1 μ g/mL嘌呤霉素,500 μ g/mL遗传霉素,100 μ g/mL潮霉素)。

[0077] (5) 293-IS-CD19稳转细胞ICAM-1交联激活;

[0078] 293-IS-CD19细胞与15 μ g/mL ICAM-1(6.5B5)抗体,在0.1%FBS培养基中37 $^{\circ}$ C孵育1小时,之后0.1%FBS培养基清洗细胞二次,之后与20 μ g/mL anti-mouse IgG F(ab')₂在37 $^{\circ}$ C孵育20min后进行Co-IP试验,结果如图3A所示,ICAM-1抗体交联后,SHP2结合降低。而对于活性实验,加入上述浓度的anti-mouse IgG F(ab')₂后立即加入终浓度3mM D-luciferin,并实时读取荧光信号值。结果如图3B所示,ICAM-1抗体交联后,互补荧光信号降低。通过ICAM-1抗体交联模拟免疫突触中ICAM-1的激活情况,反映了潜在的生物学活性变化。

[0079] 实施例4

[0080] 本实施例提供上述稳转株293-IS-CD19基于免疫突触形成能力CAR修饰细胞生物学活性测定的应用,具体的操作方法包括如下步骤:

[0081] 测定步骤:293-IS-CD19细胞用完全培养液(取热灭活胎牛血清FBS 10mL,加DMEM培养液90mL,混匀,4 $^{\circ}$ C保存)于37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳条件下培养,取生长状态良好的细胞用于试验。无菌条件下,胰酶消化细胞,采用完全培养基中和胰酶并重悬细胞,1000rpm离心2分钟,弃去上清液,用完全培养液重悬并调整细胞浓度至2 $\times 10^6$ 个/mL,每孔50 μ L接种于96孔板。将以CD19为抗原的效应细胞CAR修饰细胞CAR-J与CAR-T细胞分别调整不同密度,以0:1,1:1,3:1,10:1(效应细胞:靶细胞比例)接种于加入靶细胞的96孔板中,同时补充不同数量的Jurkat细胞,使得体系内每个孔细胞总量为1.1 $\times 10^6$ 个。立即加入终浓度3mM D-luciferin,并实时读取荧光信号值,读取时间设置为一小时内。

[0082] 结果如图4A和4B所示随着效应细胞浓度的升高,荧光信号随之降低,存在量效关

系,且在30min时趋于稳定,提示新的检测模型建立成功。

[0083] 由上述实施例可知,本发明构建了一种能够反映免疫突触形成能力生物学活性的细胞株,上述细胞株在与CAR修饰细胞孵育的情况下可降低互补荧光素酶活性,通过检测该细胞株所表达的荧光素酶的活性可以评估样品的生物学活性,本发明提供的方法测定时间短、操作简单、成本低。

[0084] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	上海市食品药品检验研究院
[0003]	<120>	一种反映免疫突触相关信号蛋白的荧光素酶互补系统质粒和稳转细胞株及其应用
[0004]	<160>	2
[0005]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0
[0006]	<210>	1
[0007]	<211>	2982
[0008]	<212>	DNA
[0009]	<213>	Artificial Sequence (人工序列)
[0010]	<400>	1
[0011]	atggctccca	gcagcccccg gcccgcgctg cccgcactcc tggctctgct cggggctctg 60
[0012]	ttcccaggac	ctggcaatgc ccagacatct gtgtcccct caaaagtcat cctgccccgg 120
[0013]	ggaggtccg	tgctggtgac atgcagcacc tctgtgacc agcccaagt gttgggcata 180
[0014]	gagaccccg	tgcctaaaaa ggagttgctc ctgcctggga acaaccggaa ggtgtatgaa 240
[0015]	ctgagcaatg	tgcaagaaga tagccaacca atgtgctatt caaactgcc tgatgggcag 300
[0016]	tcaacagcta	aaaccttct caccgtgtac tggactccag aacgggtgga actggcacc 360
[0017]	ctcccctct	ggcagccagt gggcaagaac cttacctac gctgccaggt ggagggtggg 420
[0018]	gcacccggg	ccaacctcac cgtggtgctg ctccgtggg agaaggagct gaaacgggag 480
[0019]	ccagctgtgg	gggagccgc tgaggtcacg accacggtgc tggtgaggag agatcacat 540
[0020]	ggagccaatt	tctcgtgccg cactgaactg gacctgcgc cccaagggt ggagctgttt 600
[0021]	gagaacacct	cgcccccta ccagctccag acctttgtcc tgccagcag tccccacaa 660
[0022]	cttgtcagcc	cccgggtcct agaggtggac acgcagggga ccgtggtctg ttccctggac 720
[0023]	gggctgttcc	cagtctcgga ggcccagtc cacctggcac tgggggacca gaggttgaac 780
[0024]	cccacagtca	cctatggcaa cgactcctc tcggccaagg cctcagtcag tgtgaccgca 840
[0025]	gaggacgagg	gcaccagcg gctgacgtgt gcagtaatac tggggaacca gagccaggag 900
[0026]	acactgcaga	cagtgaccat ctacagctt cgggcgcca acgtgattct gacgaagcca 960
[0027]	gaggtctcag	aagggaccga ggtgacagt aagtgtgagg ccaccctag agccaaggtg 1020
[0028]	acgtgaatg	gggttccagc ccagccactg ggcccaggg ccagctcct gctgaaggcc 1080
[0029]	acccagagg	acaacggcg cagcttctcc tgctctgcaa ccctggaggt ggccggccag 1140
[0030]	cttatacaca	agaaccagac ccgggagctt cgtgtcctgt atggccccg actggacgag 1200
[0031]	agggattgtc	cgggaaactg gacgtggcca gaaaattccc agcagactcc aatgtgccag 1260
[0032]	gcttggggga	accattgcc cgagctcaag tgtctaaagg atggcacttt cccactgcc 1320
[0033]	atcggggaat	cagtgactgt cactcgagat cttgagggca cctacctgt tcgggccagg 1380
[0034]	agcactcaag	gggaggtcac ccgcaagtg accgtgaatg tgctctccc ccggtatgag 1440
[0035]	attgtcatca	tactgtggt agcagccgca gtcataatgg gcactgcagg cctcagcacg 1500
[0036]	taccttata	accgccagcg gaagatcaag aaatacagac tacaacaggc caaaaaggg 1560
[0037]	accccatga	aaccgaacac acaagccag cctcccaaaa gcttaagtga ctacaaggat 1620
[0038]	gacgatgaca	aggattacaa agacgacgat gataaggact ataaggatga tgacgacaaa 1680
[0039]	tctagatccg	gcggaggtgg atccggcgtt ggccgatcgg gtggaggtgg atcagaagac 1740
[0040]	gccaaaaaca	taaagaaagg cccggcgcca ttctatccgc tggaagatgg aaccgctgga 1800
[0041]	gagcaactgc	ataaggctat gaagagatac gccctggttc ctggaacaat tgcttttaca 1860

[0042]	gatgcacata tcgaggtgga catcacttac gctgagtact tcgaaatgtc cgttcggttg	1920
[0043]	gcagaagcta tgaaacgata tgggctgaat acaaatcaca gaatcgtcgt atgcagtga	1980
[0044]	aactctcttc aattctttat gccggtgttg ggcgcgttat ttatcggagt tgcagttg	2040
[0045]	cccgcgaacg acatttataa tgaacgtgaa ttgctcaaca gtatgggcat ttcgcagcct	2100
[0046]	accgtgggtg tcgtttccaa aaaggggttg caaaaaattt tgaacgtgca aaaaaagtc	2160
[0047]	ccaatcatcc aaaaaattat tatcatggat tctaaaacgg attaccaggg atttcagtcg	2220
[0048]	atgtacacgt tcgtcacatc tcatctacct cccggtttta atgaatacga ttttgtgcca	2280
[0049]	gagtccttcg atagggacaa gacaattgca ctgatcatga actcctctgg atctactggt	2340
[0050]	ctgcctaaag gtgtcgtct gcctcataga actgcctgcg tgagattctc gcatgccaga	2400
[0051]	gatcctatth ttggcaatca aatcattccg gatactgcga ttttaagtgt tgttcattc	2460
[0052]	catcacggtt ttggaatggt tactacaact ggatatttga tatgtggatt tcgagtcgtc	2520
[0053]	ttaatgtata gatttgaaga agagctgttt ctgaggagcc ttcaggatta caagattcaa	2580
[0054]	agtgcgtcgc tgggtccaac cctattctcc ttcttcgcca aaagcactct gattgacaaa	2640
[0055]	tacgatttat ctaatttaca cgaaattgct tctggtggcg ctcccctctc taaggaagtc	2700
[0056]	ggggaagcgg ttgccaagag gttccatctg ccaggatca ggcaaggata tgggctcact	2760
[0057]	gagactacat cagctattct gattacacc gaggggatg ataaaccggg cgcggtcgg	2820
[0058]	aaagtgttc catttttga agcgaaggt gtggatctgg ataccggaa aacgctgggc	2880
[0059]	gttaatcaaa gaggcgaact gtgtgtgaga ggtcctatga ttatgtccgg ttatgtaaac	2940
[0060]	aatccggaag cgaccaacgc cttgattgac aaggatggat aa	2982
[0061]	<210> 2	
[0062]	<211> 2307	
[0063]	<212> DNA	
[0064]	<213> Artificial Sequence (人工序列)	
[0065]	<400> 2	
[0066]	atgtccggtt atgtaacaa tccggaagcg accaacgcct tgattgacaa ggatggatgg	60
[0067]	ctacattctg gagacatagc ttactgggac gaagacgaac acttcttcat cgttgaccgc	120
[0068]	ctgaagtctc tgattaagta caaaggctat caggtggctc ccgctgaatt ggaatccatc	180
[0069]	ttgtccaac accccaacat cttcgacgca ggtgtcgcag gtcttcccga cgatgacgcc	240
[0070]	ggtgaacttc ccgccccgt tgttgtttg gagcacggaa agacgatgac ggaaaaagag	300
[0071]	atcgtggatt acgtgccag tcaagtaaca accgcgaaa agttgcgcgg aggagtgtg	360
[0072]	tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc ggaaaactcg acgcaagaaa aatcagagag	420
[0073]	atcctcataa aggccaagaa gggcggaaag atcgccgtgt caggaggtgg aggttctgga	480
[0074]	ggtggtggat ccggtggagg tggatcacat catcaccatc accatagac atcgcggaga	540
[0075]	tgtttcacc caaatatcac tgggtggag gcagaaaacc tactgttgac aagaggagt	600
[0076]	gatgacagtt ttttgcaag gcctagtaaa agtaaccctg gagacttcac actttccgtt	660
[0077]	agaagaaatg gagctgtcac ccacatcaag attcagaaca ctggtgatta ctatgacctg	720
[0078]	tatggagggg agaaatttgc cactttgct gagttgtcc agtattacat ggaacatcac	780
[0079]	gggcaattaa aagagaagaa tggagatgac attgagctta aatatcctct gaactgtgca	840
[0080]	gatcctacct ctgaaagtg gtttcatgga catctctctg ggaaagaagc agagaaatta	900
[0081]	ttaactgaaa aaggaaaaca tggtagttt cttgtacgag agagccagag ccaccctgga	960
[0082]	gattttgttc tttctgtcgc cactggtgat gacaaaggg agagcaatga cggcaagtct	1020
[0083]	aaagtgacc atgttatgat tcgctgtcag gaactgaaat acgacgttgg tggaggagaa	1080

[0084] cggtttgatt ctttgacaga tcttgtgga cattataaga agaatcctat ggtggaaca 1140
[0085] ttgggtacag tactacaact caagcagccc cttaacacga ctcgtataaa tgctgctgaa 1200
[0086] atagaaagca gagttcgaga actaagcaaa ttagctgaga ccacagataa agtcaaaca 1260
[0087] ggcttttggg aagaatttga gacactacaa caacaggagt gcaaacttct ctacagccga 1320
[0088] aaagagggtc aaaggcaaga aaacaaaaac aaaaatagat ataaaaacat cctgcccttt 1380
[0089] gatcatacca gggttgtcct acacgatggt gatcccaatg agcctgttct agattacatc 1440
[0090] aatgcaaata tcatcatgcc tgaatttga accaagtgca acaattcaaa gcccaaaaag 1500
[0091] agttacattg ccacacaagg ctgcctgcaa aacacggtga atgacttttg gcggatggtg 1560
[0092] ttccaagaaa actcccaggt gattgtcatg acaacgaaag aagtggagag aggaaagagt 1620
[0093] aatgtgtca aatactggcc tgatgagtat gctctaaaag aatatggcgt catgcgtggt 1680
[0094] aggaacgtca aagaaagcgc cgctcatgac tatacgtaa gagaactta actttcaaag 1740
[0095] gttggacaag ggaatacga gagaacggtc tggcaatacc actttcggac ctggccggac 1800
[0096] cacggcgtgc ccagcgacc tggggcgtg ctggacttcc tggaggagt gcaccataag 1860
[0097] caggagagca tcatggatgc agggccggtc gtggtgact gcagtgtg aattggccgg 1920
[0098] acaggacgt tcattgtgat tgatattctt attgacatca tcagagagaa aggtgttgac 1980
[0099] tgcgatattg acgttccaa aaccatccag atggtgcggt ctacagagtc agggatggtc 2040
[0100] cagacagaag cacagtaccg atttatctat atggcgtcc agcattatat tgaaacacta 2100
[0101] cagcgagga ttgaagaaga gcagaaaagc aagaggaaag ggcacgaata tacaatatt 2160
[0102] aagtattctc tagcggacca gacgagtga gatcagagcc ctctcccgc ttgtactcca 2220
[0103] acgccacct gtgcagaaat gagagaagac agtgctagag tctatgaaa cgtgggctg 2280
[0104] atgcaacagc agaaaagttt cagatga 2307

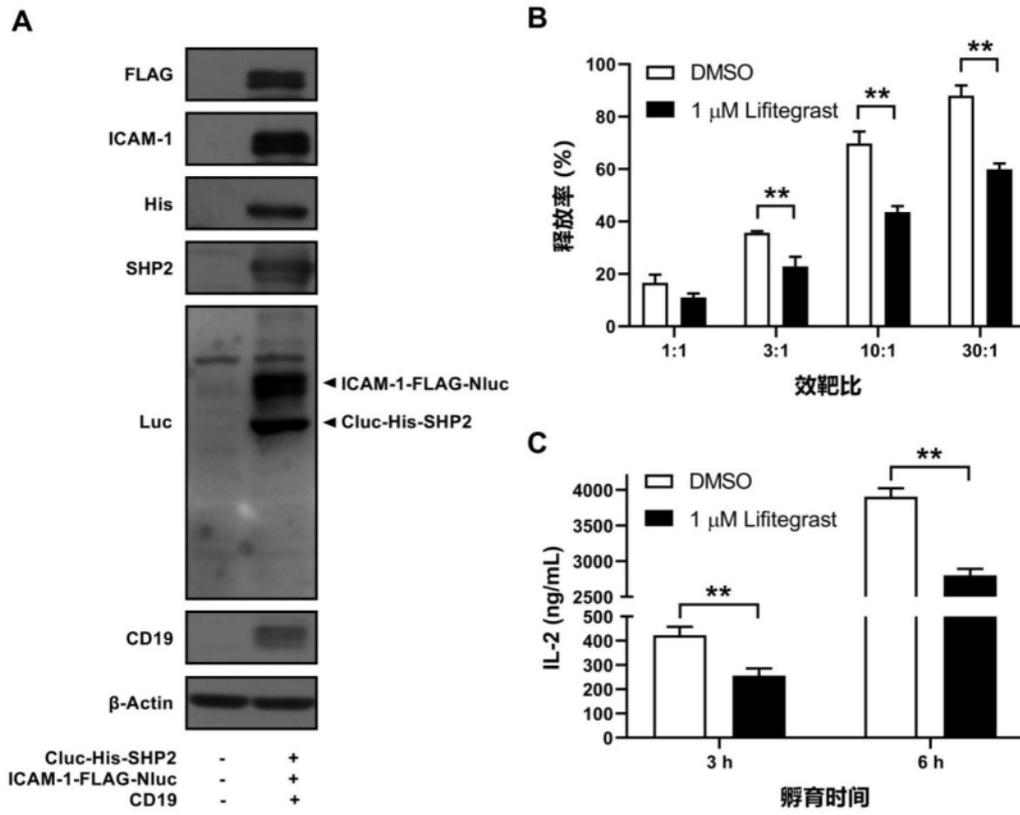


图1

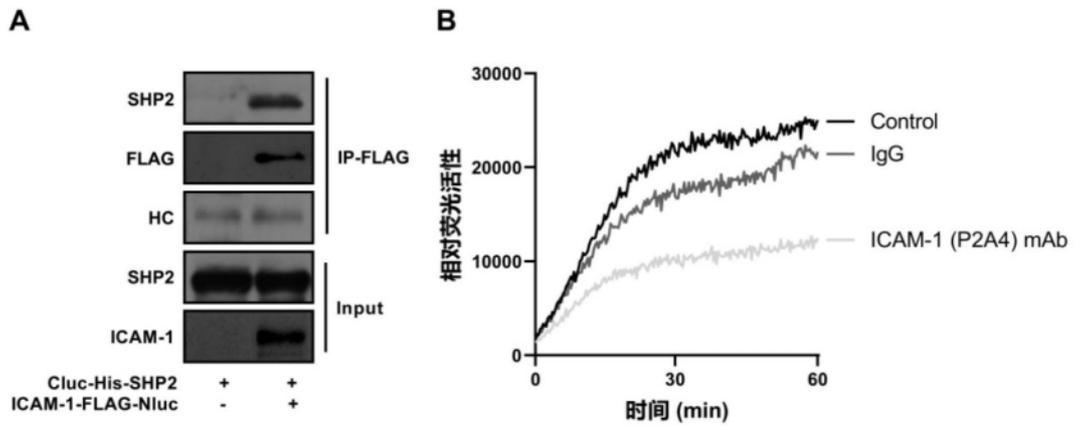


图2

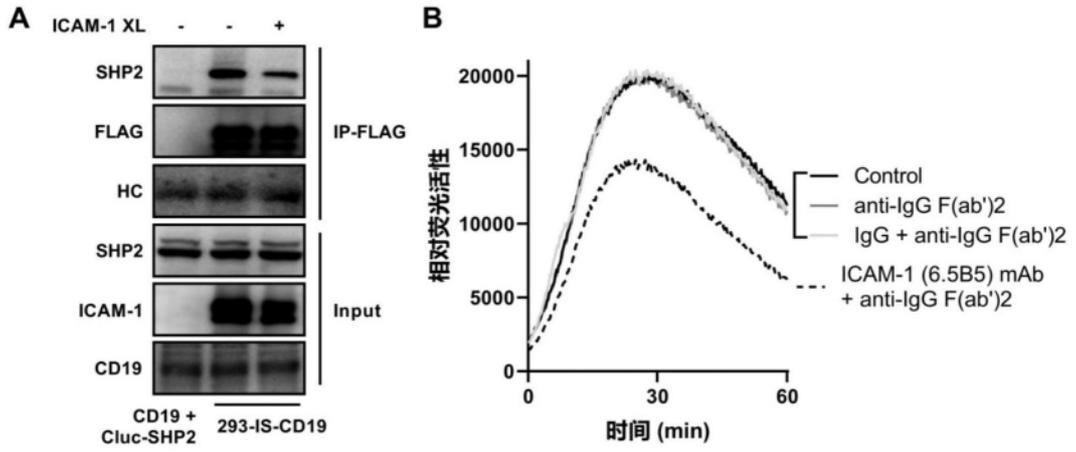


图3

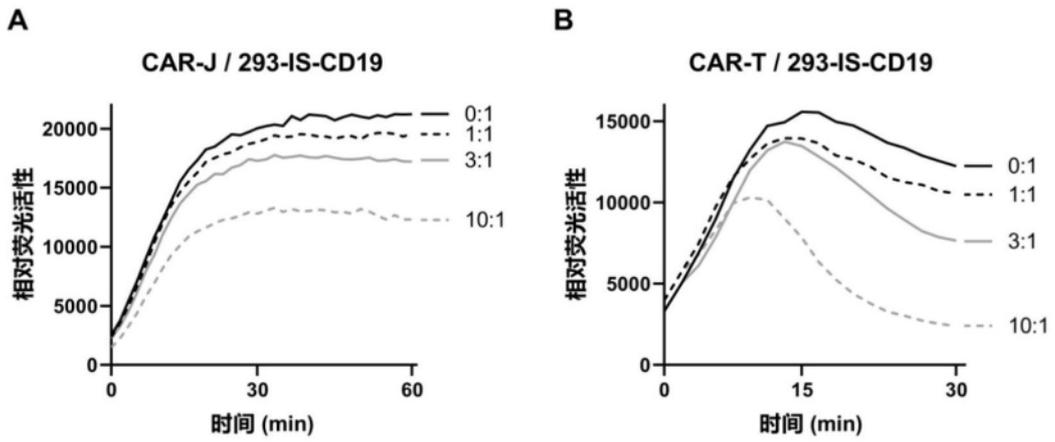


图4