

## 产品手册

### H\_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line

### H\_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.8.240522

## 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、	细胞复苏、传代、冻存.....	6
1.	H_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line 细胞复苏.....	6
2.	H_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line 细胞传代.....	6
3.	H_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line 细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	8
1.	激活验证实验.....	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	10
	使用许可协议: .....	11

## 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-C13108	H_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line	5E6 Cells/mL

### 组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C13108	H_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat 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

FOXP3 属于叉头家族，是一种主要的转录因子。研究表明，在 Jurkat 细胞中过表达的 FOXP3 可以通过与 NFAT 竞争结合或作为 IL-2 启动子的转录抑制因子直接与 NFAT 或 NF- $\kappa$ B 相互作用。人类中，在所有活化的 T 细胞中均观察到 FOXP3 的表达上调。FOXP3 是天然存在的 Treg 细胞的发育和功能所必需的，并参与控制免疫耐受的分子机制。

吉满生物 H\_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line，是将人类 FOXP3 启动子荧光素酶报告基因稳定的整合到 Jurkat 细胞的基因组中。当上游信号通路被激活后，由人类 FOXP3 启动子激活荧光素酶（Luciferase）的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于相关通路研究。

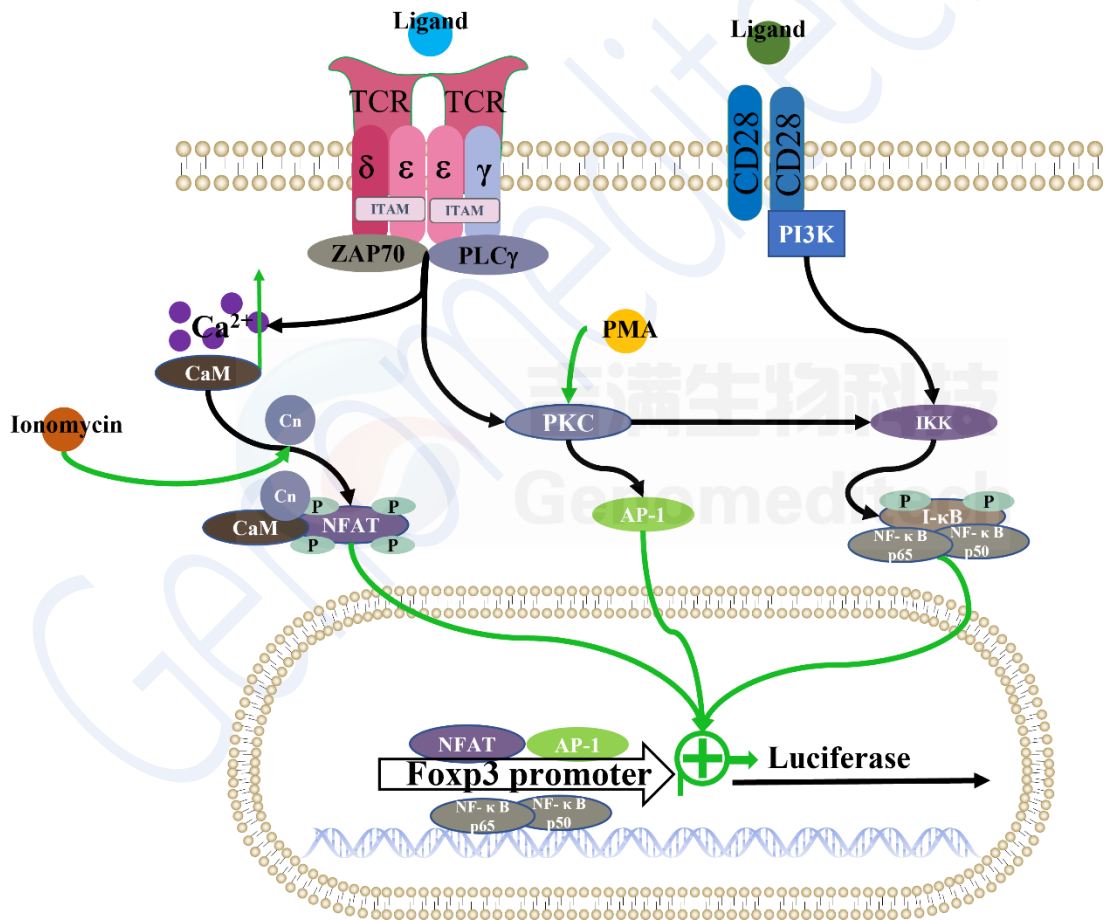


Fig 1.H\_FOXP3-Promoter 信号通路图

## 四、 材料准备

### 1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

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+0.75 µg/mL Puromycin
细胞冻存培养基:	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
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
RPMI 1640	500 mL	BI/01-100-1ACS
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
Passive Lysis 5X Buffer	30 mL	Promega/E1941
Firely Luciferase Assay Reagent	100 mL	Genomeditech/G0483M002
Ionomycin	/	MCE/HY-13434
PMA/TPA (PKC 激活剂)	/	Beyotime/S1819

#### 重要仪器

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

## 五、 细胞复苏、传代、冻存

### 1. H\_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line 细胞复苏

- 细胞冻存密度为  $5 \times 10^6$  cells/mL，冻存管分装 1 mL。
- 在 37°C 水浴锅预热培养基，加入预热完全培养基 5 mL 到 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存的细胞并迅速放入 37°C 恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。
- 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预先加有预热好的 15 mL 离心管中，轻轻混匀，1000 rpm，离心 5 min 使细胞沉淀，弃上清。
- 冻存细胞离心后收集沉淀，使用 1 mL 完全培养基重悬。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。
- 通过补加培养基的形式调整活细胞密度为  $4-6 \times 10^5$  cells/mL，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL 悬液），竖瓶培养。

### 2. H\_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line 细胞传代

- 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完全培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加培养基，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  $2 \times 10^6$  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新鲜培养液，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。
- 该细胞对细胞密度较为敏感，培养、传代时请注意保持细胞密度在合适的范围。
- 注意营养，不处理时务必隔天适当补加培养基。

### 3. H\_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line 细胞冻存

- 细胞冻存液：90% FBS+10% DMSO。
- 使用 1000 rpm，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液重悬细胞，细胞密度调整为  $5 \times 10^6$  cells/mL。

- d) 每管 1 mL 分装到细胞冻存管中，冻存体积为 1 mL，冻存密度为  $5 \times 10^6$  cells/mL。  
拧紧盖子，适当标记后，将细胞冻存管置于梯度降温盒中，在  $-80^{\circ}\text{C}$  下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

Genomeditech

## 六、 使用方法

### 1. 激活验证实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 H\_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  cells/孔。每孔使用 0.5  $\mu\text{g/mL}$  固定浓度的 Ionomycin (709.01 Da) 和梯度稀释浓度的 PMA (616.83 Da) 作为激活药物。PMA Conc.01 浓度为 3  $\mu\text{g/mL}$ , 6 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照。周围孔加入 100  $\mu\text{L}$  PBS, 以防止边孔蒸发。

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	PMA	PBS	3 $\mu\text{g/mL}$	500 $\text{ng/mL}$	83.33 $\text{ng/mL}$	13.89 $\text{ng/mL}$	2.31 $\text{ng/mL}$	385.8 $\text{pg/mL}$	64.3 $\text{pg/mL}$	10.72 $\text{pg/mL}$	1.79 $\text{pg/mL}$	0	PBS
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D													
E													
F													
G													
H													

#### 1) 加样步骤

- 实验前 1-2 h, 离心收集 H\_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line 细胞, 以 Assay Buffer 重悬细胞, 计算细胞密度及活力, 通过补加 Assay Buffer 的方式, 调整到  $2 \times 10^6$  Cells/mL, 以排枪加 50  $\mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔, 周围的孔加 100  $\mu\text{L}$  PBS, 盖板上板盖, 于孵箱中孵育待用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物, 使用一行 (如 B2-B11)。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
PMA	10 mg/mL	0.1 mg/mL	使用 2 $\mu\text{L}$ 储液+198 $\mu\text{L}$ Assay Buffer
Ionomycin	10 mg/mL	1 mg/mL	使用 2 $\mu\text{L}$ 储液+18 $\mu\text{L}$ Assay Buffer



- e) 配置含 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ionomycin 的 Assay Buffer, 取 4  $\mu\text{L}$  Ionomycin(1  $\text{mg}/\text{mL}$ )的母液, 加入 3996  $\mu\text{L}$  Assay Buffer (RPMI 1640+1% FBS +1% P.S), 混匀。后续步骤所用 Assay Buffer 均含 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ionomycin。
- f) 96 孔 V 中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 65.6  $\mu\text{L}$  Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 55  $\mu\text{L}$  Assay Buffer。
- 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 3.96  $\mu\text{L}$  PMA), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 11 $\mu\text{L}$ , 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	4.17 $\mu\text{L}$ PMA	加入	65.6 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 11  $\mu\text{L}$ , 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 充分混匀。
- i) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- j) 将步骤 a 准备好的孔板取出, 每孔加 50  $\mu\text{L}$  梯度稀释的药物, 于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养 7 h。
- k) 使用报告基因检测试剂盒, 检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMA+0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ionomycin	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMA+0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ionomycin	1.79 $\text{pg}/\text{mL}$ PMA+0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ionomycin
	240	4044	226

### 3) 验证结果

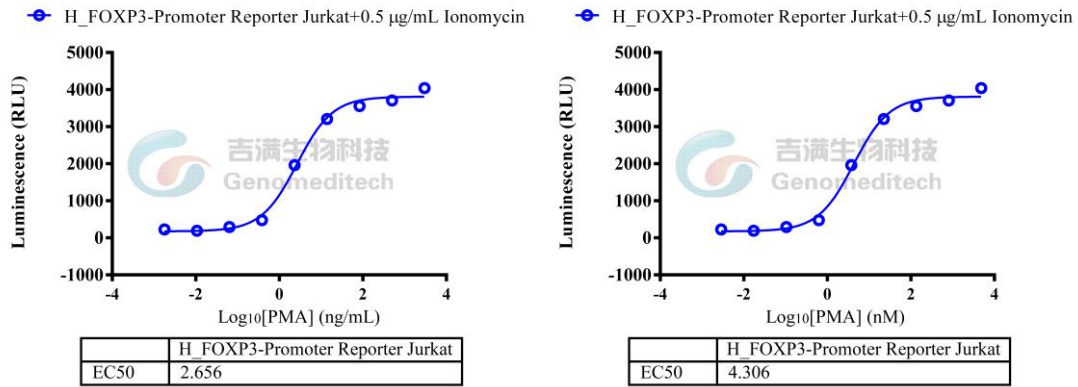


Fig 2. 功能验证结果

(右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 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