

## 产品手册

### NFKB Reporter TF-1 Cell Line

### NFKB Reporter TF-1 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.240522

## 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.	细胞复苏.....	6
2.	细胞传代.....	6
3.	细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	7
1.	Assay 验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
	使用许可协议: .....	9

## 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-C33197	NFKB Reporter TF-1 Cell Line	5E6 Cells/mL

### 组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C33197	NFKB Reporter TF-1 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

NF- $\kappa$ B/Rel 信号通路包括 NF- $\kappa$ B2 p52/p100、NF- $\kappa$ B1 p50/p105、c-Rel、RelA/p65 和 RelB。这些蛋白质作为二聚体转录因子，在控制基因调节广泛的生物过程，包括先天性和适应性免疫、炎症、应激反应、B 细胞发育和淋巴器官发生中发挥作用。在经典或非经典途径中，NF- $\kappa$ B/Rel 蛋白被 I $\kappa$ B 蛋白结合和抑制。促炎细胞因子、LPS、生长因子和抗原受体激活 IKK 复合物（IKK $\beta$ 、IKK $\alpha$  和 NEMO），使 I $\kappa$ B 蛋白磷酸化。I $\kappa$ B 的磷酸化导致其泛素化和蛋白酶体降解，释放 NF- $\kappa$ B/Rel 复合物。活性 NF- $\kappa$ B/Rel 复合物通过磷酸化进一步激活并转移到细胞核，诱导靶基因表达。

吉满生物 NFKB Reporter TF-1 Cell Line 是一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 TNF- $\alpha$  结合受体后，激活下游信号通路，从而激活荧光素酶（Luciferase）的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 TNF- $\alpha$  的激活效果评价。

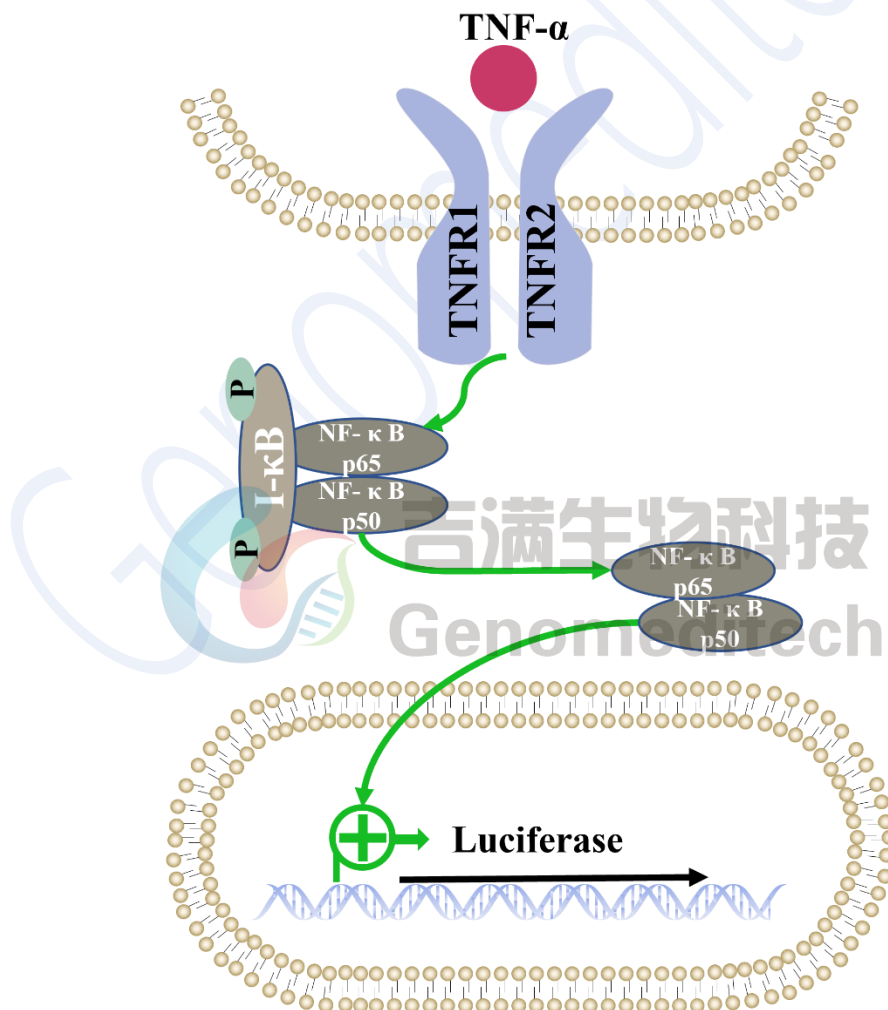


Fig 1.NFKB 原理图

## 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+ 2 ng/mL GM-CSF
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+2 ng/mL GM-CSF+3 µg/mL Blasticidin
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.
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
GM-CSF	10 µg	novoprotein/C003
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	gibco/C11875500BT
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated	96-well	Corning/3912
Microplate		
Recombinant Human TNF-α	50 µg	PEPROTECH/300-01A
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、 细胞复苏、传代、冻存

### 1. 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 × 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  $3-5 \times 10^5$  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,培养面积 25 cm<sup>2</sup>),竖瓶培养。

### 3. 细胞冻存

- 使用 176 × 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  $5 \times 10^6$  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. 细胞传代

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

- 此细胞为人红系白血病细胞,悬浮生长,轻微贴壁。
- 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 2-1 传 5,隔 2-3 天继续传代,不要让其密度超  $1.4 \times 10^6$  cells/mL,推荐使用 T25 瓶进行传代培养,也可通过计数控制细胞传代密度。
- 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强生长培养基,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:

- 细胞倍增率稳定后再用于检测或冻存,一般在 7-10 天左右。常规的稳定倍增率是  $24 \pm 8$  小时。增殖时一般细胞活力在 95%。
- 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。

## 六、使用方法

### 1. Assay 验证实验

操作步骤可根据示例调整优化，对于本次实验，推荐 NFKB Reporter TF-1 Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human TNF- $\alpha$  (17.4 kDa; 以下简称 H\_TNF- $\alpha$ ) 作为阳性药物, Conc.01 浓度为 100 ng/mL, 4 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  $\mu$ L PBS, 以防止边孔蒸发。

孔板布局:

	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	H_TNF- $\alpha$	100 ng/mL	25 ng/mL	6.25 ng/mL	1.56 ng/mL	390.63 pg/mL	97.66 pg/mL	24.41 pg/mL	6.1 pg/mL	1.53 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

- 在实验前 1-2 h, 将细胞从培养瓶中取出, 离心收集细胞沉淀, 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, 调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$  cells/mL。以排枪加 50  $\mu$ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu$ L PBS。盖板上盖, 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)。
- 母液准备

药物名称	储液	母液	配置方法
H_TNF- $\alpha$	0.1 mg/mL	0.01 mg/mL	取 2 $\mu$ L 储液+18 $\mu$ L Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 71.87  $\mu$ L Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 110  $\mu$ L Assay Buffer。
- 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 1.47  $\mu$ L H\_TNF- $\alpha$ ), 混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.33 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.47 $\mu\text{L}$ H_TNF- $\alpha$	加入	71.87 $\mu\text{L}$	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 $\mu\text{L}$	

- g) 从第一个稀释孔 B2 中吸取 18.33  $\mu\text{L}$ ，加入到第二个稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- i) 将步骤 a 孵育的细胞孔板取出。
- j) 加入梯度稀释好的药物，50  $\mu\text{L}$  每孔。
- k) 盖上班盖，于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养 7 h。
- l) 使用 GMOne-Step 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。

NFKB Reporter TF-1 Cell Line	0 ng/mL	100 ng/mL	1.53 pg/mL
	30890	2647762	37111

## 3) 验证结果

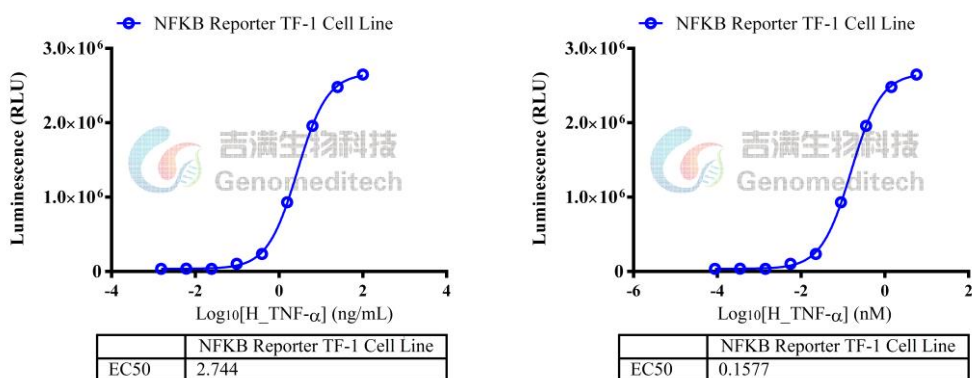


Fig 2. 验证结果 (右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)。



## 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