

产品手册

NFKB Reporter THP1 Cell Line

NFKB Reporter THP1 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.2

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（20%FBS）.....	6
2.	细胞传代.....	6
3.	细胞冻存.....	6
六、	验证结果.....	7
1.	PMA 激活验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
附录一	TNF- α 功能验证结果.....	9
附录二	LPS 功能验证结果.....	9
用许可协议:		10

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-C06727	NFKB Reporter THP1 Cell Line	5E6 Cell/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C06727	NFKB Reporter THP1 Cell Line	5E6 Cell/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- κ B/Rel 信号通路包括 NF- κ B2 p52/p100、NF- κ 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- κ B/Rel 蛋白被 I κ 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 β 、IKK α 和 NEMO），使 I κ B 蛋白磷酸化。I κ B 的磷酸化导致其泛素化和蛋白酶体降解，释放 NF- κ B/Rel 复合物。活性 NF- κ 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。

NFKB Reporter THP1 Cell Line 细胞系以 THP1 为工具细胞，采用慢病毒感染的方式，构建稳定表达 NF- κ B-Luc 报告基因的细胞系，可用于检测 NF- κ B 信号转导。在被配体如 PMA（PKC 特异性激活剂）激活后，内源性 NF- κ B 转录因子与 DNA 反应元件结合，诱导荧光素酶报告基因的转录。

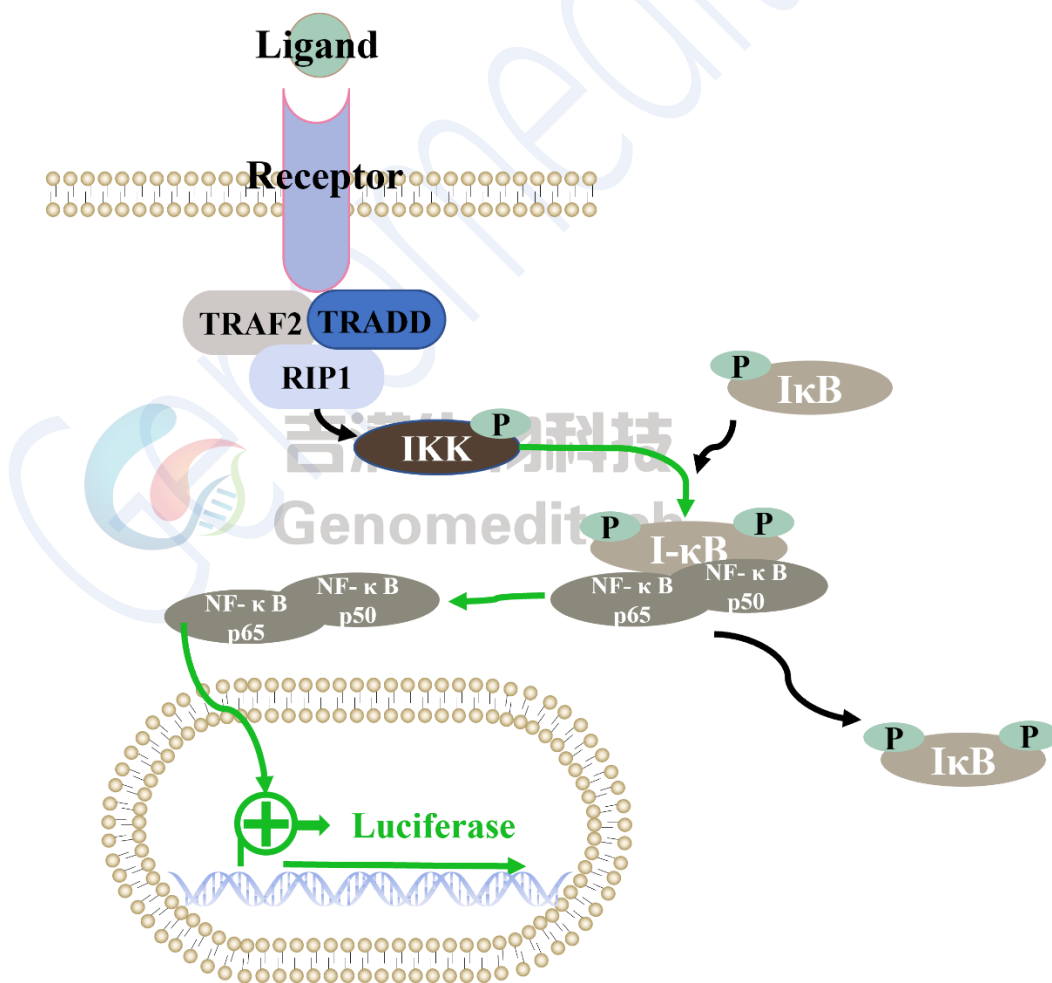


Fig 1. NFKB 信号通路示意图

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(ATCC)+20% FBS+0.05 mM 2-Me+1% P.S
细胞生长培养基:	RPMI 1640(ATCC)+10% FBS+1% P.S+0.05 mM β -Me+0.5 μ g/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640(ATCC)+10% FBS+1% P.S+0.05 mM β -Me

注意: 细胞应使用 ATCC/30-2001 RPMI 1640 培养基或购买吉满生物完全培养基培养, 血清需使用说明书相同血清或 gibco 血清。

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/ GM-040401-1
2-Mercaptoethanol	50 mL	gibco/21985-023
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
RPMI 1640	500 mL	ATCC/30-2001
96 well round cell culture plate	Plate	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	Plate	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	Plate	Saining/1014010
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C
PMA	/	beyotime/S1819
Recombinant Human TNF alpha	/	novoprotein/C008
LPS	/	beyotime/S1732

重要仪器

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

五、 细胞复苏、传代、冻存

1. 细胞复苏（20%FBS）

- 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 3 mL 复苏培养基重悬，T25 瓶竖直培养，隔 2-3 天直接补加 3-5mL 复苏培养基，瓶体横向放置，补液后预计 3-4 天培养基颜色微微变黄，此时观察细胞，颗粒变圆，胞体饱满，开始计数传代，整个周期预计 2 周。

3. 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 7×10^6 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 2 代内，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。

- 此细胞为单核细胞，悬浮生长。
- 当细胞浓度达到 8×10^5 cells/mL 时传代培养，不要让其浓度超过 1×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养。可通过计数控制细胞传代密度，复苏 2 代内，1 传 2，状态恢复后 1 传 3-1 传 4，2-3 天传代。
- 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：

- 刚复苏，细胞生长缓慢，且背景会出现较多细胞碎片，细胞状态恢复后背景会逐渐变干净。周期预计 1-1.5 周。
- 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。
- 该细胞的培养基中需添加 β -巯基乙醇，若不添加，可能会对细胞状态造成影响。

六、 验证结果

1. PMA 激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 NFkB Reporter THP1 Cell Line 细胞量为 2×10^6 cells/mL。本次实验使用 PMA(616.83 Da)作为阳性药物，Conc.01 浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。B2-B11 孔周围为 100 μL 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
	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PMA	PBS	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 ng/mL	62.5 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 pg/mL	15.26 pg/mL	0	PBS
	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

1) 加样步骤

- 在实验前 1 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 2×10^6 cells/mL。以排枪加 50 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖板上盖，于孵箱中孵育待用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行，单重复可以检测 6 个药物）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
PMA	10 mg/mL	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	取 2 μL 储液+198 μL Assay Buffer 混匀

- 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 80 μL 的 Assay Buffer，B3-B11 加入 60 μL 的 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 1.63 μL PMA），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 20 μ L, 加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.63 μ L PMA	加入	80 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔（如 B1）中吸取 20 μ L 液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 B2），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 孵育待用的孔板取出，加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 50 μ L。
- j) 盖上板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- k) 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

NFKB Reporter THP1 Cell Line	0 μ g/mL	1 μ g/mL	15.26 μ g/mL
	1273	9847	1051

3) 验证结果

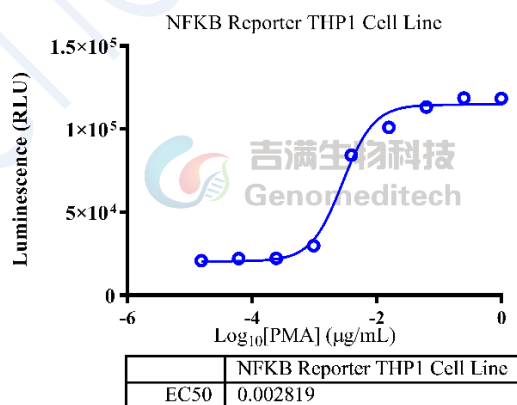


Fig 2. Response to PMA. NFKB Reporter THP1 Cell Line (Cat. GM-C06727) at a concentration of 1E5 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of PMA (beyotime/S1819 in assay buffer (RPMI 1640(ATCC)+10% FBS+1% P.S+0.05 mM β -Me) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit (Cat. GM-040503). The maximum induction fold was approximately [5.5]. Data are shown by drug mass concentration.

附录一 TNF- α 功能验证结果

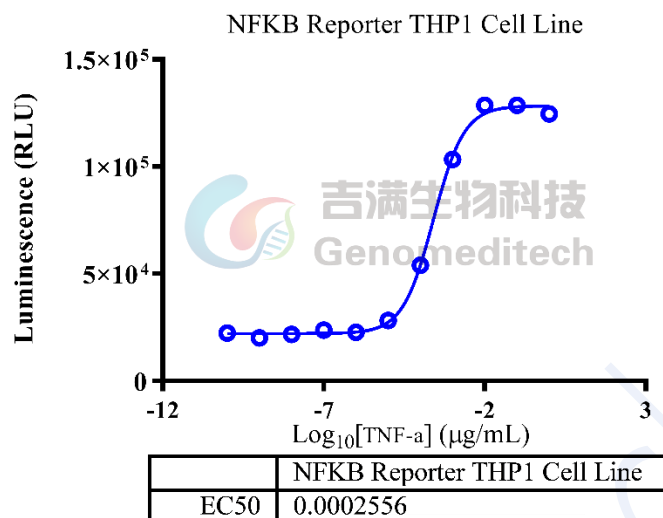


Fig 3. Response to Recombinant Human TNF alpha. NFKB Reporter THP1 Cell Line (Cat. GM-C06727) at a concentration of 1E5 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of TNF alpha (novoprotein/C008) in assay buffer (RPMI 1640(ATCC)+10% FBS+1% P.S+0.05 mM β -Me) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the GOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit (Cat. GM-040513). The maximum induction fold was approximately [5.8]. Data are shown by drug mass concentration.

附录二 LPS 功能验证结果

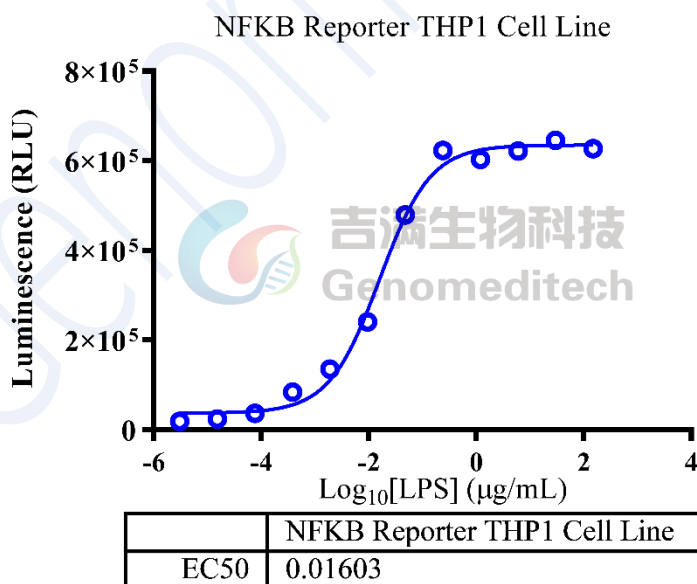


Fig 4. Response to LPS. NFKB Reporter THP1 Cell Line (Cat. GM-C06727) at a concentration of 1E5 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of LPS (beyotime/S1732) in assay buffer (RPMI 1640(ATCC)+10% FBS+1% P.S+0.05 mM β -Me) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the GOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit (Cat. GM-040513). The maximum induction fold was approximately [33.9]. Data are shown by drug mass concentration.

用许可协议:

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策:

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。

Genomeditech