

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：V2.12.2

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	6
2.	细胞传代	6
3.	细胞冻存	6
六、	使用方法（示例）	7
1.	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	9
	相关产品	10
	使用许可协议:	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-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- κ 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。

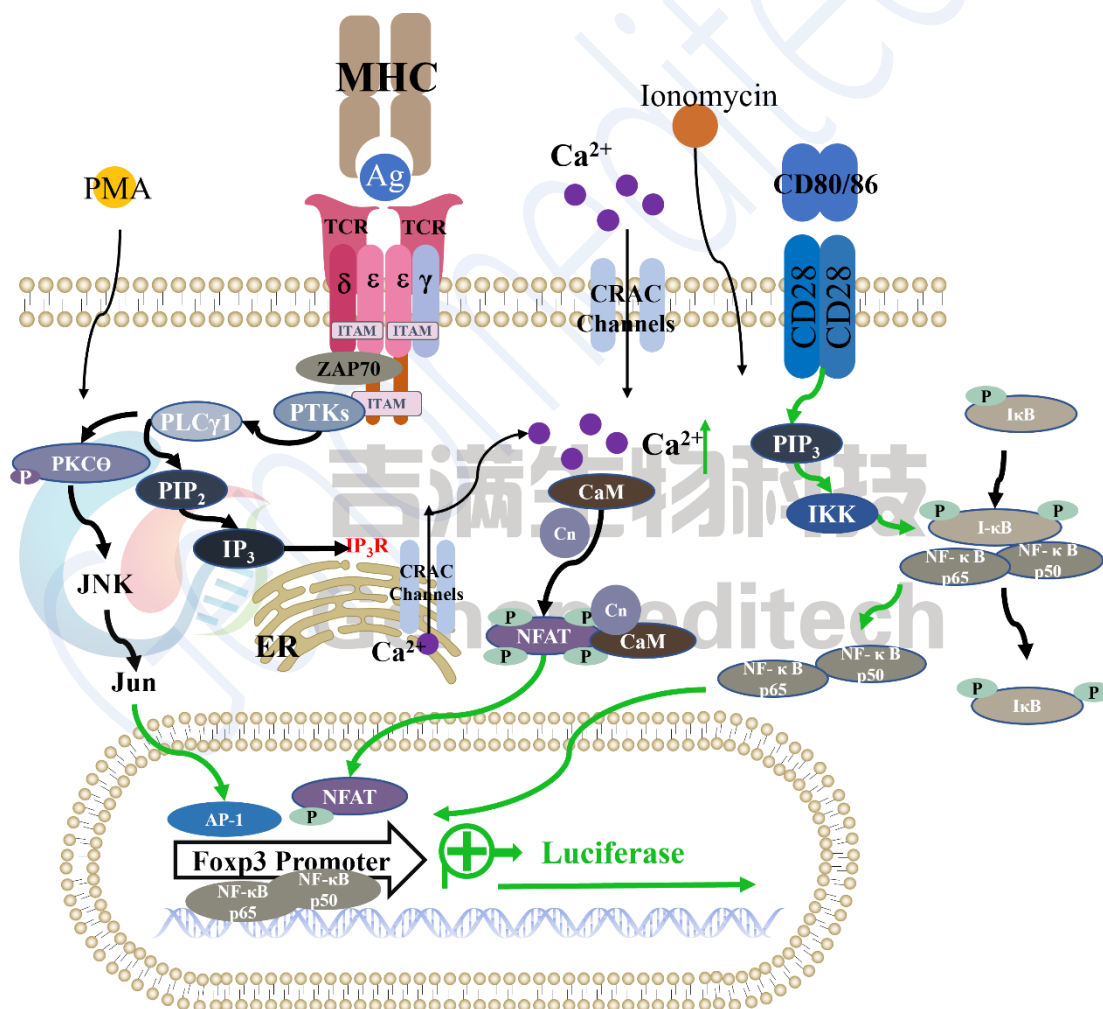


Fig 1.H_FOXP3-Promoter 信号通路图

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	ExCell/FSP500
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
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C
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. 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 5 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. 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. 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。
- FBS 血清需 56°C 加热 30 分钟，可灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

六、 使用方法（示例）

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 1×10^5 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 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
A		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PMA	PBS	3 μg/mL	500 ng/mL	83.33 ng/mL	13.89 ng/mL	2.31 ng/mL	385.8 pg/mL	64.3 pg/mL	10.72 pg/mL	1.79 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 2×10^6 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 μL 储液+198 μL Assay Buffer
Ionomycin	10 mg/mL	1 mg/mL	使用 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer

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

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 11 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4.17 μL PMA	加入	65.6 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	

- h) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 11 μL , 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 μL 梯度稀释的药物, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ PMA+0.5 $\mu\text{g/mL}$ Ionomycin	3 $\mu\text{g/mL}$ PMA+0.5 $\mu\text{g/mL}$ Ionomycin	1.79 $\mu\text{g/mL}$ PMA+0.5 $\mu\text{g/mL}$ Ionomycin
	240	4044	226

3) 验证结果

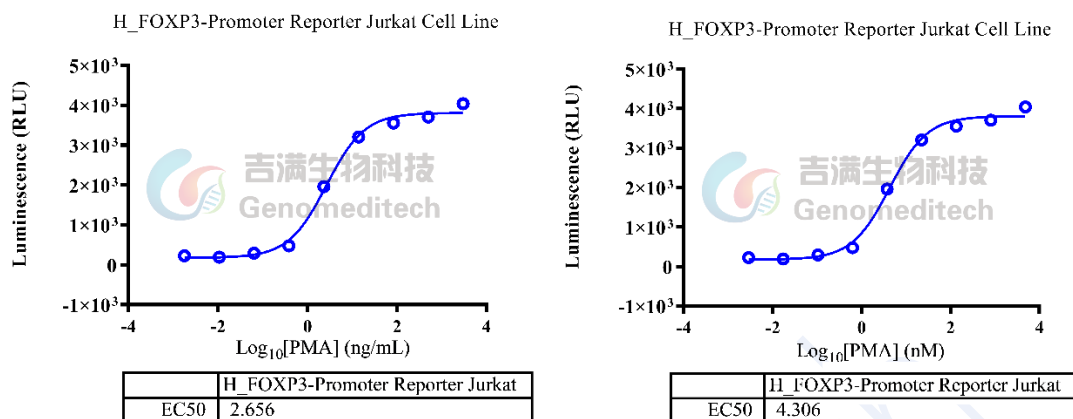


Fig 2.功能验证结果
 (右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

相关产品

TCR	
H_IL2-Promoter Reporter Jurkat Cell Line	NFAT-Luc Reporter Jurkat Cell Line
TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+)	OKT3(CD3 ScFv) CHO-K1 Cell Line

使用许可协议：

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。