

产品手册

STING KO Reporter THP1 Cell Line

STING KO 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：V2.9.2

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、	使用方法.....	7
1.	CDNs 验证激活实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
2.	IFN- α 2 验证激活实验.....	10
1)	加样步骤.....	10
2)	报告基因检测.....	11
3)	验证结果.....	12
附录	STING 敲除验证结果.....	13
使用许可协议:	14

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-C21622	STING KO Reporter THP1 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C21622	STING KO Reporter THP1 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

STING (Stimulator of interferon genes) 能够识别细胞质中的环状二核苷酸 (cyclic dinucleotides, CDN)，然后通过 cGAS-STING 通路激活天然免疫应答。目前针对 STING 靶点的激动剂，在癌症、肥胖、病毒感染、肝损伤、糖脂代谢紊乱等诸多疾病领域中备受研究人员关注。STING 在肿瘤中的主要机制是参与 T 细胞介导的肿瘤免疫过程。在结肠癌、黑色素瘤、缺乏端粒酶等多种癌症相关疾病中均检测到激活 cGAS-STING 途径可有效抑制癌细胞转移。

吉满生物 STING KO Reporter THP1 Cell Line 报告基因细胞系，是基于 STING/TBK1/IRF3 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。在吉满生物的 STING Reporter THP1 Cell Line (Genomeditech/GM-C21640) 的基础上，将 STING 基因敲除，因此 CDN 无法结合 STING 激活 cGAS-STING 途径。但使用 IFN α 仍然能够激活 JAK-STAT 途径，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，因此可用作 STING Reporter THP1 Cell Line 的对照细胞，验证 CDN 药物的结合特异性。

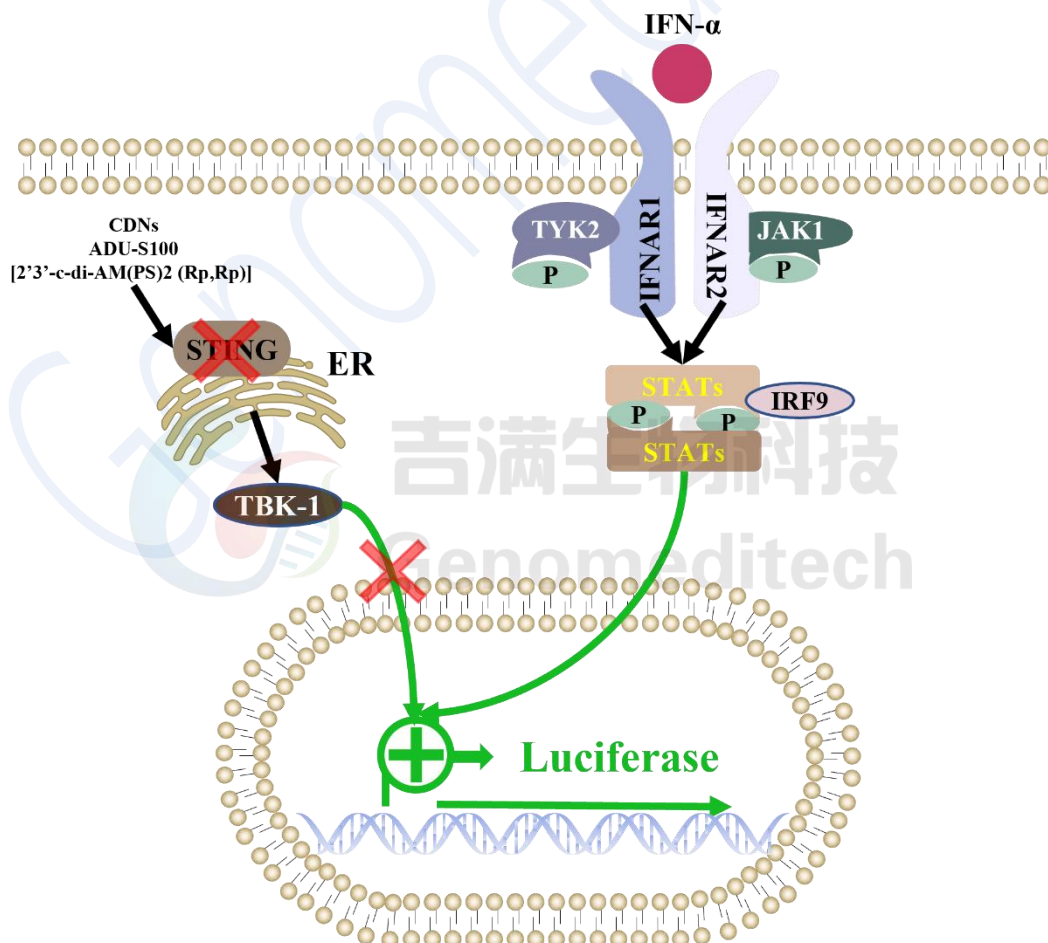


Fig 1.STING KO 原理图

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(ATCC)+20% FBS+1% P.S+0.05 mM β -Me
细胞生长培养基:	RPMI 1640(ATCC)+10% FBS+1% P.S+0.05 mM β -Me+2 μ g/mL Blasticidin+400 μ g/mL G418+0.5 μ g/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640(ATCC)+1% FBS +1% P.S

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
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
G418	10 mg	Genomeditech/GM-040402-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	ATCC/30-2001
2-Mercaptoethanol	50 mL	gibco/21985-023
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 Well White Polystyrene Microplate	96-well	Corning/3903
Passive Lysis 5X Buffer	30 mL	Promega/E1941
Firely Luciferase Assay Reagent	100 mL	Genomeditech/G0483M002
STING Reporter THP1 Cell Line	/	Genomeditech/GM-C21640
ADU-S100	/	MCE/HY-12885A
Recombinant Human IFN- α 2 (carrier-free)	/	BioLegend/592702

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（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、使用方法

1. CDNs 验证激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 STING KO Reporter THP1 Cell Line 和 STING Reporter THP1 Cell Line 细胞量均为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 ADU-S100 (734.51 Da) 作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 $15 \mu\text{M}$ ，2 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 $100 \mu\text{L}$ PBS，以防止边孔蒸发。

药物浓度孔板排布如下：

	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	ADU-S100	PBS	$15 \mu\text{M}$	$7.5 \mu\text{M}$	$3.75 \mu\text{M}$	$1.88 \mu\text{M}$	937.5 nM	468.75 nM	234.38 nM	117.19 nM	58.59 nM	0	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D													
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- a) 在实验前 1 h，将两株细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用适量 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 2×10^6 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。盖上市盖，于孵箱中孵育待用。细胞孔板排布如下：

	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	STING Reporter THP1 Cell Line	PBS	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	PBS
C	STING KO Reporter THP1 Cell Line	PBS	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	1×10^5 cells	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E													
F													
G													
H													

- b) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。

- c) 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。
- d) 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
ADU-S100	10 mM	1 mM	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer

- e) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 213.4 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 110 μL Assay Buffer。
- f) 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 6.6 μL ADU-S100），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 110 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	6.6 μL ADU-S100	加入	213.4 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 110 μL，加入到第二个梯度稀释孔 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 孵育待用的孔板取出，加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 50 μL。
- j) 盖上班盖，于 37 °C CO₂ 培养箱中培养 16 h。
- k) 使用报告基因检测试剂盒，收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

STING KO Reporter THP1 Cell Line	0 μM	15 μM	58.59 nM
	79027	76873	77243
STING Reporter THP1 Cell Line	0 μM	15 μM	58.59 nM
	113546	826189	118844

3) 验证结果

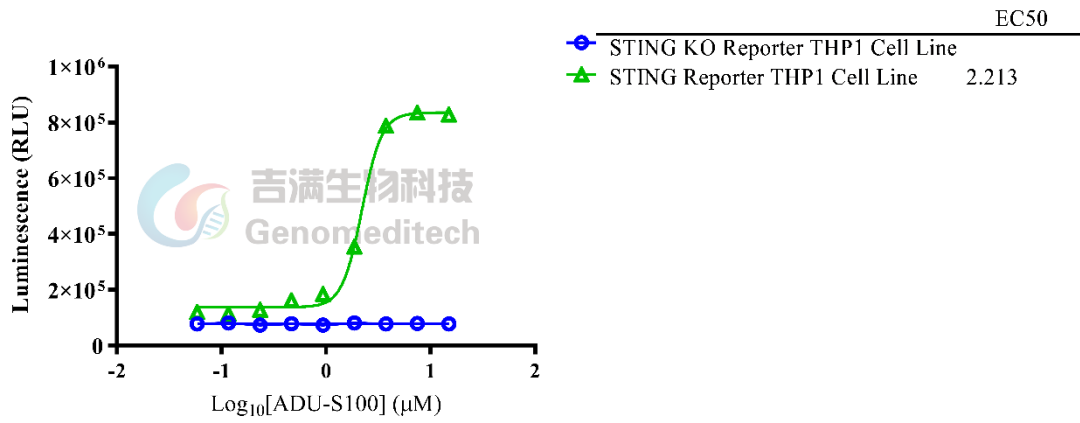


Fig 2. 激活验证结果

2. IFN- α 2 验证激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 STING KO Reporter THP1 Cell Line 和 STING Reporter THP1 Cell Line 细胞量均为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human IFN- α 2 (carrier-free) (19.4 kDa) (以下简称 IFN- α 2) 作为阳性药物。Conc.01 终浓度为 300 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。B2-B11 孔周围为 100 μ L PBS，以防止边孔蒸发。

药物浓度孔板排布如下：

	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	IFN- α 2	PBS	300 ng/mL	75 ng/mL	18.75 ng/mL	4.69 ng/mL	1.17 ng/mL	292.97 pg/mL	73.24 pg/mL	18.31 pg/mL	4.58 pg/mL	0	PBS
C		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 h，将两株细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用适量 Assay Buffer 重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 2×10^6 cells/mL。以排枪加 50 μ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖板上盖，于孵箱中孵育待用。细胞孔板排布参考实验 1。
- 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-B10）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
IFN- α 2	200 μ g/mL	20 μ g/mL	取 2 μ L 储液+18 μ 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 142.3 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 110 μ 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 4.4 μ L IFN- α 2），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 36.7 μ L, 加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	4.4 μ L IFN- α 2	加入	142.3 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L	110 μ L
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 36.7 μ L, 加入到第二个梯度稀释孔 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) 盖板上盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 16 h。
- k) 使用报告基因检测试剂盒, 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

STING KO Reporter THP1 Cell	0 ng/mL	300 ng/mL	4.58 pg/mL
Line	86756	1108016	383216
STING Reporter THP1 Cell	0 ng/mL	300 ng/mL	4.58 pg/mL
Line	121241	713012	365351

3) 验证结果

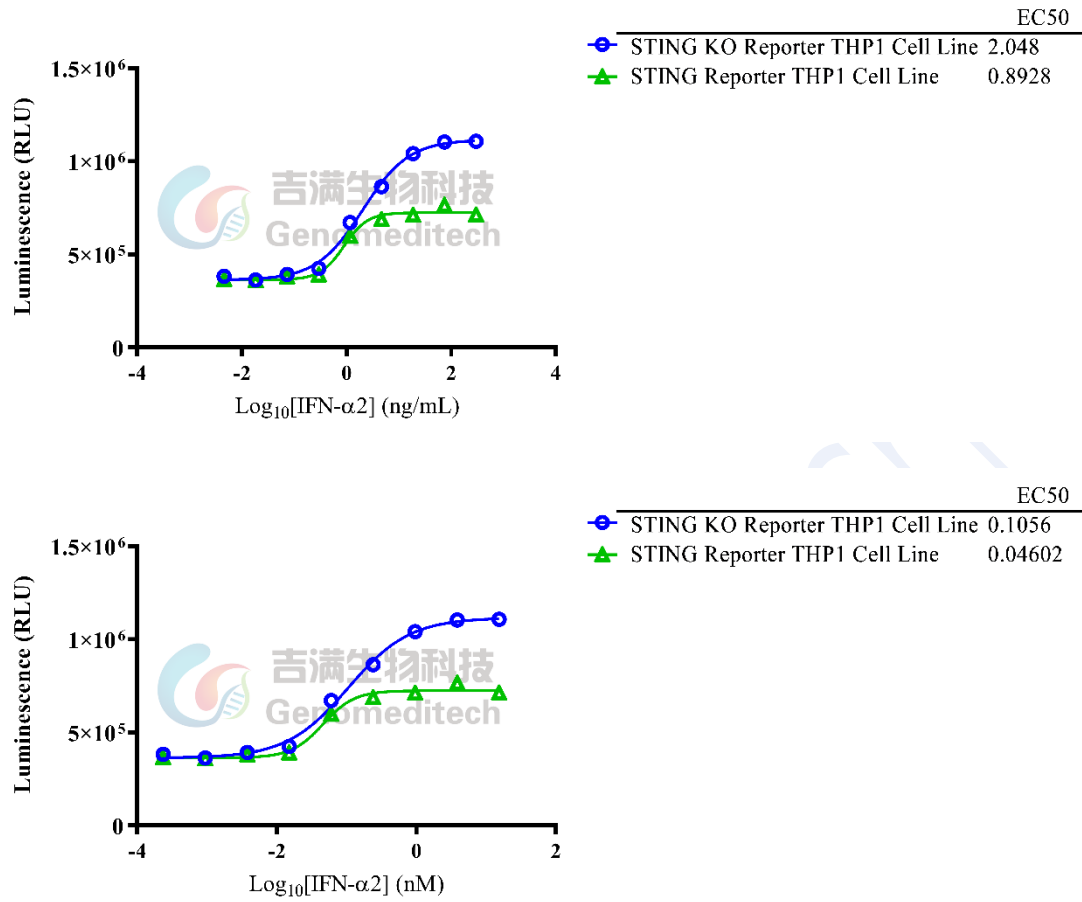


Fig 3. IFN-α2 激活验证结果

(下图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 STING 敲除验证结果

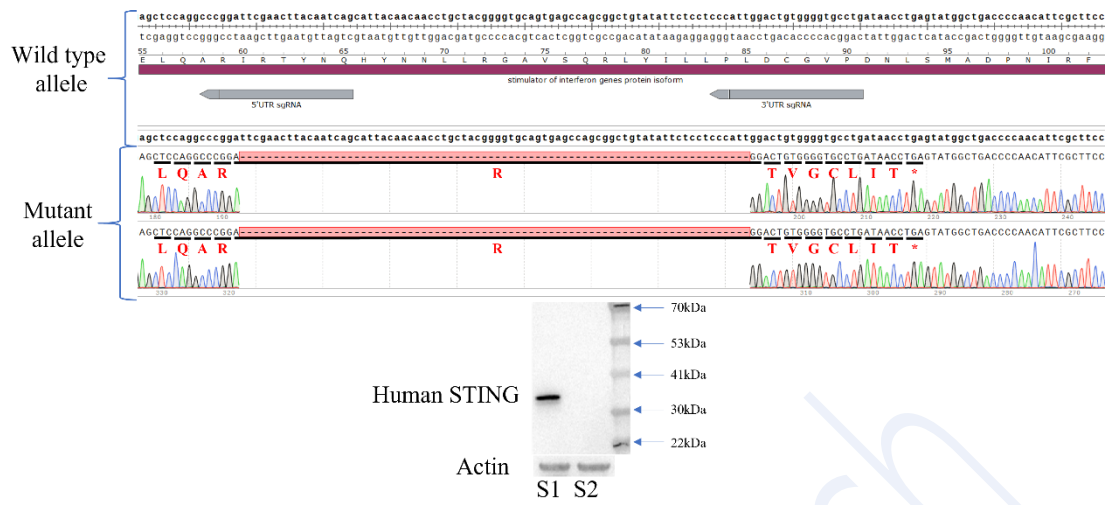


Fig. Western Blot检测THP1细胞中目的基因的表达量
 一抗: 1:1000 二抗:mouse, 1:10000
 S1: CON S2: H_STING KO (GM-C21622/Genomeditech)

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