

产品手册

STING Reporter U937 Cell Line

STING Reporter U937 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.240524

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.	ADU-S100 激活实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	H-151 抑制实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
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-C21917	STING Reporter U937 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C21917	STING Reporter U937 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 Reporter U937 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。当 CDN 结合 STING 后，STING 被激活，募集并激活 TANK 结合激酶 1 (TBK1)，活化的 TBK1 反过来磷酸化 STING，导致干扰素调节因子 3 (IRF3) 的募集和磷酸化。磷酸化的 IRF3 二聚化并进入细胞核，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 CDN 相关药物的体外效果评价。

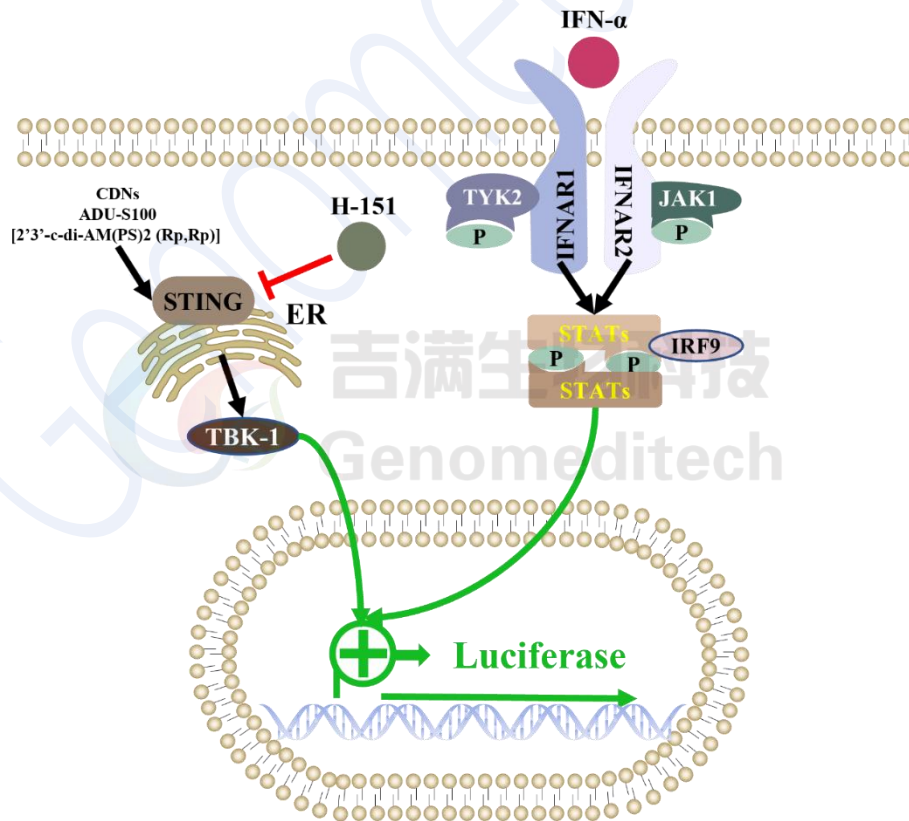


Fig 1.STING 原理图

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
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+25 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
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell BIOSCIENCES/C3010-0500
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
Luciferase Assay Kit	100 tests	Genomeditech/GM-040501A
ADU-S100	/	MCE/HY-12885A
H-151	/	MCE/HY-112693

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,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 × 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。

- 此细胞为单核细胞,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。

六、使用方法

1. ADU-S100 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 STING Reporter U937 Cell Line 细胞量为 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 22.5 μM ，1.5 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
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	ADU-S100	22.5 μM	15 μM	10 μM	6.67 μM	4.44 μM	2.96 μM	1.98 μM	1.32 μM	877.91 nM	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 h，将细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用 Assay Buffer 重悬，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 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上市板盖，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
ADU-S100	10 mM	1 mM	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer

- 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 157.6 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 μL 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 7.43 μL ADU-S100），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 110 μ L, 加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	7.43 μ L ADU-S100	157.6 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

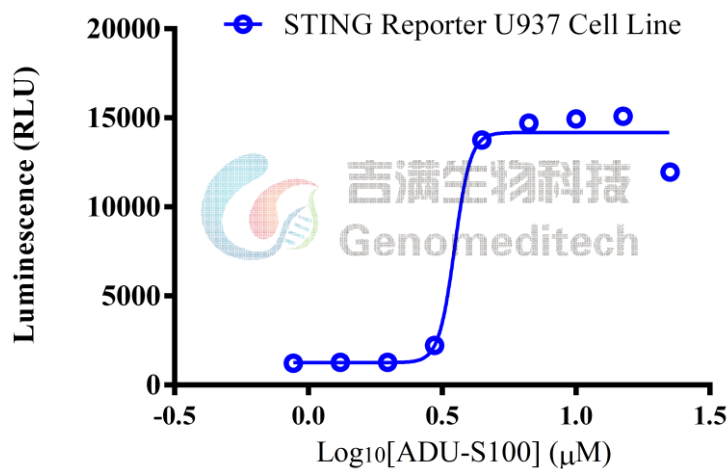
- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 110 μ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- i) 将步骤 a 孵育待用的孔板取出, 加入之前准备好的梯度稀释液, 每孔 50 μ L。
- j) 盖上班盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 7 h。
- k) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

STING Reporter U937 Cell Line	PBS Control	22.5 μ M	877.91 nM
	1177	11962	1226

3) 验证结果



	STING Reporter U937 Cell Line
EC50	3.520

Fig 2.ADU-S100 激活验证结果

2. H-151 抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 STING Reporter U937 Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 H-151 (279.34 Da) 作为抑制 STING 的阳性药物。Conc.01 浓度为 15 μ M，10 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。使用 ADU-S100 (734.51 Da) 作为激活 STING 的阳性药物。

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	H-151	15 μ M	1.5 μ M	150 nM	15 nM	1.5 nM	150 pM	15 pM	1.5 pM	150 fM	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 h，将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 3×10^6 cells/mL。以排枪加 33 μ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖上市盖，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
H-151	20 mM	0.2 mM	取 2 μ L 储液+198 μ L Assay Buffer

- 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 31.2 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 36.3 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 9.17 μ L H-151），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 4 μ L, 加入次孔										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	9.17 μ L H-151	加入	31.2 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	36.3 μ L	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 4 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 h 里稀释好的药物 33 μ L 加入到步骤 a 准备好的细胞悬液里, 孵育 1 h。
- j) 孵育的同时配置激活剂 (3 \times), 2 μ L 10 mM ADU-S100 药物加入到 1.894 mL Assay Buffer 中, 混匀后使用。
- k) 1 h 后, 将步骤 j 配置的激活剂加入到步骤 i 孵育过的孔板中, 每孔 33 μ L, 混匀后继续孵育 6 h。
- l) 7 h 后收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

STING Reporter U937 Cell Line	ADU-S100+0 μ M H-151	ADU-S100+15 μ M H-151	ADU-S100+150 fM H-151
		10972	2784

3) 验证结果

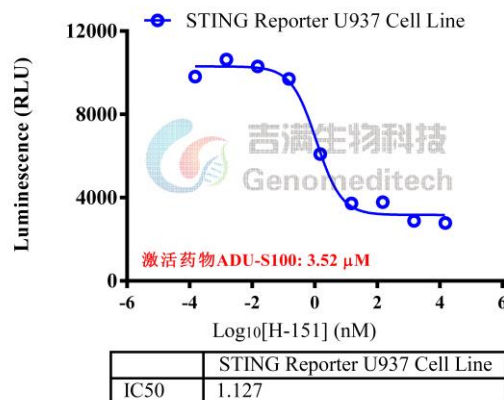


Fig 3.H-151 抑制验证结果

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