

## 产品手册

### NFkB Reporter Jurkat Cell Line

### NFkB 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：V2.12.3

## 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.      | 蛋白激活实验 .....         | 7 |
| 1)      | 加样步骤.....            | 7 |
| 2)      | 报告基因检测.....          | 8 |
| 3)      | 验证结果.....            | 8 |
| 附录 1:   | 稳定性验证.....           | 9 |
| 相关产品:   | .....                | 9 |
| 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-C24918 | NFKB 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-C24918 | NFKB 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

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。

NFKB Reporter Jurkat Cell Line 细胞系以 Jurkat 为工具细胞，采用慢病毒感染的方式，构建稳定表达 NF- $\kappa$ B-Luc 报告基因的细胞系，可用于检测 NF- $\kappa$ B 信号转导。在被促炎细胞因子或淋巴因子受体兴奋剂激活后，内源性 NF- $\kappa$ 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。

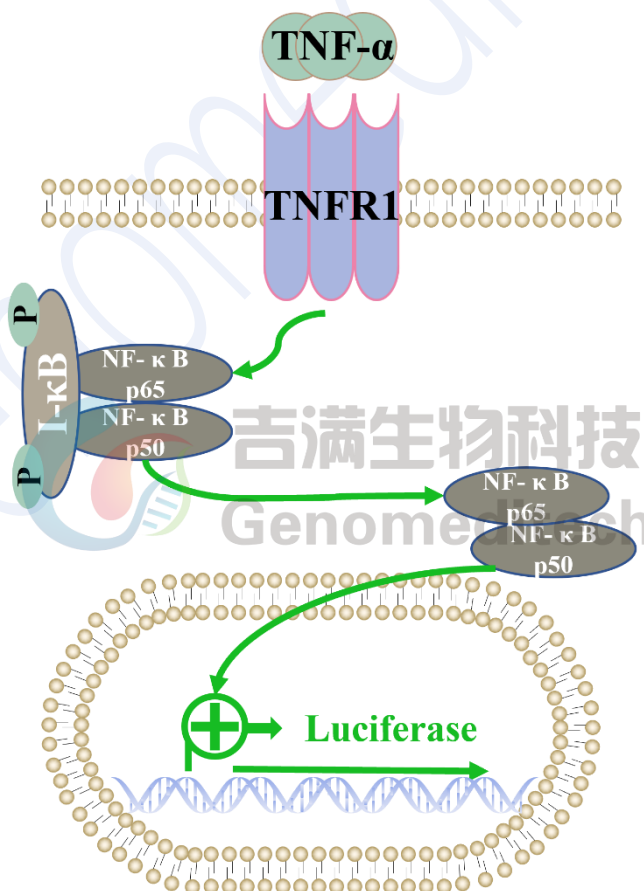


Fig 1.原理示意图

## 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+10%FBS+1%P.S                         |
| 细胞生长培养基:     | RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+3.5 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 |
|---------------------------------------------------|---------------|---------------------------|
| RPMI 1640                                         | 500 mL        | Gibco/C11875500BT         |
| Fetal Bovine Serum                                | 500 mL        | ExCell/FSP500             |
| Pen/Strep                                         | 100 mL        | Thermo/15140-122          |
| Blasticidin                                       | 10 mg         | Genomeditech/GM-040404-1  |
| GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit | 1000T         | Genomeditech/GM-040513C   |
| Recombinant Human TNF alpha                       | 10 µg         | Novoprotein/C008          |

#### 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 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  $176 \times g$ ，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  $5 \times 10^6$  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，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  $2 \times 10^6$  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

### 1. 蛋白激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 NFkB Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human TNF- $\alpha$ （以下简称 TNF- $\alpha$ ；17.5 KDa）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 3  $\mu\text{g/mL}$ ，5 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  $\mu\text{L}$  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 |     |
| B | human TNF- $\alpha$ | PBS | 3<br>$\mu\text{g/mL}$ | 600<br>$\text{ng/mL}$ | 120<br>$\text{ng/mL}$ | 24<br>$\text{ng/mL}$ | 4.8<br>$\text{ng/mL}$ | 960<br>$\text{pg/mL}$ | 192<br>$\text{pg/mL}$ | 38.4<br>$\text{pg/mL}$ | 7.68<br>$\text{pg/mL}$ | 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，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  $2 \times 10^6$  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。盖上班盖，于孵箱中孵育。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行）。
- 母液配置

| 药物名称          | 储液                   | 母液 | 配置方法   |
|---------------|----------------------|----|--------|
| TNF- $\alpha$ | 100 $\mu\text{g/mL}$ | /  | 直接使用储液 |

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 75  $\mu\text{L}$  的 Assay buffer，B3-B12 加入 55  $\mu\text{L}$  的 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 4.78  $\mu\text{L}$  TNF- $\alpha$ ）。

| 母液吸取 |                                  | 梯度稀释孔，依次从前孔吸取 15 $\mu\text{L}$ 加入次孔 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | 对照孔              |    |
|------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----|
|      |                                  | 1                                   | 2                | 3                | 4                | 5                | 6                | 7                | 8                | 9                | 10               | 11               | 12 |
| A    |                                  |                                     |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |    |
| B    | 4.78 $\mu\text{L}$ TNF- $\alpha$ | 加入                                  | 75 $\mu\text{L}$ | 60 $\mu\text{L}$ | 60 $\mu\text{L}$ | 60 $\mu\text{L}$ | 60 $\mu\text{L}$ | 60 $\mu\text{L}$ | 60 $\mu\text{L}$ | 60 $\mu\text{L}$ | 60 $\mu\text{L}$ | 60 $\mu\text{L}$ |    |
| C    |                                  |                                     |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |    |
| D    |                                  |                                     |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |    |
| E    |                                  |                                     |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |    |
| F    |                                  |                                     |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |    |
| G    |                                  |                                     |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |    |
| H    |                                  |                                     |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |    |

- g) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 15  $\mu\text{L}$  液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 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) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 50  $\mu\text{L}$ 。
- k) 盖上检测板盖，于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

| NFKB Reporter Jurkat Cell Line | 0 $\mu\text{g/mL}$ | 3 $\mu\text{g/mL}$ | 7.68 $\mu\text{g/mL}$ |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
|                                | 2285               | 294427             | 2381                  |

## 3) 验证结果

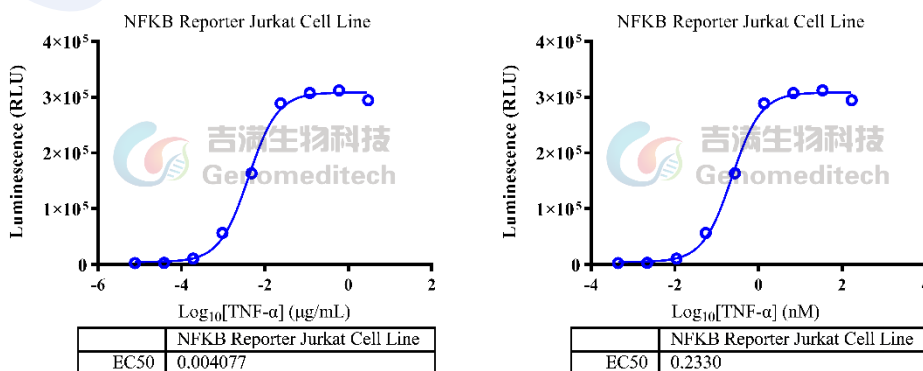


Fig.2 功能验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）



## 附录 1：稳定性验证

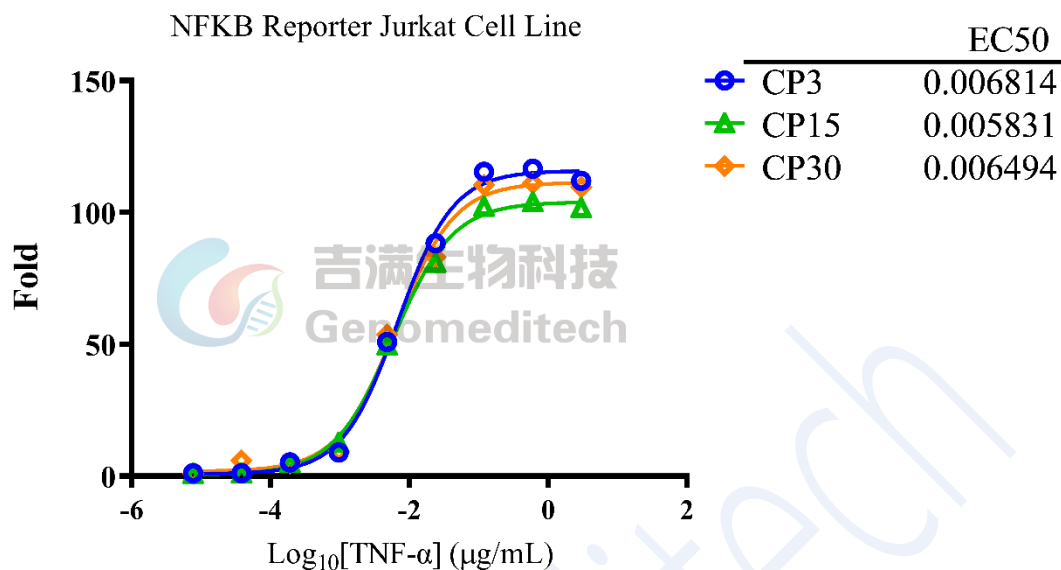


Fig.3 稳定性验证结果

## 相关产品：

| NFKB                         |                                 |
|------------------------------|---------------------------------|
| NFKB Reporter A549 Cell Line | NFKB Reporter HEK-293 Cell Line |
| NFKB Reporter TF-1 Cell Line | NFKB Reporter THP1 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。