

产品手册

TCF LEF Reporter HEK-293 Cell Line

TCF LEF Reporter HEK-293 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.11.1

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.....	错误!未定义书签。
2.	细胞传代.....	错误!未定义书签。
3.	细胞冻存.....	错误!未定义书签。
六、	使用方法.....	7
1.	激活剂验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	Wnt-3a 激活, DKK-1 抑制实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	11
附录 1:	稳定性验证.....	12
相关产品.....		12
使用许可协议:		13

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-C29875	TCF LEF Reporter HEK-293 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C29875	TCF LEF Reporter HEK-293 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

β -catenin 是一种重要的细胞蛋白，参与细胞粘附和信号传导。在细胞膜上， β -catenin 与钙黏蛋白 (cadherins) 结合，形成粘附连接并连接细胞骨架；同时， β -catenin 也是 WNT 信号通路的关键组成部分。其稳定性和活性受到降解复合体和多种信号通路的调控。在经典的 WNT 信号通路中，当 WNT 蛋白 (如 Wnt3a) 激活 Frizzled 受体及其共受体 LRP5/6 时，降解复合体被抑制， β -catenin 得以稳定并在细胞质中积累，随后转移到细胞核。在核内， β -catenin 与 TCF/LEF 转录因子结合，激活与细胞增殖、分化和存活相关的基因表达。

吉满生物 TCF LEF Reporter HEK-293 Cell Line 报告基因细胞系，是基于 Wnt 信号通路构建信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。Wnt3a 蛋白通过激活 Frizzled 受体及其共受体，抑制 β -catenin 的降解，促使其转移到细胞核，与 TCF/LEF 转录因子结合，激活下游信号通路并诱导荧光素酶的表达。通过测量荧光素酶活性，可以灵敏地指示信号通路的激活水平，从而用于评估 WNT 相关药物的体外作用效果。

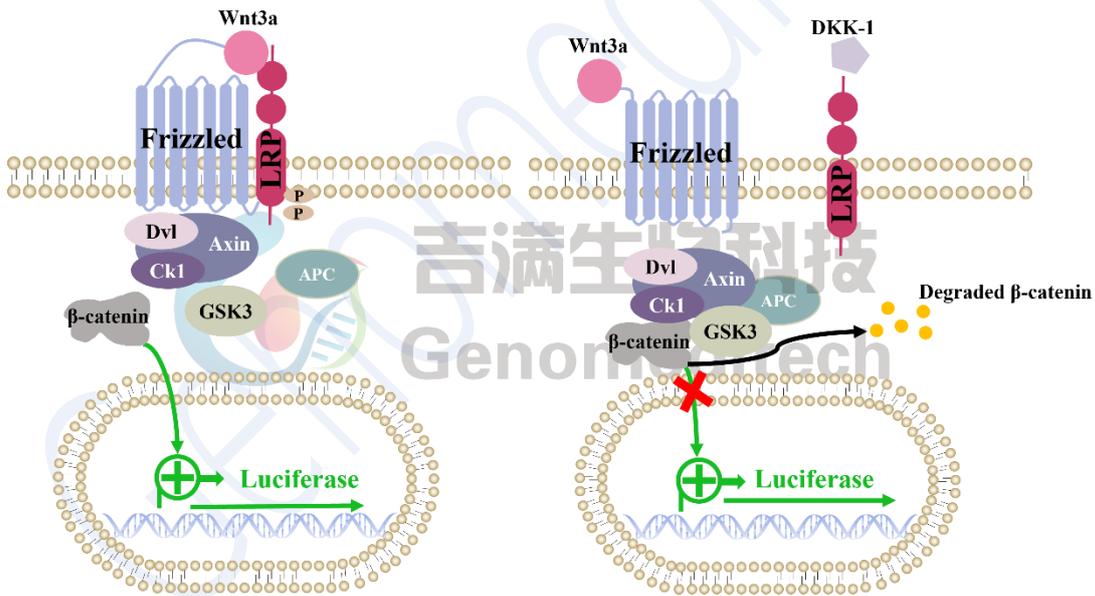


Fig 1.原理示意图

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:	DMEM+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S+4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin
细胞冻存培养基:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	DMEM+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
DMEM	500 mL	gibco/C11995500BT
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
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C
Recombinant Human Wnt-3a	10 μg	R&D/5036-WN
Recombinant Human DKK-1 Protein (His Tag), HPLC-verified	20 μg	SinoBiological/10170-H08H

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

注：为确保最高存活率，应在收到冻存细胞后立即解冻并复苏培养。如果在收到细胞后需要继续储存，将其置于液氮罐中，严禁储存在 -70°C ，因为在 -70°C 下储存会导致活性丧失。

- 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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，活细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $2-3 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中。

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（以 10 cm 皿为例）

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。

- 细胞为上皮细胞，贴壁生长。培养箱中孵育 16-24 h 后，镜下观察细胞贴壁情况，当细胞密度达到 80%，需要进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 天传代。注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- 将皿或培养瓶中的培养液弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液，37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30-60 s，显微镜下观察。
- 待细胞变圆，细胞间隙明显，部分细胞刚开始脱离瓶壁时，加 2 mL 左右生长培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，176 \times g 室温离心 3 min。

注意事项：

- 细胞刚复苏，死细胞较多，属于正常现象，经调整会有明显好转，状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定。
- 注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- FBS 血清需 56 $^{\circ}\text{C}$ 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. 激活剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 TCF LEF Reporter HEK-293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human Wnt-3a (以下简称为 Wnt3a; 37.4 kDa) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 $3.33 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.9 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	PBS	
B	Wnt3a	PBS	3.33 $\mu\text{g/ml}$	1.11 $\mu\text{g/ml}$	370 ng/mL	123.33 ng/mL	41.11 ng/mL	13.7 ng/mL	4.57 ng/mL	1.52 ng/ml	507.54 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 16-24 h，将细胞从培养瓶中取出，消化离心收集细胞沉淀，使用适量完全培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以完全培养基调整细胞浓度为 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜使用。
- 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
Wnt3a	0.2 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 $162.25 \mu\text{L}$ Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 $110 \mu\text{L}$ 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 2.75 μL Wnt3a），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 55 μL ，加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B	2.75 μL Wnt3a	加入	162.25 μL	110 μL									
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 55 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 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100 μL 培养基。
j) 加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100 μL 。
k) 盖上班盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 16 h。
l) 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。

TCF LEF Reporter HEK-293 Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	3.33 $\mu\text{g/ml}$	507.54 pg/mL
	332763	37695868	320384

3) 验证结果

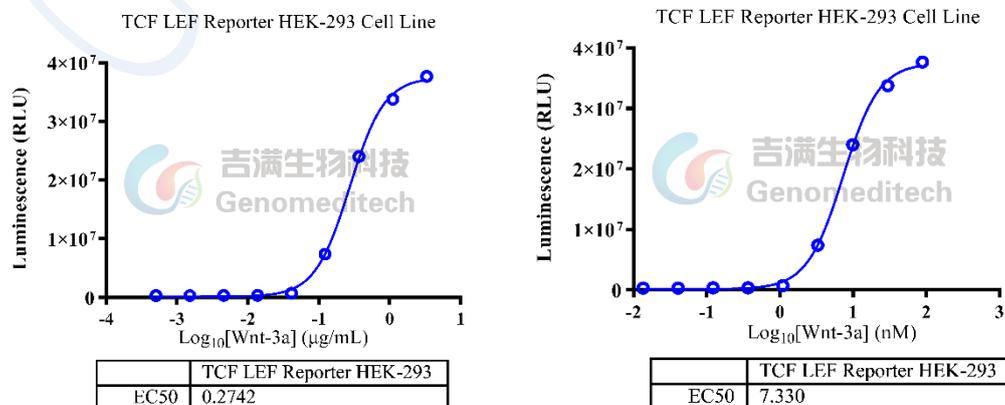


Fig 2.功能验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. Wnt-3a 激活, DKK-1 抑制实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 TCF LEF Reporter HEK-293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。使用 Recombinant Human DKK-1 Protein 作为阳性药物(以下简称为 DKK-1; 27.22 kDa), Conc.01 终浓度为 $30 \mu\text{g/mL}$, 3 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照。周围为 $100 \mu\text{L}$ PBS, 以防止边孔蒸发。

孔板布局:

	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	DKK-1	PBS	30 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	3.33 $\mu\text{g/mL}$	1.11 $\mu\text{g/mL}$	370.37 ng/mL	123.46 ng/mL	41.15 ng/mL	13.72 ng/mL	4.57 ng/mL	0 ng/mL	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 16-24 h, 将细胞从培养瓶中取出, 消化离心收集细胞沉淀, 使用适量完全培养基重悬细胞, 检测细胞活力并计数, 再以完全培养基调整细胞浓度为 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B10)。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
DKK-1	0.25 mg/mL	/	直接使用储液
Wnt-3a	200 $\mu\text{g/mL}$	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 $62.70 \mu\text{L}$ Assay Buffer, B2-B11 孔, 加入 $55 \mu\text{L}$ 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 $19.80 \mu\text{L}$ DKK-1), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 27.50 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	19.80 μL DKK-1	加入	62.70 μL	55 μL									
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.50 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- i) 配置 2 \times 激活剂: 600 ng/mL Wnt-3a (1.82 μL 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Wnt-3a 母液加入到 603.19 μL Assay Buffer 中，混匀后使用)。
- j) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出，吸弃上清。然后加入梯度稀释的抗体溶液，每孔加入 50 μL 混匀，盖上盖板放入培养箱孵育 1 h。
- k) 1 h 后取出步骤 j 孵育好的混合溶液孔板，然后每孔各加入 50 μL 的 Wnt-3a 溶液。盖上盖板，继续孵育 16 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。

TCF LEF Reporter HEK-293 Cell Line	300 ng/mL Wnt-3a + 0 ng/mL	300 ng/mL Wnt-3a + 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	300 ng/mL Wnt-3a + 4.57 ng/mL
	8767516	167614	8976957

3) 验证结果

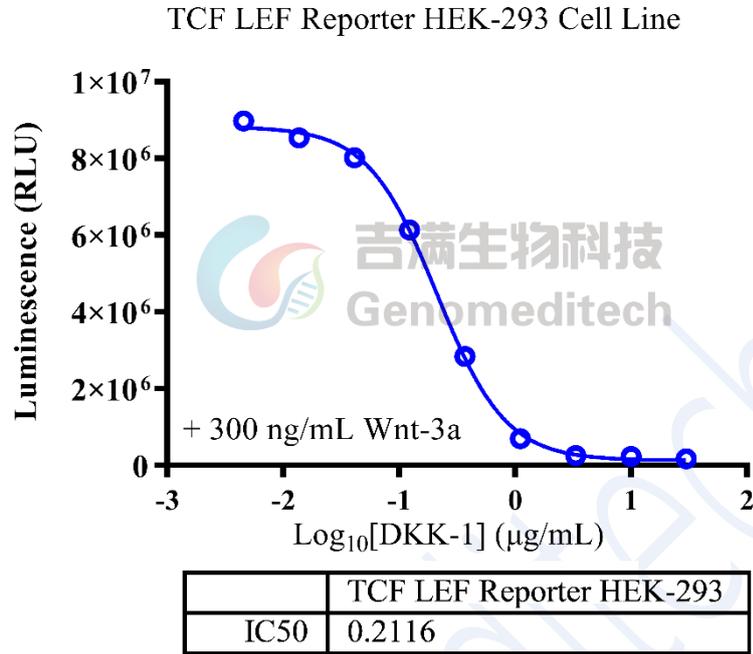


Fig 3. 功能验证结果

附录 1：稳定性验证

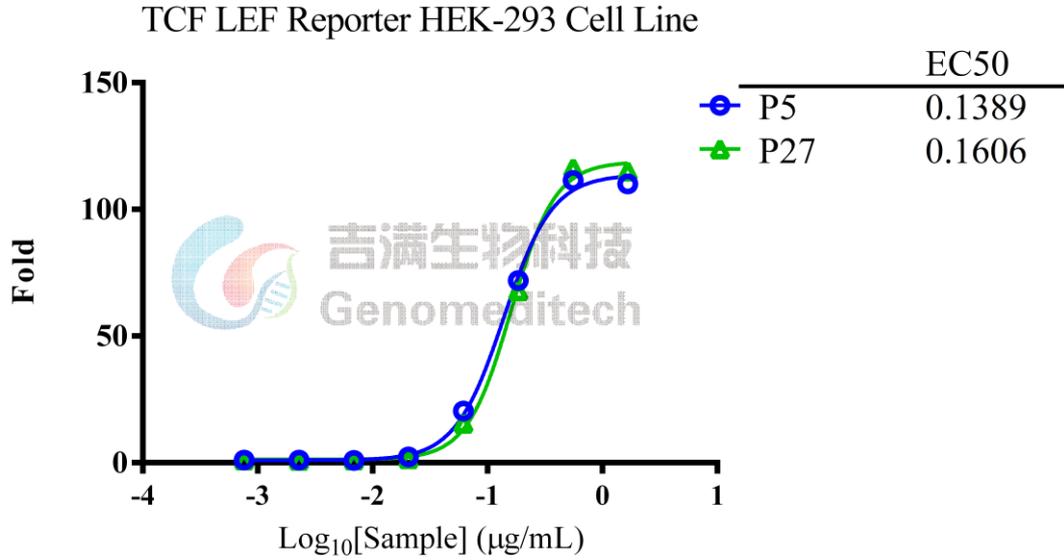


Fig 4. P5、P27 稳定性验证结果（纵坐标转化为倍率）

相关产品

Wnt pathway	
H_CKAP4 CHO-K1 Cell Line	

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