ISRE-Luc/NFκB-SEAP/THP-1

CBP74097

操作说明书

4008-750-250

目录

1. 背景信息 1
2. 产品介绍 1
3. 细胞基本信息 2
4. 主要仪器试剂耗材 2
5. 细胞培养 3
   5.1 细胞复苏 3
   5.2 细胞传代 3
   5.3 细胞冻存 3
6. 细胞实验流程 3
   6.1 STING Stimulation Assay 3
7. 数据展示 5
8. 相关产品 6

1. 背景信息

STING（干扰素基因刺激因子）又称 MPYS、TMEM173、MITA 和 ERIS，是一种跨膜蛋白，最初被认为是一种通过胞质 DNA 传感器（CDS）介导信号传递的衔接蛋白，后来被发现是环状二核苷酸（CDN）的直接传感器。CDN 是细菌信号转导中普遍存在的第二信使分子，是哺乳动物细胞的防御触发器。当细菌病原体攻击时，释放到细胞中的 CDN 直接与 STING 结合，使其通常处于自我抑制状态的 152-173 位区域（dimerization domain，DD）交联二聚体构像发生变化并被激活，进而招募细胞质中的 TANK 结合激酶 1（TBK1），介导的 IRF3 激活，导致干扰素（interferon，IFN）-β 和其它多种细胞素（cytokines）的形成。IFN β 的产生是 STING 活化的标志。肿瘤微环境（TME）中由于天然免疫产生的信号传导是导致肿瘤特异性 T 细胞激活和肿瘤浸润性淋巴细胞（TIL）浸润的关键因素。其中尤其以 I 型 IFN 对肿瘤特异性 T 细胞的活化最为关键。因此，STING 激动剂可以通过诱导Ⅰ型干扰素基因的表达，激活包括树突状细胞等免疫刺激细胞，改变肿瘤微环境并诱导肿瘤特异性 T 细胞的产生，从而通过调节免疫系统达到抗肿瘤的目的。

2. 产品介绍

针对 STING 激动剂和拮抗剂的药物发现，利用 STING 蛋白调控干扰素（interferon，IFN）及其下游基因表达的原理，科佰分别构建了带有干扰素刺激反应元件（ISRE）的人源及小鼠报告基因细胞系可用于 STING 拮抗剂和抑制剂的筛选。

在 THP-1 细胞上构建了 2 个诱导型的报告基因系统，一个是干扰素刺激反应元件（ISRE），下游接入 Luc 的分泌型荧光素酶，可以在底物的刺激下，催下产生化学发光信号，该报告基因可以评估 IFR 通路，比如 type I IFNs and RLR (RIG-I-like receptor), CDS (cytosolic dsDNA sensor) or STING agonists；另外一个是 NFkB 通路，下游接入分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP) 报告基因，可以响应与 NFkB 通路相关的一些刺激。

报告基因细胞模型可以很好的反映分子作用机制，同时具备更小的变异性和更好的可操作性，已被中检院及药企广泛应用于抗体药物生物活性的检定，对于药物研发、质量控制、批次放行都有重要意义。

ISRE-Luc/NFκB-SEAP/THP-1 报告基因药靶模型很好模拟信号转导过程，原理见图 1 所示。

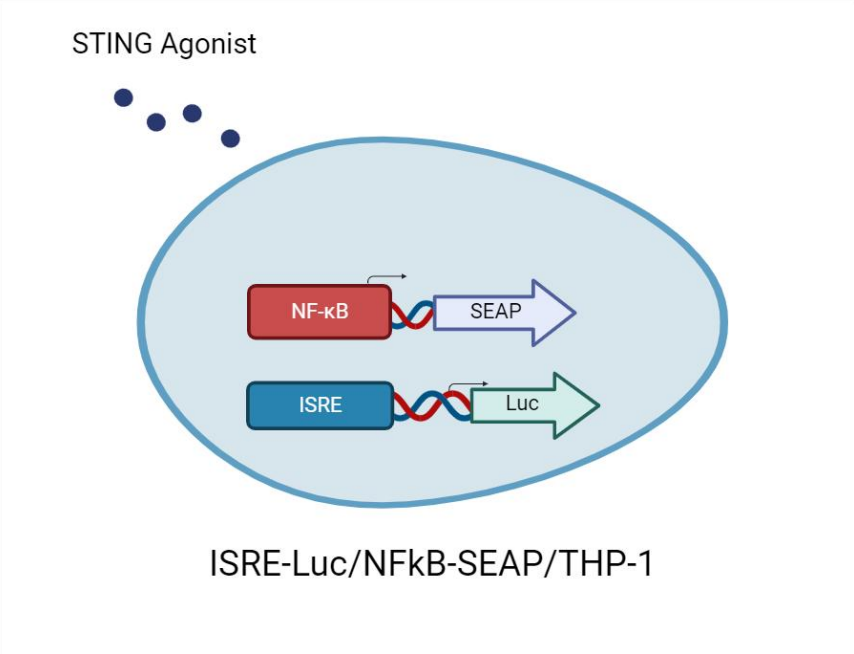

图 1: ISRE-Luc/NFκB-SEAP/THP-1 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

母细胞: THP-1

表达基因: ISRE-Luc,NFκB-SEAP

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+10 μg/ml of blasticidin+ 100 μg/ml of Zeocin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态：悬浮

支原体检测: 阴性

稳定性: 32 代（室内测试结果，不表示超过 32 代以上不稳定）

保存条件: 液氮保存

应用: 细胞水平 STING 激活剂或抑制剂的活性检测，可用于高通量筛选或 QC 放行

4. 主要仪器试剂耗材

名称	品牌	货号
ISRE-Luc/NFκB-SEAP/THP-1 完全培养基	Cobioer	CBP74097M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
QUANTI-Blue™ Solution	Invivogen	rep-qbs1

96 Well Assay Plate (White Plate, Clear Bottom with Lid Tissue Culture Treated Polystyrene 1/Pack)	Costar	3610
Synergy H1 多功能酶标仪	Biotek	/

5. 细胞培养

5.1 细胞复苏

1) 在 37°C 水浴中快速融化细胞约 60 秒。 一旦细胞解冻（可能比 60 秒稍快或稍慢），快速将冻存管中的细胞吸入装有 10 ml 预热 ISRE-Luc/NFFκB-SEAP/THP-1 完全培养基的 15 ml 离心管中。
2) 1000 转、5 分钟离心细胞，除去培养基并将细胞重悬于 5ml 预热的完全培养基中。
3) 调整细胞密度到 3-6 x 10^5 cells/ml，加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO2 培养箱中。

5.2 细胞传代

每 1-2 天取细胞悬液计数，当密度大于 1x 10^6 cells/ml 时,请及时传代或补加新鲜完全培养基. 保持细胞密度在 1x 10^5 - 1x 10^6 cells/ml 之间。

5.3 细胞冻存

取 4-8x10^6 细胞离心后弃上清。加 1ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入细胞冻存管。立即放入细胞冻存盒（Nalgene 5100-0001），加异丙醇到刻度线，放-80°C 冰箱。24 小时后将冻存管转到液氮中长期保存。

6. 细胞实验流程

6.1 STING Stimulation Assay

STING Stimulation Assay 由报告细胞 ISRE-Luc/NFκB-SEAP/THP-1， Cat. #CBP74097 开展，本实验中使用 2’3-cGAMP 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

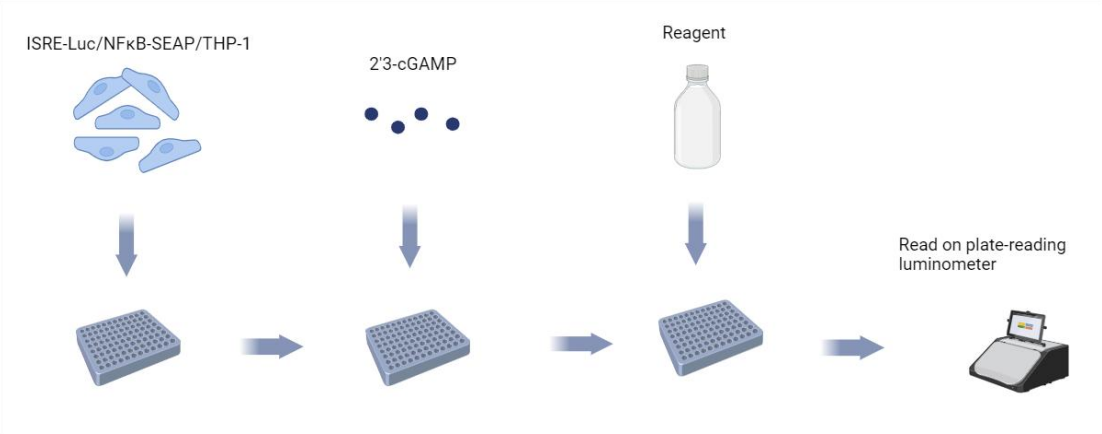

图 2:　STING Stimulation Assay 流程示意图

1) 取对数期生长的 ISRE-Luc/NFκB-SEAP/THP-1 细胞离心去上清，重悬于新鲜 RPMI-1640+10%FBS 培养基中，细胞密度调整为 $5x10^5$ Cells/ml。
2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中，180ul/孔细胞悬液。
3) 用 RPMI1640+10%FBS 培养基对样品进行梯度，加入梯度稀释的 10*浓度样品 （20 ul/孔）到接种好细胞的 96 孔板中，样品从最高浓度开始，3 倍稀释 11 个浓度梯度，每个浓度设置双复孔或三复孔，并设置 0 浓度对照，继续在 37°C 细胞培养箱培养 18 到 24 小时。（注意：样品浓度及梯度设置跟样品本身的特性及客户的实验需求高度相关，客户应根据自身的实际情况优化设置，我们不做具体推荐，本梯度稀释方案仅适用我们本次验证实验涉及样本）
4) 将 96 孔板从培养箱中取出，加入 180ul/孔 QUANTI-Blue™ Solution，Cat.#rep-qbs1，再添加 20ul/孔 ISRE-Luc/NFκB-SEAP/THP-1 细胞上清液，继续在 37°C 细胞培养箱培养 1 到 6 小时。
5) 在 620-655nm 下测定 SEAP 水平，根据每个梯度浓度孔对应的读值，利用 Prism Graphpad 软件拟合样品对细胞激活的梯度曲线，并且计算样品的 EC50。

孔板排布：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
B	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
C	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
D	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
E	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
F	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
G	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
H	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照

图 3:　96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

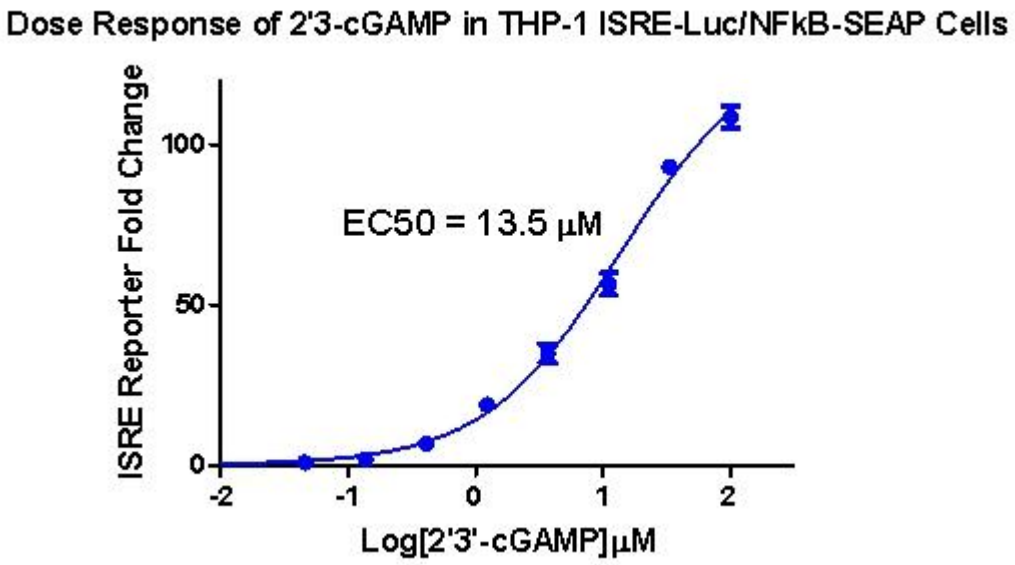

图 4：STING Stimulation Assay 验证结果

8. 相关产品

名称	货号
ISRE-Luc/NFκB-SEAP/THP-1_STING KO cell	CBP74197
ISRE-Luc/Raw264.7	CBP74098