

产品手册

STING Reporter THP1 Cell Line

STING 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：V2.12.2

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	6
2.	细胞传代	6
3.	细胞冻存	6
六、	使用方法（示例）	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	9
相关产品	10
使用许可协议:	10

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-C21640	STING 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-C21640	STING 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. 本产品相关实验，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 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。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。

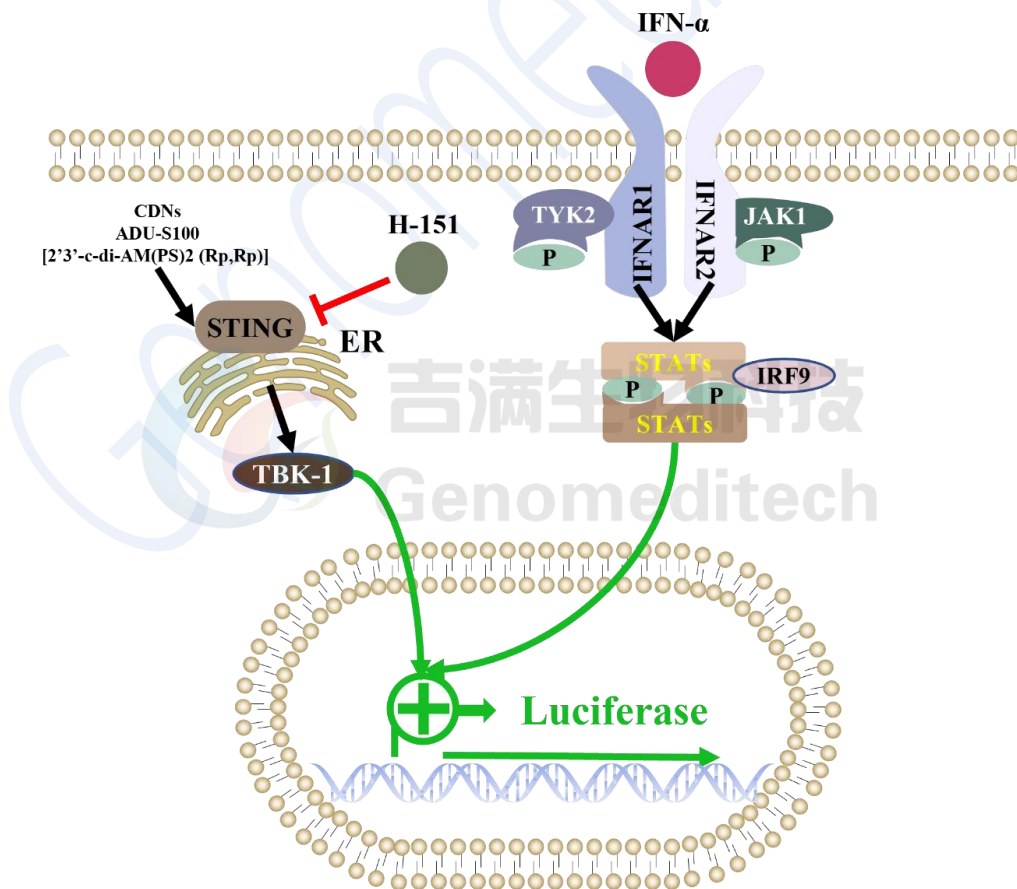


Fig 1.STING 原理图

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(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
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.
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
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 Flat Bottom Polystyrene Not Treated	96-well	Corning/3912
Microplate		
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	Genomeditech/GM-040513C
ADU-S100	/	MCE/HY-12885A

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

注意事项: 细胞复苏过程中不要频繁取出观察, 复苏后 3 代内使用 20%FBS, 之后降为 10%FBS。该细胞存在密度依赖, 按照 $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cells/mL 的密度传至 T25 瓶中, 培养体系约为 3-8 mL。

- 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 5 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 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 3 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, 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:

- 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。等到细胞倍增率稳定后再用于检测或冻存, 一般在 7-10 天左右。
- 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。
- 细胞较难复苏, 复苏后活率约 60%-80%, 复苏后需要培养 5-7 天才能恢复正常生长。
- FBS 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（示例）

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 THP1 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 15 μ M，2 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.10 分别排布在 B2-B11，B12 为 0 浓度对照。B2-B12 孔周围为 100 μ 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	ADU-S100	15 μ M	7.5 μ M	3.75 μ M	1.88 μ M	937.5 nM	468.75 nM	234.38 nM	117.19 nM	58.59 nM	29.30 nM	0
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 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。盖上市盖，于孵箱中孵育待用。
- 使用 1 个无菌 96 孔板准备药物稀释。
- 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	5 mM	0.5 mM	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 120 μ L Assay Buffer，B3-B12 孔，加入 60 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 7.42 μ L ADU-S100），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 60 μ L, 加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	7.42 μ L ADU-S100	加入	120 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 60 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 10 个梯度稀释孔 (B11)。
- 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 Reporter THP1 Cell	0 μ M	15 μ M	29.30 nM
Line	104582	382429	112057

3) 验证结果

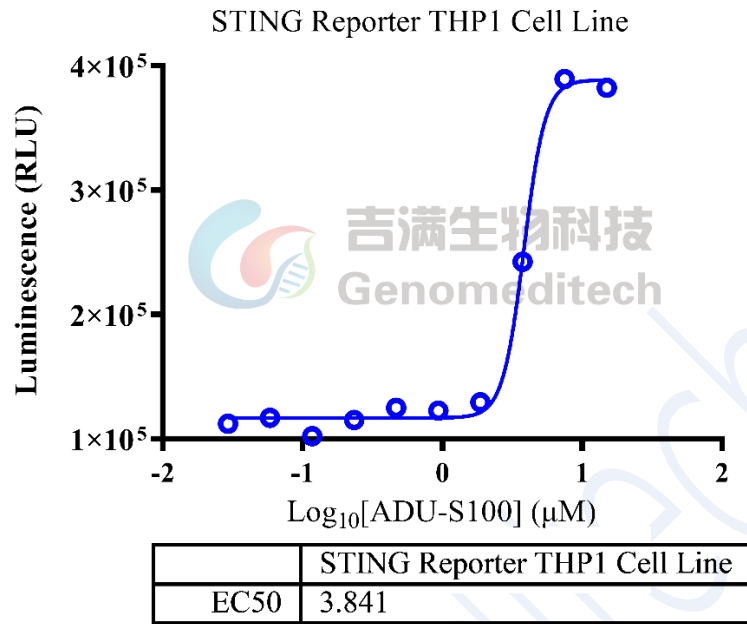


Fig 2. Response to ADU-S100 disodium salt. The STING Reporter THP1 Cell Line (Cat. GM-C21640) at a concentration of 1E5 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of ADU-S100 disodium salt (MCE/HY-12885A) in assay buffer (RPMI 1640(ATCC) + 1% FBS + 1% P.S) for 16 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [3.7]. Data are shown by drug molar concentration.

相关产品

TLR2	
H_TLR2 Reporter 293 Cell Line	
TLR7	
H_TLR7 Reporter 293 Cell Line	Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line
TLR9	
H_TLR9 Reporter 293 Cell Line	Mouse_TLR9 Reporter 293 Cell Line
TLR8	
H_TLR8 Reporter 293 Cell Line	H_TLR8 HEK-293 Cell Line
STING	
H_STING KO THP1 Cell Line	H_STING KO U937 Cell Line
STING KO Reporter THP1 Cell Line	STING Reporter HEK-293 Cell Line
STING Reporter U937 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。