

## 产品手册

### NFKB Reporter A549 Cell Line

### NFKB Reporter A549 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.1

## 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 .....	6
2.	细胞传代（以 10 cm 皿为例） .....	6
3.	细胞冻存 .....	6
六、	使用方法（示例） .....	7
1.	Assay 验证实验（TNF-a） .....	7
1)	加样步骤 .....	7
2)	报告基因检测 .....	8
3)	验证结果 .....	8
2.	Assay 验证实验（IL-1 beta/IL1B） .....	9
1)	加样步骤 .....	9
2)	报告基因检测 .....	10
3)	验证结果 .....	10
	相关产品 .....	11
	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-C40225	NFKB Reporter A549 Cell Line	5E6 Cells/mL

### 组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C40225	NFKB Reporter A549 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。

吉满生物 NF $\kappa$ B Reporter A549 Cell Line 是一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 TNF- $\alpha$  等配体结合受体后，激活下游信号通路，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 NF- $\kappa$ B 通路的激活效果评价。

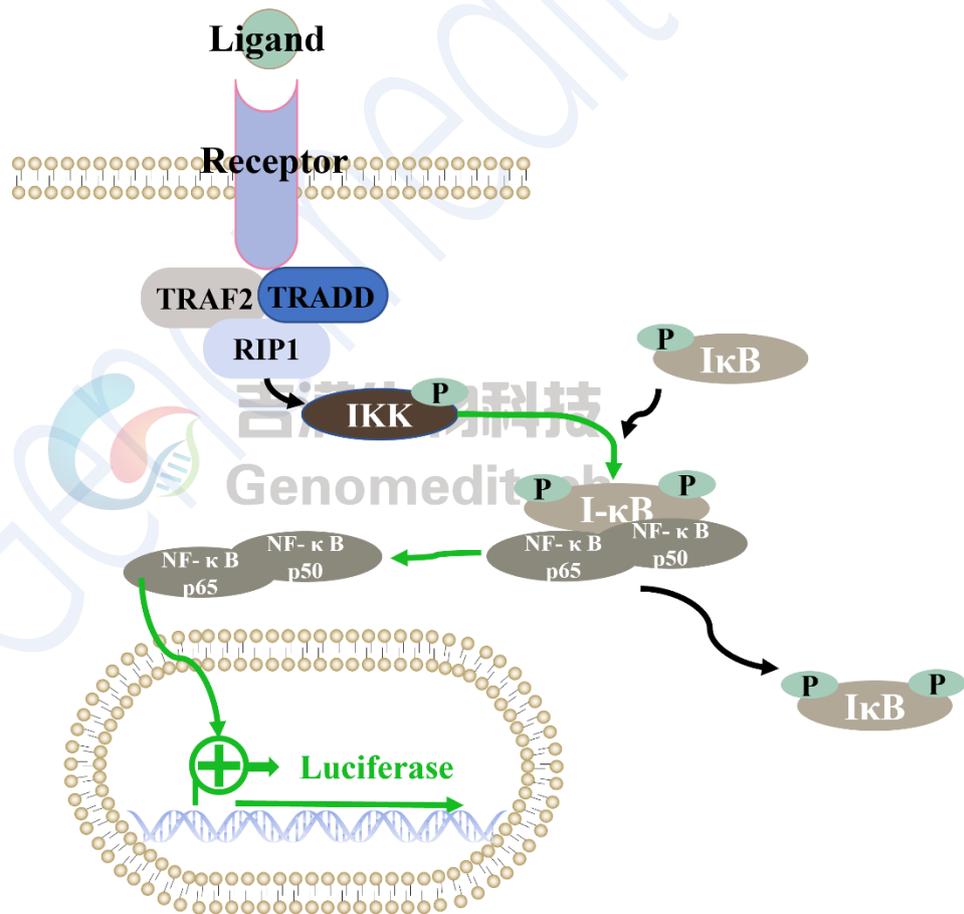


Fig 1. 经典 NF- $\kappa$ B 通路示意图

## 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:	F12K+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	F12K+10% FBS+1% P.S+10 µg/mL Blasticidin
细胞冻存液:	90% FBS + 10% DMSO
Assay Buffer:	F12K+1% FBS+1% P.S

### 2. 试剂耗材准备

#### 试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
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		
Recombinant Human TNF alpha	/	Novoprotein/C008
Recombinant Human IL-1 beta Protein, HPLC-verified	/	SinoBiological/10139-HNAE
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	/	Genomeditech/GM-040513

#### 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恒温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晃解冻，直到刚刚融化（通常 2-3 分钟）。
- 用 75%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 5 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  $\geq 2 \times 10^6$  cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到  $1-1.5 \times 10^5$  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 × 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  $3 \times 10^6$  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（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。**

- 此细胞呈上皮细胞样，贴壁生长。培养箱中孵育 16-24 h 后，镜下观察细胞贴壁情况。当细胞密度大于 80%，即可进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:2-1:3，2-3 天传代。
- 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°C 消化 3-5 min，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 × g 室温离心 3 min。
- 弃上清，细胞沉淀用生长培养基重悬，根据传代前细胞密度分盘（根据培养皿面积和细胞密度计算，传代后细胞密度为 30-40%）。

**注意事项：**

- A549 细胞不能过度拥挤。**
- 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（示例）

### 1. Assay 验证实验（TNF-a）

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 NFKB Reporter A549 Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^4$  Cells/孔。激活剂 Recombinant Human TNF-a（17.5 kD，以下简称 Human TNF-a）起始浓度(Conc.01)为  $1 \mu\text{g/mL}$ ，5 倍梯度稀释。对应 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	Human TNF-a	1 $\mu\text{g/mL}$	200 $\text{ng/mL}$	40 $\text{ng/mL}$	8 $\text{ng/mL}$	1.6 $\text{ng/mL}$	320 $\text{pg/mL}$	64 $\text{pg/mL}$	12.8 $\text{pg/mL}$	2.56 $\text{pg/mL}$	0	PBS
C		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，离心收集细胞沉淀，使用完全培养基重悬，检测细胞活力并计数，再以完全培养基调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  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。盖板上盖，于孵箱中孵育过夜。
- 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-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human TNF-a	$100 \mu\text{g/mL}$	/	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  $150 \mu\text{L}$  Assay Buffer，B3-B11 孔，加入  $120 \mu\text{L}$  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  $1.52 \mu\text{L}$  Human TNF-a），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 30 $\mu$ L, 加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.52 $\mu$ L Human TNF-a	加入	150 $\mu$ L	120 $\mu$ L									

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 30  $\mu$ L, 加入到第 2 个梯度稀释孔 B3, 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至最后一个梯度稀释孔 (B10)。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出, 吸弃上清。
- j) 加入步骤 h 准备好的梯度稀释液, 每孔 100  $\mu$ L。
- k) 盖上班盖, 于 37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 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。

NFkB Reporter A549 Cell Line	0 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL	2.56 pg/mL
	28024	2640373	30695

## 3) 验证结果

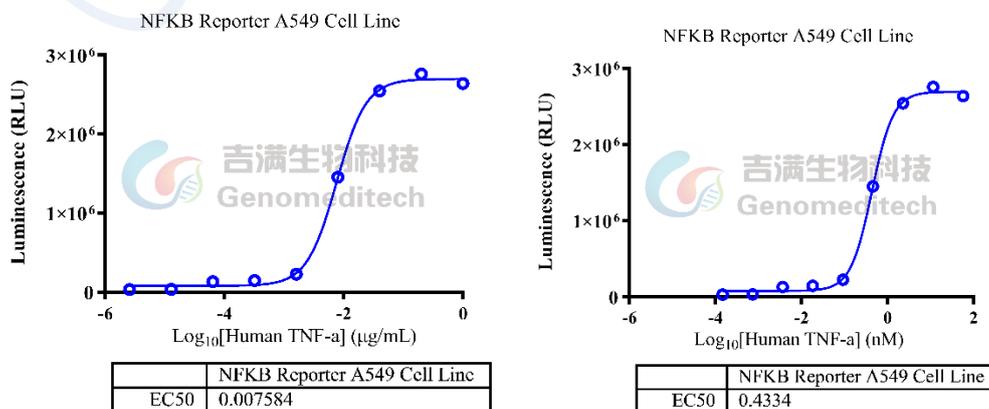


Fig 2. 验证结果 (右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 2. Assay 验证实验 (IL-1 beta/IL1B)

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 NFkB Reporter A549 Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^4$  Cells/孔。激活剂 Recombinant Human IL-1 beta Protein, HPLC-verified (17 kD, 以下简称 Human IL-1 beta/IL1B) 起始终浓度(Conc.01)为 500 pg/mL, 4 倍梯度稀释。对应 Conc.01-Conc.09, 分别排布在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照。周围为 100  $\mu$ 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	Human IL-1 beta/IL1B	500 pg/mL	125 pg/mL	31.25 pg/mL	7.81 pg/mL	1.95 pg/mL	488.28 fg/mL	122.07 fg/mL	30.52 fg/mL	7.63 fg/mL	0	PBS
C		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, 离心收集细胞沉淀, 使用完全培养基重悬, 检测细胞活力并计数, 再以完全培养基调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加 100  $\mu$ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu$ L PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物, 使用一行 (如 B2-B10)。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human IL-1 beta/IL1B	0.25 mg/mL	0.25 $\mu$ g/mL	取 2 $\mu$ L 储液+1998 $\mu$ 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 146.37  $\mu$ L Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 120  $\mu$ 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 0.29  $\mu$ L Human IL-1 beta/IL1B), 混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 40 $\mu$ L，加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.29 $\mu$ L Human IL-1 beta/IL1B	加入	146.37 $\mu$ L	120 $\mu$ L									

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 40  $\mu$ L，加入到第 2 个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至最后一个梯度稀释孔 (B10)。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。
- j) 加入步骤 h 准备好的梯度稀释液，每孔 100  $\mu$ L。
- k) 盖上班盖，于 37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 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。

NFkB Reporter A549 Cell Line	0 $\mu$ g/mL	500 pg/mL	7.63 fg/mL
	67806	17192134	77162

## 3) 验证结果

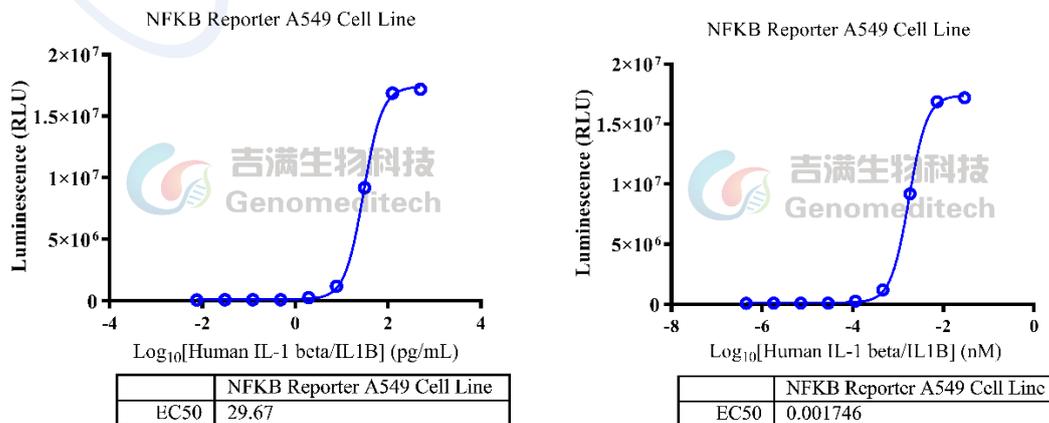


Fig 3. 验证结果 (右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 相关产品

NFkB	
<a href="#">NFkB Reporter HEK-293 Cell Line</a>	<a href="#">NFkB Reporter Jurkat Cell Line</a>
<a href="#">NFkB Reporter TF-1 Cell Line</a>	<a href="#">NFkB Reporter THP1 Cell Line</a>

## 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。