

## 产品手册

### IFN $\alpha$ Reporter THP1 Cell Line

### IFN $\alpha$ 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：V2.9.1

## 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（20%FBS）.....         | 6 |
| 2. | 细胞传代.....                 | 6 |
| 3. | 细胞冻存.....                 | 6 |
| 六、 | 使用方法.....                 | 7 |
| 1. | IFN- $\alpha$ 2 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 |
|    | 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-C26128 | IFN $\alpha$ 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-C26128 | IFN $\alpha$ 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

IFN- $\alpha$  由多种细胞类型分泌，通过刺激巨噬细胞和 NK 细胞引发抗病毒反应，且具有抗肿瘤活性。IFN- $\alpha$  通过改变下丘脑中热敏神经元的活动而充当致热因子，从而引起发烧。运用类似的机制，IFN- $\alpha$  可以用来减轻疼痛，与  $\mu$ -阿片受体相互作用，起到镇痛剂的作用。

所有 I 型干扰素 (IFN:IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\epsilon$ 、IFN- $\kappa$  和 IFN- $\omega$ ) 都与人体细胞表面的一个共同受体结合，该受体被称为 I 型 IFN 受体。I 型 IFN 受体由两个亚基 IFNAR1 和 IFNAR2 组成，它们分别与 Janus 活化激酶 (JAK) 酪氨酸激酶 2 (TYK2) 和 JAK1 相关。与 I 型 IFN 受体相关的 JAK 的激活导致 STAT2 和 STAT1 的酪氨酸磷酸化；这导致 STAT1-STAT2-IRF9 复合物的形成，它们被称为 ISGF3 (干扰素刺激基因 (ISG) 因子 3) 复合物。这些复合物易位到细胞核并结合 DNA 中的 IFN 刺激反应元件以启动基因转录。

吉满生物 IFN $\alpha$  Reporter THP1 Cell Line 报告基因细胞系，是基于 STATs 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 IFN- $\alpha$  结合 I 型 IFN 受体 (IFNAR1 和 IFNAR2) 后，导致信号通路激活，形成 ISGF3 复合物，复合物易位到细胞核并结合 DNA 中的 IFN 刺激反应元件，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 IFN $\alpha$  相关药物的体外效果评价。

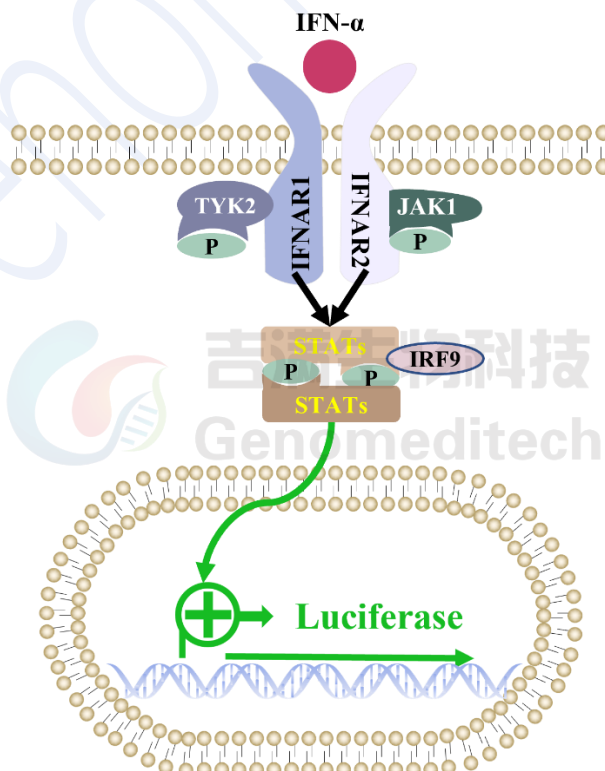


Fig 1. IFN $\alpha$  原理图

## 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 $\beta$ -Me                          |
| 细胞生长培养基:      | RPMI 1640(ATCC)+10% FBS+1% P.S+0.05 mM $\beta$ -Me+2 $\mu$ 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        | Cegrogen biotech/A0500-3010 |
| RPMI 1640  | 500 mL        | ATCC/30-2001                |
| 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                |
| Passive Lysis 5X Buffer                                      | 30 mL         | Promega/E1941               |
| Firely Luciferase Assay Reagent                              | 100 mL        | Genomeditech/G0483M002      |
| Recombinant Human IFN- $\alpha$ 2 (carrier-free)             | 10 $\mu$ g    | BioLegend/592702            |

#### 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（20%FBS）

- 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 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  $7 \times 10^6$  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 2 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  $8 \times 10^5$  cells/mL 时传代培养，不要让其浓度超过  $1 \times 10^6$  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，复苏 2 代内，1 传 2，状态恢复后 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：

- 刚复苏，细胞生长缓慢，且背景会出现较多细胞碎片，细胞状态恢复后背景会逐渐变干净。周期预计 1-1.5 周。
- 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。
- 该细胞的培养基中需添加  $\beta$ -巯基乙醇，若不添加，可能会对细胞状态造成影响。

## 六、使用方法

### 1. IFN- $\alpha$ 2 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 IFN $\alpha$  Reporter THP1 Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^5$  cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human IFN- $\alpha$ 2 (19.4 kDa) (以下简称为 IFN- $\alpha$ 2) 作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 300 ng/mL，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照。B2-B11 孔周围为 100  $\mu$ 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 | IFN- $\alpha$ 2 | 300<br>ng/mL | 75<br>ng/mL | 18.75<br>ng/mL | 4.69<br>ng/mL | 1.17<br>ng/mL | 292.97<br>pg/mL | 73.24<br>pg/mL | 18.31<br>pg/mL | 4.58<br>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 h，将细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞沉淀，使用 Assay Buffer 清洗 2 遍后，再次重悬，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  $\mu$ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu$ L PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育待用。
- 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                                   |
|-----------------|----------------|---------------|--|
| IFN- $\alpha$ 2 | 200 $\mu$ g/mL | 20 $\mu$ g/mL | 取 2 $\mu$ L 储液+18 $\mu$ 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 71.1  $\mu$ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55  $\mu$ 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 2.2  $\mu$ L IFN- $\alpha$ 2），混匀。

|   | 母液吸取                              | 梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.3 $\mu\text{L}$ , 加入次孔 |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | 对照孔              |
|---|-----------------------------------|--|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|   | 1                                 | 2  | 3                  | 4                | 5                | 6                | 7                | 8                | 9                | 10               | 11               | 12               |
| A |                                   |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| B | 2.2 $\mu\text{L}$ IFN- $\alpha$ 2 | 加入                                       | 71.1 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ | 55 $\mu\text{L}$ |
| C |                                   |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| D |                                   |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| E |                                   |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| F |                                   |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| G |                                   |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| H |                                   |  |                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.3  $\mu\text{L}$ , 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- 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  $\mu\text{L}$ 。
- j) 盖上班盖, 于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  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。

| IFN $\alpha$ Reporter THP1 Cell Line | 0 ng/mL | 300 ng/mL | 4.58 pg/mL |
|--------------------------------------|---------|-----------|------------|
|                                      | 10727   | 41185     | 10385      |

## 3) 验证结果

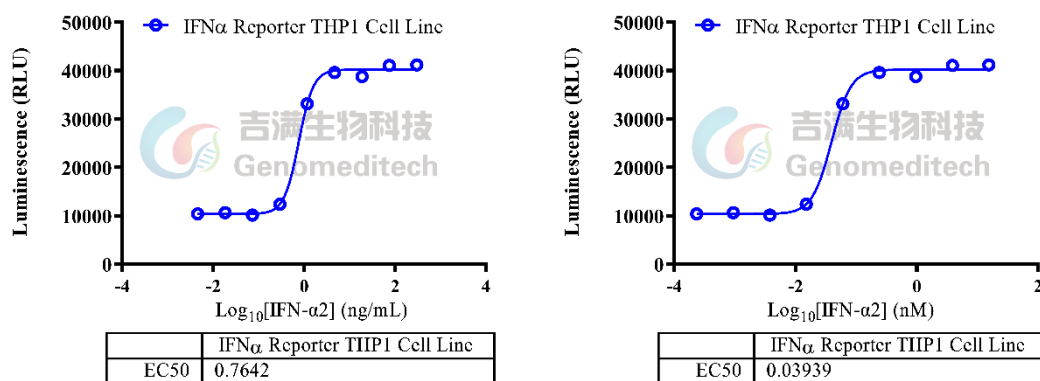


Fig 2. IFN- $\alpha$ 2 激活验证结果  
(右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)



## 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