

产品手册

AP1 Reporter Jurkat Cell Line

AP1 Reporter Jurkat 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.	PMA 激动剂验证实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	8
2.	PMA 激活，CC-401 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	功能验证	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-C17011	AP1 Reporter Jurkat Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C17011	AP1 Reporter Jurkat 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

AP1 (Activator Protein-1) 是一类重要的转录因子复合物, 主要由 c-Jun、c-Fos 家族蛋白组成, 在调控细胞增殖、分化、凋亡以及应激反应等生物学过程中发挥关键作用。SAPK/JNK (Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase) 信号通路能被多种细胞应激、炎症因子、紫外线等激活。SAPK/JNK 通过磷酸化 c-Jun (AP1 的主要组成蛋白之一) 直接增强其转录活性; 当 SAPK/JNK 通路被激活后, c-Jun 的磷酸化促进其异源二聚体 (如 c-Jun/c-Fos) 或同源二聚体的形成, 从而增强 AP1 对靶基因启动子的结合能力, 激活下游基因转录。常用的 AP-1 激活剂如 PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) 能够显著增强 AP-1 介导的荧光素酶表达。而诸如 CC-401 等 JNK 通路抑制剂则可有效抑制 AP-1 的转录活性, 降低荧光素酶信号。

吉满生物 AP1 Reporter Jurkat Cell Line 报告基因细胞系以 Jurkat 为工具细胞, 采用慢病毒感染的方式, 构建稳定表达 AP1-Luc 报告基因的细胞系, 可用于筛选与 AP-1 通路调控相关的药物。

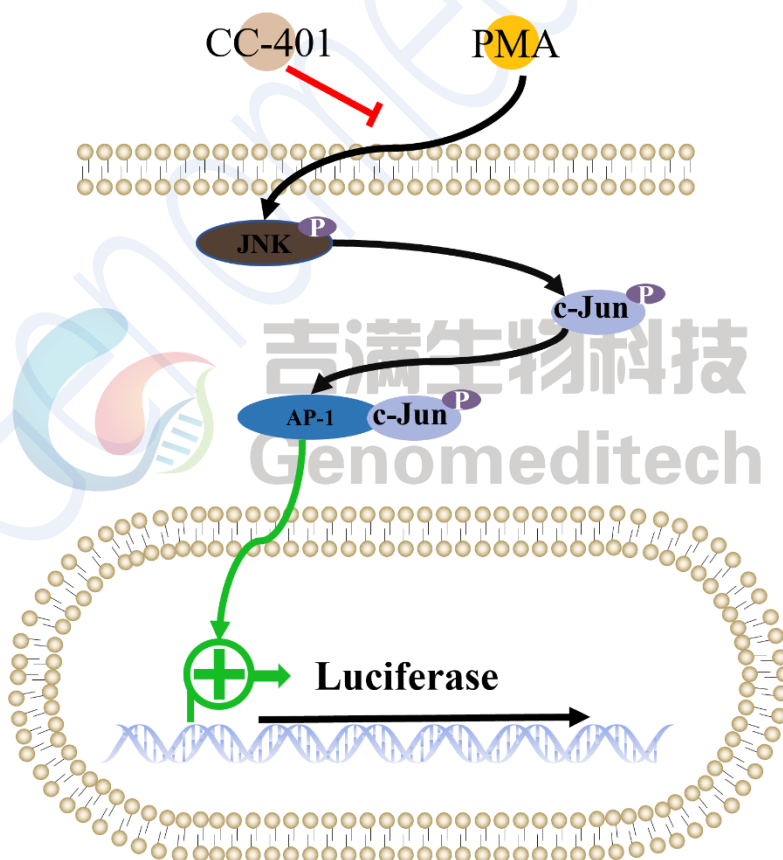


Fig 1. 原理示意图

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:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+0.75 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640+1% FBS+1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell FSP500
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
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	96-well	Corning/3912
Not Treated Microplate		
Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)	20 µg	MCE/HY-18739
CC-401	1 mg	MCE/HY-13022A
Raji Cell Line	1 管(5E6 Cells/mL)	Genomeditech/GM-C19100
Anti-CD3×CD20 hIgG1 Bispecific /		Genomeditech/GM-88130MAB
Antibody (Epcobio)		
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter /		Genomeditech/GM-040513
Gene Assay Kit		

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 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，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 $4-6 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL 悬液），竖瓶培养。

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 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。

- 此细胞为淋巴细胞状，悬浮生长。
- 首次复苏后，约 48-72 h 可进行第一次传代，此次传代后细胞培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加复苏培养基，瓶体改为横向放置。
- 当细胞密度达到 $1.5-2 \times 10^6$ cells/mL，1 传 3，隔 2-3 天继续传代，不要让其密度超 2×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养。
- 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。
- 首次传代时注意营养，不处理时务必隔天适当补加复苏培养基。
- 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. PMA 激动剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 AP1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 1×10^5 cells/孔。本次实验使用 Phorbol 12-myristate 13-acetate (616.83 Da; 以下简称 PMA) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 2 μ M，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入 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	
B	PMA	2 μM	666.67 nM	222.22 nM	74.07 nM	24.69 nM	8.23 nM	2.74 nM	914.49 pM	304.83 pM	101.61 pM	33.87 pM	0
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 1-2 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。盖上班盖，于孵箱中孵育。
- 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 B1-B11）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
PMA	1 mM	0.1 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 B1 孔中加入 90 μ L Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 60 μ 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 B1 中加入 3.75 μL PMA），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 30 μL，加入次孔											对照孔
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	3.75 μL PMA	90 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 30 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B2，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11）。
- i) 将步骤 a 准备的孔板取出，加入梯度稀释好的药物，每孔 50 μL 。
- j) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 6 h。
- k) 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。

AP1 Reporter Jurkat Cell Line	0 μM	2 μM	33.87 μM
	4181	26855	4605

3) 验证结果

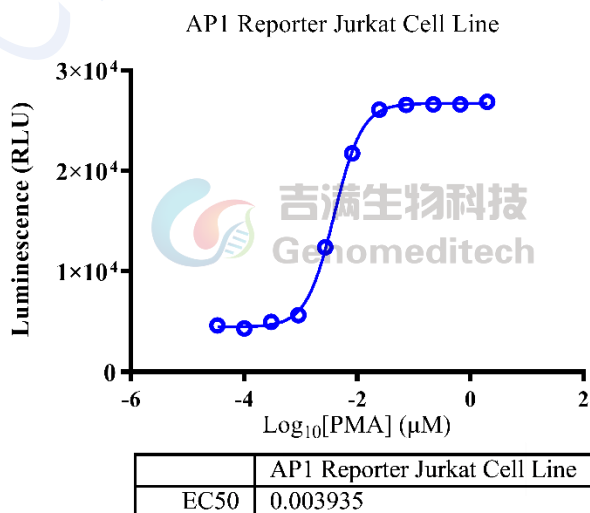


Fig 2. 激活验证结果

2. PMA 激活，CC-401 抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 AP1 Reporter Jurkat Cell Line 细胞量为 1×10^5 Cells/孔。使用 CC-401 作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 30 μM ，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 μL 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	
B	CC-401	PBS	30 μM	10 μM	3.33 μM	1.11 μM	370.37 nM	123.46 nM	41.15 nM	13.72 nM	4.57 nM	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 1-2 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 3.04×10^6 cells/mL。以排枪加 33 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上市盖，于孵箱中孵育。
- 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）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
PMA	1 mM	0.1 mM	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer
CC-401	5 mM	/	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 59.4 μL Assay Buffer，B2-B11 孔，加入 39.6 μL 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 1.1 μL CC-401），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 19.8 μ L，加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1.1 μ L CC-401	加入	59.4 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	39.6 μ L	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 19.8 μ L，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 3 $\times$ 激活剂：1800 nM PMA（7.33 μ L 0.1 mM PMA 母液加入到 396 μ L Assay Buffer 中，混匀后使用）。
- j) 将步骤 a 准备的孔板取出，加入梯度稀释的 CC-401，每孔加入 33 μ L 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 33 μ L 的 PMA 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。

AP1 Reporter Jurkat Cell Line	600 nM PMA + 0 μ M CC-401	600 nM PMA + 30 μ M CC-401	600 nM PMA + 4.57 nM CC-401
	32520	4079	32012

3) 验证结果

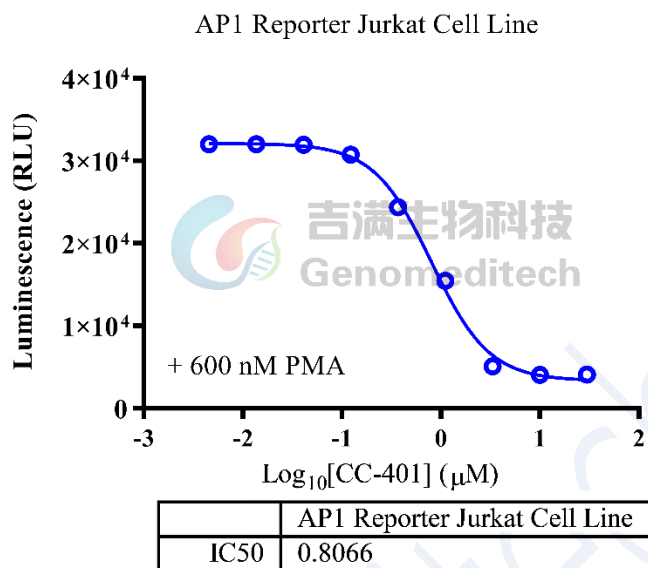


Fig 3.功能验证结果

附录 1 功能验证

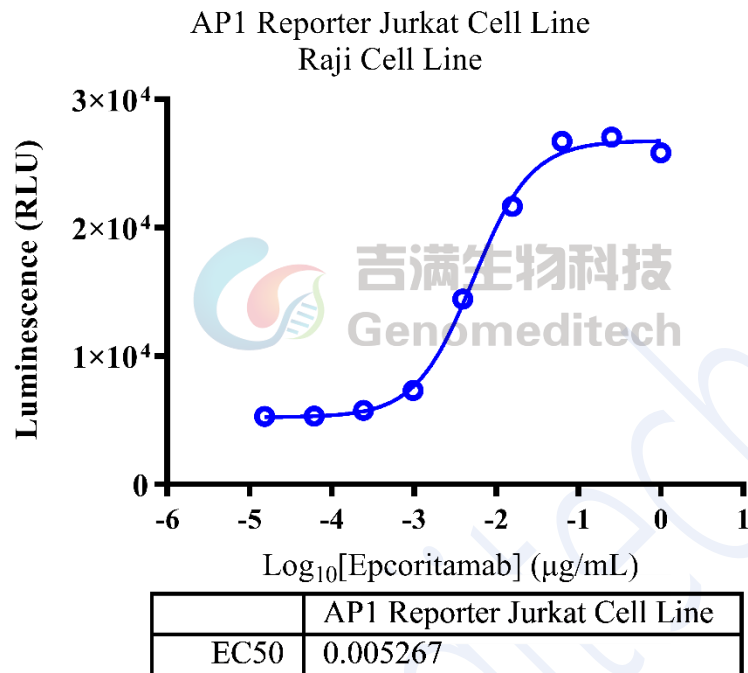


Fig 4. 制备 Epcoritamab 梯度稀释液。提前 1-2 h 分别配置 Raji Cell Line 和 AP1 Reporter Jurkat Cell Line, Raji 每孔细胞量 2×10^4 个, AP1 Reporter Jurkat 每孔细胞量 1×10^5 个。将 Raji 和 AP1 Reporter Jurkat 共培养, 分别按每孔 33 μ L 加入细胞孔板, 然后加入稀释好的 Epcoritamab, 每孔 33 μ L, 孵育 16 h 后检测。

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。