ISRE-Luc B16-F10 产品说明书

ISRE-Luc B16-F10 报告基因细胞系采用慢病毒转导法构建，携带受 ISRE 调控的荧光素酶报告元件。经 IFN-α、IFN-β等 I 型干扰素刺激后，内源 ISGF3 复合物入核并结合 ISRE，驱动荧光素酶表达，可通过荧光素酶信号变化定量反映 I 型干扰素通路激活强度。

产品基本信息

细胞名称	ISRE-Luc B16-F10 报告基因细胞系	**稳定表达基因**	ISRE-luciferase
产品货号	YRC-Luc-004	**产品分类**	Luc 报告基因细胞系
细胞形态	上皮样，贴壁细胞	**传代比例**	1:3~1:4
支原体检测	阴性	**储存条件**	液氮
培养体系	90% RPMI-1640+10% FBS 源井细胞培养未加双抗，客户可视实际情况选择添加	**发货形式**	活细胞：常温运输； 冻存管：干冰运输
质量控制	所有细胞均经检测，不含细菌、病毒、支原体及其他毒素。	**检测方法**	荧光素酶检测（化学发光法）
半药浓度	Hygromycin =400μg/mL 注意：为了维持 Luciferase 荧光素酶基因表达量的稳定，细胞状态良好时加药培养		
应用领域	JAK- STAT 信号通路研究；药物高通量筛选；免疫相关药理评价		
应用说明	本产品仅供进一步科研使用，不得用于诊断治疗、临床及其他用途。		

注意：如收到为活细胞，原瓶罐装培养基仅含 5%血清，需额外补充血清或更换新的完全培养基进行培养。

产品背景

ISRE（Interferon-stimulated response element，干扰素刺激应答元件）所属的 JAK- STAT 信号通路是经典的 I 型干扰素免疫响应通路，细胞受到 IFN-α、IFN-β等 I 型干扰素刺激、病毒感染时快速激活，启动大量抗病毒、免疫调节相关干扰素刺激基因（ISG）的转录。ISGF3（Interferon-Stimulated Gene Factor 3）是调控 I 型干扰素应答的核心转录复合物，能够结合 ISRE，启动下游干扰素诱导基因的转录。

在正常生理状态下，STAT1、STAT2 以游离单体形式存在于细胞质，维持通路活性的基础稳态水平。受到 I 型干扰素刺激时，干扰素结合受体激活 JAK 激酶，介导 STAT1、STAT2 磷酸化，二者与 IRF9 组装形成 ISGF3 复合物并入核，结合 ISRE，启动靶基因转录，发挥抗病毒、抗肿瘤免疫及免疫调控相关功能。

产品应用

1、JAK- STAT/ISRE 通路调节剂高通量筛选

用于筛选 I 型干扰素通路的激动剂与抑制剂，评价小分子、多肽、天然产物对 ISRE 转录活性的调控效果。

2、干扰素活性与受体功能评价

可定量检测 IFN- α、IFN- β等诱导的 ISRE 转录激活，用于干扰素蛋白、干扰素融合蛋白、干扰素受体靶向分子的活性测定。

3、肿瘤免疫与黑色素瘤免疫机制研究

研究肿瘤细胞自身干扰素应答、肿瘤固有免疫、干扰素介导的抗肿瘤效应，可用于联合免疫治疗（免疫检查点抗体、STING 激动剂等）的体外药效评价。

细胞培养方法

- 细胞接收

  1）冻存细胞：如果是干冰运输的冻存细胞，收到后请立即转入液氮储存或短暂（24h）放至-80℃ 冰箱保存，或直接进行细胞复苏。

  2）活细胞：如果是 T25 瓶活细胞运输，收到后用 75%的酒精对 T25 瓶外表面进行消毒，之后放在 5%CO2、37℃的细胞培养箱静置 2h，静置后取出细胞瓶在显微镜下观察细胞贴壁情况和细胞汇合度，分别在 100×和 40×下各拍 2 个不同视野的细胞拍照记录。如果汇合度达到 80%以上的传代密度，可以进行传代操作，如果细胞汇合度没有达 80%以上不够传代，弃掉瓶内培养基，更换新鲜完全培养基。（灌满细胞培养基不能正常用来

培养细胞。）

注意：收到细胞后，活细胞首先观察细胞瓶是否完好，培养液是否漏液、浑浊等现象。冻存细胞若发现干冰已挥发完、冻存管瓶盖脱落、破损等异常情况，请务必拍照保留，并于收货 24h 内与我们联系（电话：400-6889033；https://www.ubigene.com）

- 细胞复苏

1）准备工作：将完全培养液置 37℃水浴锅预热 30 分钟，随后将冻存的细胞从液氮中取出，转移到-80℃冰箱，放置数分钟让残余液氮挥发；

2）在超净台内用吸管吸取 6-7mL 完全培养液至 15mL 离心管中；

3）将细胞从-80℃冰箱取出暂时放置于干冰里，复苏时稍稍甩动，去除残留的干冰和液氮，再迅速用镊子夹住盖子放入 37℃水浴中快速晃动（注意：水不能没过盖子），使其在 1 分钟左右完全融化；

4）在超净台内，用酒精棉球擦拭冻存管外壁消毒，稍稍晾干。用单道移液器将所有融化的细胞悬液转至提前准备好的完全培养液中，盖上盖子，1100rpm 室温离心 4 分钟收集细胞；

5）超净台内小心吸弃上清，用单道移液器吸取 1mL 新鲜完全培养液重悬细胞至单细胞悬液，再转移至装有 4mL 完全培养液的 T25 cm2 培养瓶（或者 6cm 的皿） 中，写上细胞名称、复苏日期、代次，放置 37℃、5%CO2 饱和湿度培养箱内培养。

注意：请勿直接复苏到 T75cm2 瓶或 10cm 的皿

- 细胞传代

1）常规细胞长至 80%-90%汇合度即可传代。在超净台内把培养瓶里的培养液倒至废液缸，用 1×PBS（T25 cm2 培养瓶添加约 2~3mL，T75cm2 培养瓶约 4~5mL）洗涤细胞 1~2 次，以去除残余的培养液和血清（血清含有胰酶的抑制因子）；

2）加入相应体积的胰酶溶液，具体参考附表 1，轻轻晃动瓶子并使胰酶完全浸过细胞，将培养瓶放入培养箱孵育 1~2 分钟（若细胞难以消化，可适当延长孵育时间），待在显微镜下观察到大部分细胞变圆不贴壁，轻轻晃动和敲击培养瓶两侧有大量细胞脱离时，立即终止消化；

3）加入 2 倍胰酶体积的完全培养液终止消化，并轻吹打细胞数次，使所有细胞彻底脱壁；（注意：吹散细胞时注意要轻柔，尽量不产生气泡或尽可能产生少量气泡。）；

4）用 10mL 移液管转移细胞悬液到一支 50mL 离心管中，同一批次的细胞可以合并收集在一起，视情况用适量 PBS 将培养瓶里的残余细胞洗下来，一起加到 50mL 离心管中。盖上盖子，做好标记；

5) 1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子弃上清，加 2mL 完全培养基重悬细胞；

6) 细胞按照一定的接种比例传代，首次按照 1：3 进行传代，若细胞在两天内长满可增加传代比例，若细胞生长三四天还未长满，可适当缩小传代比例。

表 1 不同规格培养物加入胰酶体积列表

培养物规格	胰酶体积
6 孔板	0.5 mL
T25	1 mL
T75	2-3 mL
T175	3-4 mL

注意：为了维持 Luciferase 荧光素酶基因表达量的稳定，细胞状态良好时加入半药浓度的筛选抗生素（Hygromycin =400μg/mL）进行培养

- 细胞冻存

1) 按细胞传代的方法，在超净台内把培养瓶里的细胞进行消化至单细胞悬液，加入培养基终止反应。所有液体转移到一支 50mL 离心管中；

2) 用移液管吹打混合均匀，取 20μL 进行细胞计数；

3) 1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子倒去上清，用 1~2mL 4℃预冷的冻存液重悬细胞，随后加入冻存液调整至密度为 1×106-1×107 个细胞/mL。

4) 将细胞悬液按 1mL/管平均分装至冻存管中，旋紧盖子，冻存管应提前贴好细胞名称、细胞代次、数量、冻存日期；

5) 将冻存管放置于 4℃预冷的程序降温盒中，并在冻存结束的 15 分钟之内将程序降温盒放置超低温冰箱内；

6) 过夜后，将冻存细胞转移至液氮罐内保存。

质量控制

- 功能验证

以 IFNA1 作为阳性激活剂，检测细胞的响应效果，并计算其半数最大效应浓度（EC50），评估该细胞系的灵敏度

与功能性

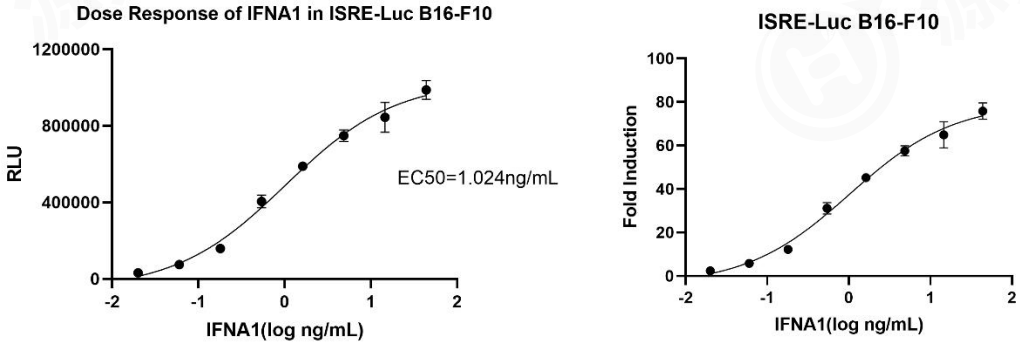

图 1 ISRE-Luc B16-F10 报告基因细胞系对 IFNA1 的响应结果

左图：剂量-反应曲线：检测不同浓度 IFNA1 处理 6h 后细胞的荧光素酶活性（RLU）；右图：诱导倍数-效应曲线：展示不同浓度 IFNA1 处理 6h 后荧光素酶信号相对于对照组（无药物处理）的诱导倍数

● 注意事项

1、使用通路阳性激活剂处理细胞，若荧光素酶报告基因诱导倍数≥5 倍，提示细胞系 JAK- STAT 通路响应灵敏，可满足化合物筛选与通路活性评价实验需求。

2、产品放行检测中，荧光素酶诱导倍数受细胞代次、汇合度、血清批次、阳性激活剂批次、检测试剂及仪器状态等因素影响，不同批次、不同时间的实测结果存在一定波动，属正常现象。

3、进行功能实验时，建议进行预实验优化细胞接种密度、IFNA1 浓度以及刺激时间（刺激时间 5-7h 为建议值）。本实验用的是重组小鼠 IFNA1 蛋白作为激活剂。

4、使用 DMSO 溶解化合物时，为避免溶剂本身带来细胞毒性，终浓度建议不超过 0.1% 。

5、本说明书仅供参考，使用者需结合自身实验体系对具体实验条件进行优化调整。