

产品手册



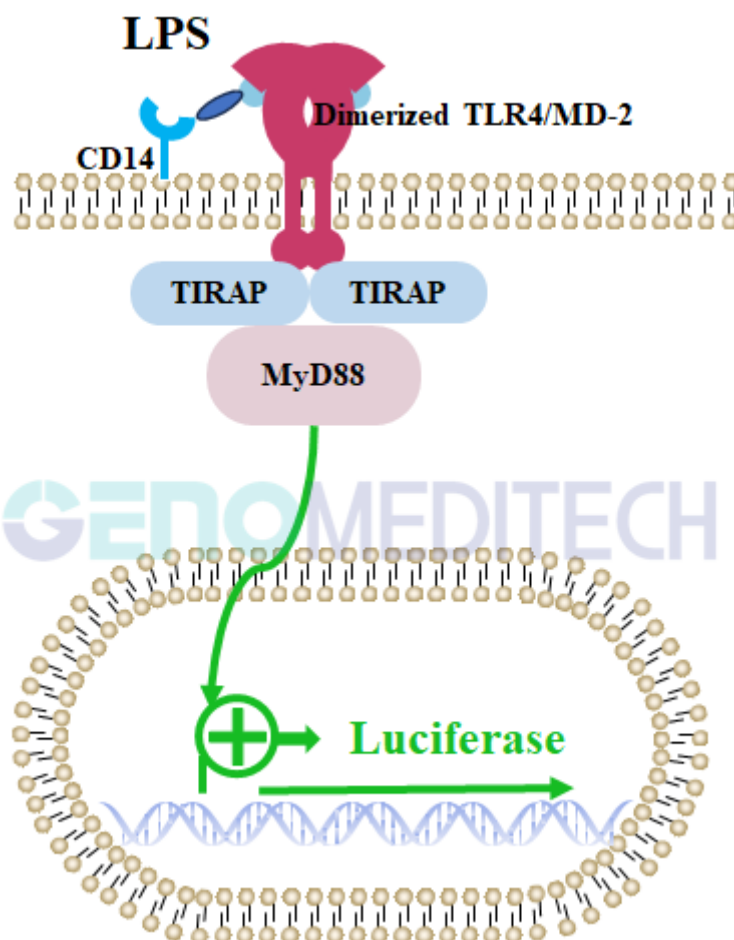
H_TLR4 Reporter 293 Cell Line

货号: GM-C50021

版本号: 4.0.26.1014

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 是参与非特异性免疫 (天然免疫) 的一类重要蛋白质分子, 也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁。Toll 样受体 4 (TLR4) 作为脂多糖 (LPS) 的受体, 在调节对感染的免疫反应中起着关键作用。激活 TLR, 可以诱导 MyD88 或 TRIF 依赖的信号通路, 激活信号, 诱导细胞因子和趋化因子分泌, 激活先天免疫反应和介导获得性免疫反应的激活, 因此将 TLR 激动剂应用到肿瘤免疫治疗中, 有望将冷肿瘤变热, 解决单免疫检查点抑制剂应答率低的问题, 提高免疫治疗效果。

吉满生物 H_TLR4 Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系, 是基于 TLR4 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。该细胞稳定表达 TLR4 基因及 Luciferase 报告基因, 可作用于 TLR4 药物的体外激活效果评价。



规格参数

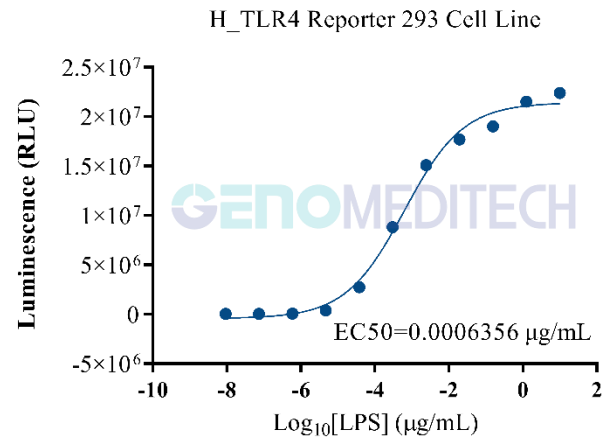
数量	5E6 Cells per vial, 1 mL
产品形式	1 支冻存细胞
储运条件	干冰运输, -196° C 以下长期储存
复苏培养基	DMEM+10% FBS(Delipidized)+1% P.S
生长培养基	DMEM+10% FBS(Delipidized)+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin+400 µg/mL G418+125 µg/mL Hygromycin+0.75 µg/mL Puromycin
培养备注	注意使用对应品牌的血清及消化液: Lipid Depleted Fetal Bovine Serum (VivaCell C3840)、CD-Trpizer® Enzyme-free Cell Dissociation Reagent (BasalMedia/S343JV)
细胞冻存液	90% FBS(Delipidized)+10% DMSO
生长特性	贴壁
培养条件	37°C, 5% CO ₂
支原体检测	该细胞系已通过支原体检测, 结果为阴性。
生物安全等级	Biosafety Level 2
备注	建议尽早扩增该细胞, 并冻存至少 10 支, 以便后续使用。

实验材料与仪器

名称	Manufacturer/Catalogue No.
DMEM	Gibco/C11995500BT
Lipid Depleted Fetal Bovine Serum	VivaCell/C3840
Pen/Strep	Thermo/15140-122
Blasticidin	Genomeditech/ GM-040404
Puromycin	Genomeditech/ GM-040401
Hygromycin	Genomeditech/ GM-040403
G418	Genomeditech/ GM-040402
CD-Trpizer® Enzyme-free Cell Dissociation Reagent	BasalMedia/S343JV
96 well round cell culture plate	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	Saining/1014010
LPS	Beyotime/S1732
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	Genomeditech/ GM-040513

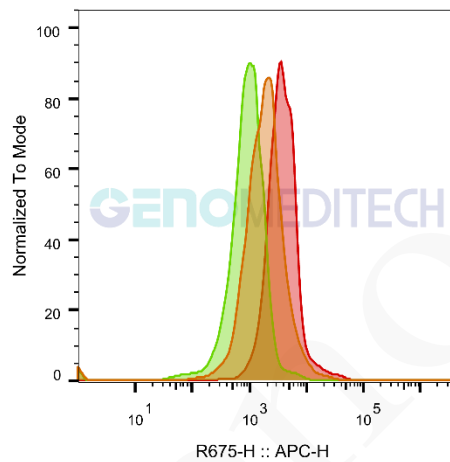
验证结果

信号通路



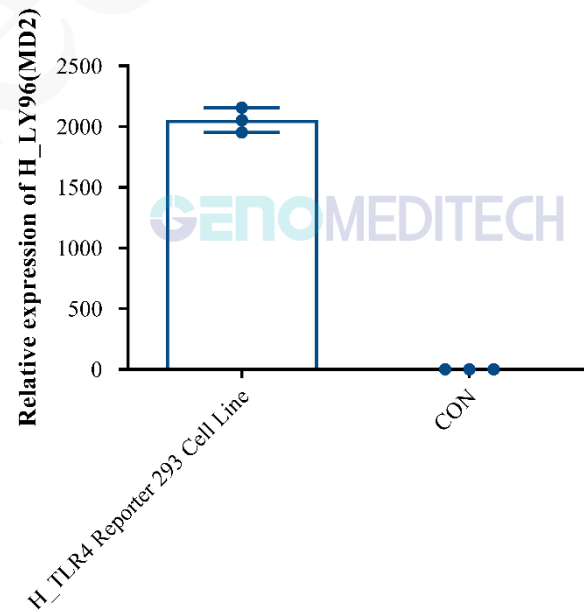
LPS 激活验证。H_TLR4 Reporter 293 细胞系 (GM-C50021) 按 1.5E4 细胞/孔接种于 96 孔板，加入梯度稀释的 LPS (Beyotime/S1732)，于 assay buffer (DMEM+1% FBS(Delipidized)+1 %P.S) 中孵育 6 小时后，采用 Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) 检测萤火虫荧光素酶活性，最大诱导倍数约为 [517.8]，数据以药物质量(质量)浓度表示。[\[protocol\]](#)

表达

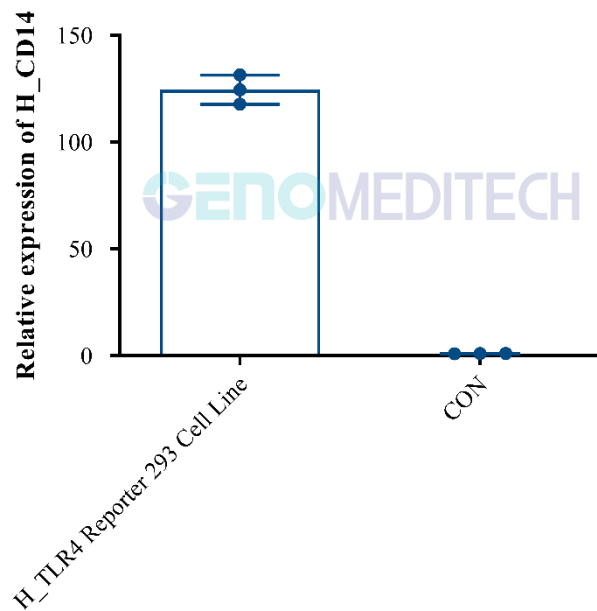


SampleID	Geometric Mean : R675-H
293 APC anti-human TLR4 Ab	1742
H_TLR4 Reporter 293 APC M_IgG TLR4 Ab	869
H_TLR4 Reporter 293 APC anti-human TLR4 Ab	3646

TLR4 流式表达验证。采用流式细胞术，用 APC anti-human CD284 (TLR4) Antibody (biolegend/312815) 检测 H_TLR4 Reporter 293 细胞系 (GM-C50021) 的 TLR4 表达。



H_LY96(MD2) mRNA 表达验证。采用 RT-qPCR 检测 H_TLR4 Reporter 293 细胞系 (GM-C50021) 中 H_LY96(MD2) 的 mRNA 表达水平。



H_CD14 mRNA 表达验证。采用 RT-qPCR 检测 H_TLR4 Reporter 293 细胞系 (GM-C50021) 中 H_CD14 的 mRNA 表达水平。

细胞复苏

复苏培养基: DMEM+10% FBS(Delipidized)+1% P.S

为确保最高存活率, 应在收到冻存细胞后立即解冻并复苏培养。如果在收到细胞后需要继续储存, 将其置于液氮罐中, 严禁储存在-70°C, 因为在-70°C下储存会导致活性丧失。

- 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, 活细胞 $\geq 3E6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式, 调整活细胞密度到 2-3E5 cells/mL, 根据细胞悬液总体积, 将细胞接种到合适的培养皿中。

细胞冻存

细胞冻存液: 90% FBS(Delipidized)+10% DMSO

- 使用 $176 \times g$, 3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液 90% FBS(Delipidized) + 10% DMSO 重悬细胞, 细胞密度调整为 5E6 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。

细胞传代

生长培养基: DMEM+10% FBS(Delipidized)+1% P.S+4 μ g/mL Blasticidin+400 μ g/mL G418+125 μ g/mL Hygromycin+0.75 μ g/mL Puromycin

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。

- 细胞为上皮细胞, 贴壁生长。培养箱中孵育 16-24 h 后, 镜下观察细胞贴壁情况, 当细胞密度达到 80%, 需要进行细胞传代。注意保持密度不超过 80%, 否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- 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 非酶细胞消化液, 37°C 消化 30-60 s, 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, $176 \times g$ 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%)。

细胞传代比例为 1:3-1:4, 3-4 天传代。

培养备注

- 该细胞复苏 1-3 天, 可能会出现不贴壁的现象, 可适当补加 5%的血清延长观察时间, 一般第 4 天开始贴壁, 第 5 天可以进行第一次传代处理, 按 1:2 传代一次后, 细胞的生长逐渐恢复正常, 2-3 天可达到 80%以上。
- 注意保持密度不超过 80%, 否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。

- c) FBS(Delipidized)需 56° C 水浴 30 分钟，可热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。

实验方案

激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TLR4 Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 LPS 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ ，8 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.011 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入 $100 \mu\text{L}$ 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	LPS	10.00 μg/mL	1.25 μg/mL	156.25 ng/mL	19.53 ng/mL	2.44 ng/mL	305.18 pg/mL	38.15 pg/mL	4.77 pg/mL	596.05 fg/mL	74.51 fg/mL	9.31 fg/mL	0
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D													
E													
F													
G													
H													

加样步骤

- 在实验前 16-24 h，将细胞从培养瓶中取出，消化离心收集细胞沉淀，使用适量完全培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以完全培养基调整细胞浓度为 1.5×10^5 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。盖盖板盖，于孵箱中孵育过夜使用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B1-B11）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
LPS	5 mg/mL	0.5 mg/mL	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer

- 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1 孔加入 $137.1 \mu\text{L}$ Assay Buffer，B2-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 B1 中加入 $2.80 \mu\text{L}$ LPS），混匀。

母液吸取	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	2.80 μL LPS	137.1 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 $17.14 \mu\text{L}$ ，加入到第二个梯度稀释孔 B2，充分混匀。
- 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11）。
- 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。
- 加入梯度稀释好的药物， $100 \mu\text{L}$ 每孔。
- 盖盖板盖，于 37°C CO_2 培养箱中培养 6 h。
- 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TLR4 Reporter 293 Cell Line	0.00 $\mu\text{g/mL}$	10.00 $\mu\text{g/mL}$	9.31 fg/mL
	43232	22383496	38800

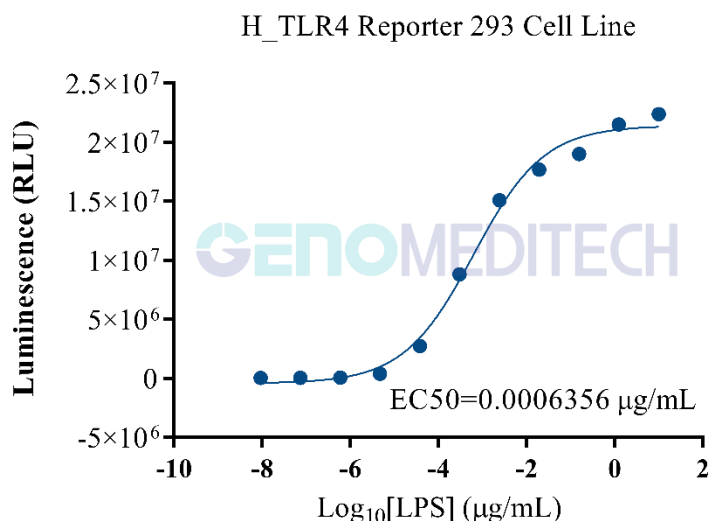


Fig 2. LPS 激活验证。H_TLR4 Reporter 293 细胞系 (GM-C50021) 按 1.5E4 细胞/孔接种于 96 孔板, 加入梯度稀释的 LPS (Beyotime/S1732), 于 assay buffer (DMEM+1% FBS(Delipidized)+1 %P.S) 中孵育 6 小时后, 采用 Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) 检测萤火虫荧光素酶活性, 最大诱导倍数约为 [517.8], 数据以药物质量浓度表示。

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。