Genomeditech (Shanghai) Co.,Ltd.
Order: 021-68455258/50432826/50432825
Toll-free: 400 627 9288
Email: service@genomeditech.com

产品手册

H_TLR2 Reporter 293 Cell Line

H_TLR2 Reporter 293 细胞系

For research use only!
本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.11.1

Genomeditech

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.....7
1. 激活剂验证实验.....7
1) 加样步骤.....7
2) 报告基因检测.....8
3) 验证结果.....8
使用许可协议：.....9

Genomeditech

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-C15493	H_TLR2 Reporter 293 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C15493	H_TLR2 Reporter 293 Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196℃

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

TLR2（Toll 样受体 2，Toll-like receptor 2）是一种分布广泛的跨膜蛋白，属于 Toll 样受体家族，是机体先天免疫系统中重要的模式识别受体（PRR）。TLR2 主要表达于单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等免疫细胞表面，能够识别多种病原体相关分子模式（PAMPs），如细菌脂肽、肽聚糖、脂多糖等。通过与其配体结合，TLR2 能激活下游信号通路，诱导炎症因子的产生，促进免疫反应的启动和调节。研究显示，TLR2 不仅在抵御感染、清除病原体方面发挥关键作用，还与多种炎症性疾病、自身免疫病及肿瘤发生密切相关。

吉满生物 H_TLR2 Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系，是一种 Luciferase 报告基因细胞系。当配体与受体结合后，激活下游信号，从而导致荧光素酶（Luciferase）的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 TLR2 相关药物的体外效果评价。

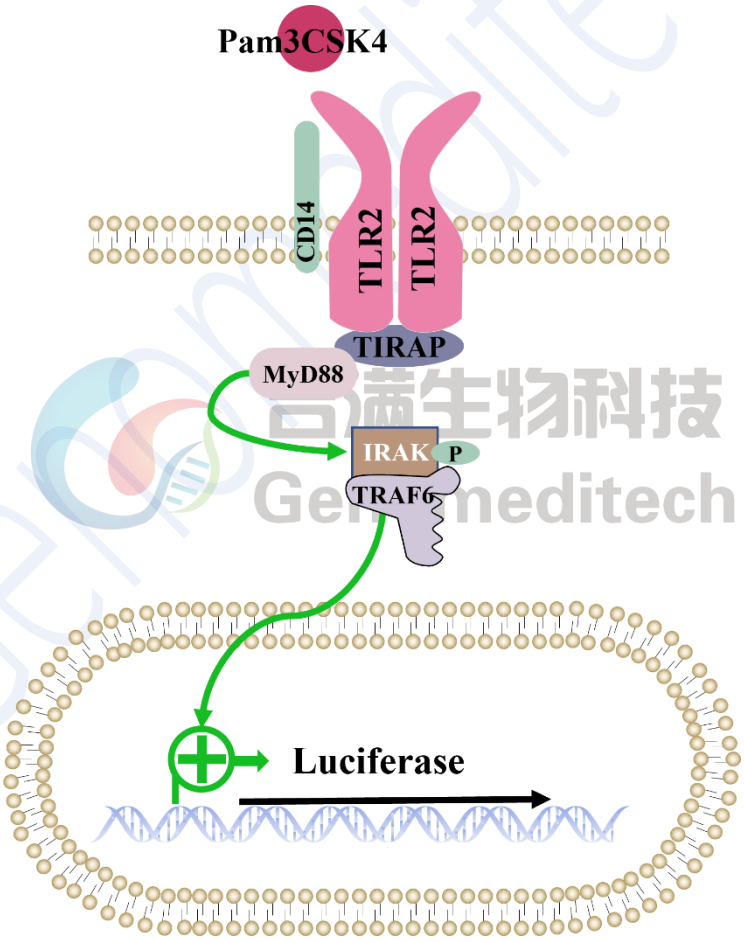


Fig 1.原理示意图

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：	EMEM(ATCC)+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基：	EMEM(ATCC)+10% FBS+1% P.S+3 μg/mL Blasticidin+400 μg/mL G418+1.5 μg/mL Puromycin
细胞冻存液：	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer：	EMEM+1% FBS+1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
EMEM	500 mL	ATCC/30-2003
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
G418	1g	Genomeditech/GM-040402-1
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 Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Pam3CSK4 TFA	1 mg	MCE/HY-P1180A
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C

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

注：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。

a) 37℃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。

b) 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37℃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）。

c) 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 × g，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。

d) 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≥ 3 × 10^6 cells/mL。

e) 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 2-3 × 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

a) 使用 176 × g，3 min 离心收集细胞。

b) 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。

c) 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中，-80℃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。

a) 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。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 天传代。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。

b) 将皿或培养瓶中的培养液弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。

c) 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液，37°C 消化 30-60 s，显微镜下观察。

d) 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。

注意事项：

a) **细胞刚复苏，死细胞较多，属于正常现象，经调整会有明显好转，状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定。**

b) 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 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

1. 激活剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TLR2 Reporter 293 Cell Line 细胞量为 2 × 10^4 Cells/孔。 激活剂 Pam3CSK4 (1852.30 Da) 起始终浓度(Conc.01)为 15 μg/mL，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	PBS
B	Pam3CSK4	PBS	15 μg/mL	5 μg/mL	1.67 μg/mL	555.56 ng/mL	185.19 ng/mL	61.73 ng/mL	20.58 ng/mL	6.86 ng/mL	2.29 ng/mL	0	PBS
C			PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D													
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

a) 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 2 × 10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。

b) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。

c) 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。

d) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Pam3CSK4	1.8523 mg/mL	/	直接使用储液

e) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 180 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 120 μL 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 B2 中加入 1.47 μL Pam3CSK4），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 60 μL，加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.47 μL Pam3CSK4	加入	180 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	

g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 60 μL，加入到第 2 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 μL。

k) 盖上板盖，于 37 ℃ CO2 培养箱中培养 6 h。

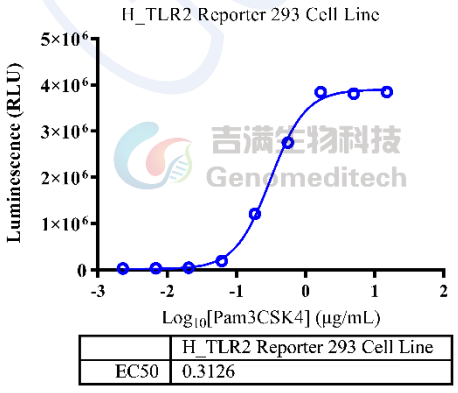
l) 使用报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

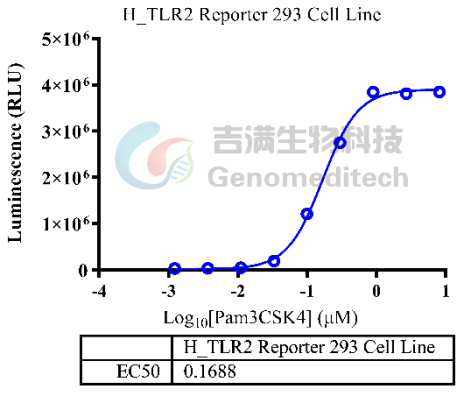
参考报告基因检测说明书。

H_TLR2 Reporter 293 Cell Line	0 μg/mL	15 μg/mL	2.29 ng/mL
	32204	3848991	32666

3) 验证结果



	H_TLR2 Reporter 293 Cell Line
EC50	0.3126



	H_TLR2 Reporter 293 Cell Line
EC50	0.1688

Fig 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）

Genomeditech (Shanghai) Co.,Ltd.
Order: 021-68455258/50432826/50432825
Toll-free: 400 627 9288
Email: service@genomeditech.com

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。
- 用户不允许以任何方式修改细胞系，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。
- 如需对产品进行第三方转让、商业开发或临床前、临床试验期间的药物功能验证、商业化生产检测使用等超出本声明的应用，须另行获得吉满生物科技（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。

Genomeditech