

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：V2.12.4

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（示例）.....	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
2.	抗体阻断实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	11
	附录 1 流式验证结果.....	12
	相关产品.....	13
	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-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°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

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。

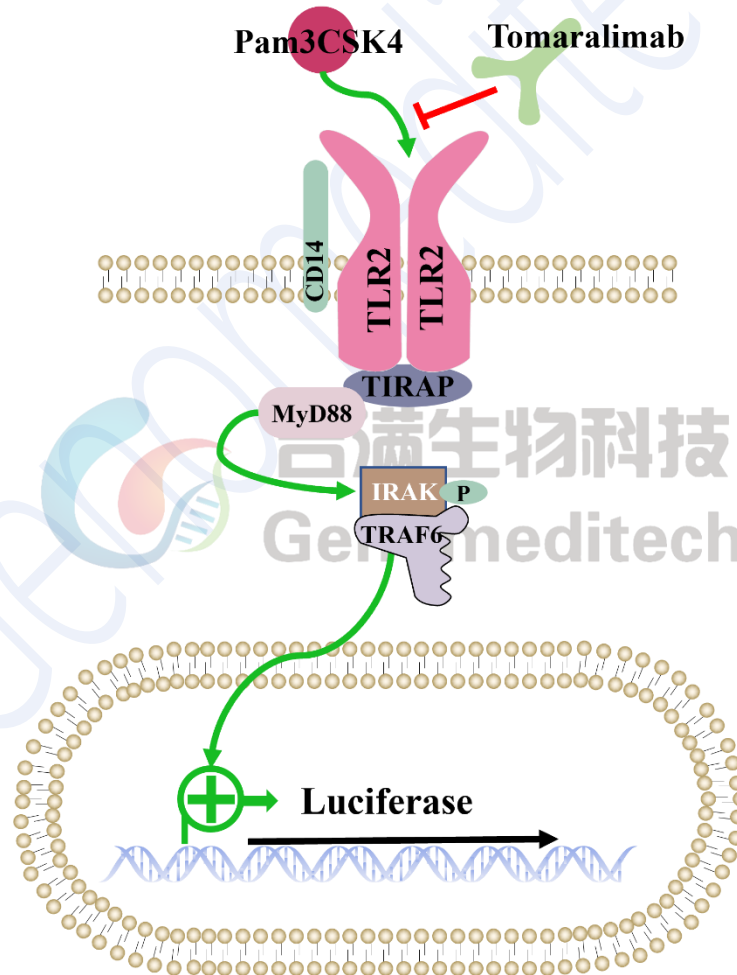


Fig 1.原理示意图

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+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	EMEM+10% FBS+1% P.S+3 $\mu\text{g/mL}$ Blasticidin+400 $\mu\text{g/mL}$ G418+1.5 $\mu\text{g/mL}$ 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 round cell culture plate	Plate	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	Plate	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	Plate	Saining/1014010
Pam3CSK4 TFA	1 mg	MCE/HY-P1180A
Tomaralimab (anti-TLR2)	100 μg	Aladdin/Ab176102
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。

- 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 × 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 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $2-3 \times 10^5$ 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

- 使用 176 × 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（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。

- 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。
- 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 0.25% Trypsin-EDTA 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 × 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%）。

注意事项：

- 细胞刚复苏，会有一些比例的死细胞，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。
- 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。
- FBS 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。

六、使用方法（示例）

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 $\mu\text{g/mL}$ ，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	15 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	1.67 $\mu\text{g/mL}$	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

- 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。盖板上盖，于孵箱中孵育过夜。
- 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 B2-B10）。
- 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

- 96 孔 U 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。
- 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 μ L, 加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.47 μ L Pam3CSK4	加入	180 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 60 μ L, 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 μ L。
- k) 盖上班盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- l) 收样, 转至 96 孔白底板上机, 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 μ g/mL	15 μ g/mL	2.29 ng/mL
	32204	3848991	32666

3) 验证结果

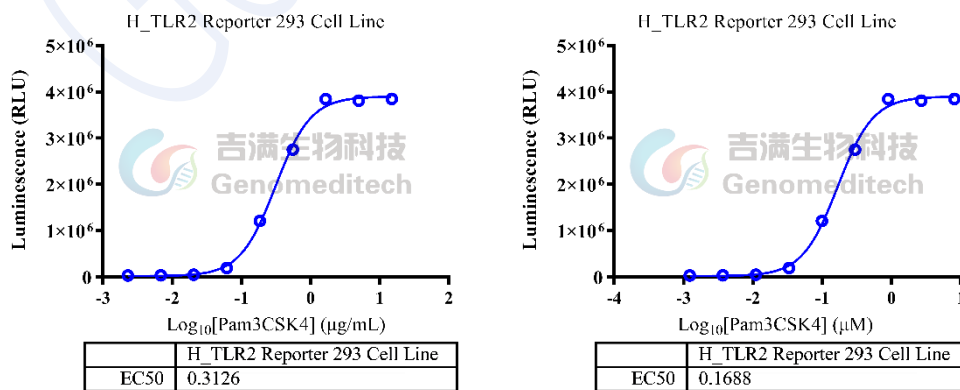


Fig 2. Response to Pam3CSK4(TFA). The H_TLR2 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C15493) at a concentration of 2E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Pam3CSK4(TFA) (MCE/HY-P1180A) in

assay buffer (EMEM+1% FBS+1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech).

2. 抗体阻断实验

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 1.5×10^4 cells/孔。本次实验分别使用 Pam3CSK4(TFA) (以下简称 Pam3CSK4) 作为激活药物 (定浓 300 ng/mL)，Tomaralimab (anti-TLR2) 作为 block 抗体 (以下简称为 Tomaralimab)。Conc.01 终浓度分别为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，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 μL 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	Tomaralimab 100.00 $\mu\text{g/mL}$	33.33 $\mu\text{g/mL}$	11.11 $\mu\text{g/mL}$	3.70 $\mu\text{g/mL}$	1.23 $\mu\text{g/mL}$	411.52 ng/mL	137.17 ng/mL	45.72 ng/mL	15.24 ng/mL	5.08 ng/mL	1.69 ng/mL	0
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 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 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上班盖，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。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B1-B11）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Pam3CSK4	1.8523 mg/mL	/	直接使用储液
Tomaralimab	2.75 mg/mL	/	直接使用储液

- e) 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1 加入 90 μL Assay Buffer，B3-B12 孔，加入 60 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 B1 加入 7.06 μL Tomaralimab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 30 μL ，加入次孔										对照组	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	7.06 μL Tomaralimab	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 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。加入步骤 h 梯度稀释好的抗体，每孔 50 μL ，盖上盖板，放入培养箱中孵育 1 h。
- j) 配置激活药物 Pam3CSK4（2 \times 激活浓度），600 ng/mL Pam3CSK4（1.17 μL 1.8523 mg/mL Pam3CSK4 母液加入到 3600 μL Assay Buffer 中，混匀后使用）。
- k) 1 h 后，将步骤 i 细胞孔板取出，加入步骤 j 准备好的激活药物，每孔 50 μL 。
- l) 盖上市盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- m) 收样，转至 96 孔白底板上机，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	300 ng/mL Pam3CSK4+0 $\mu\text{g/mL}$ Tomaralimab	300 ng/mL Pam3CSK4+ 100.00 $\mu\text{g/mL}$ Tomaralimab	300 ng/mL Pam3CSK4+ 1.69 ng/mL Tomaralimab
		2596816	78693

3) 验证结果

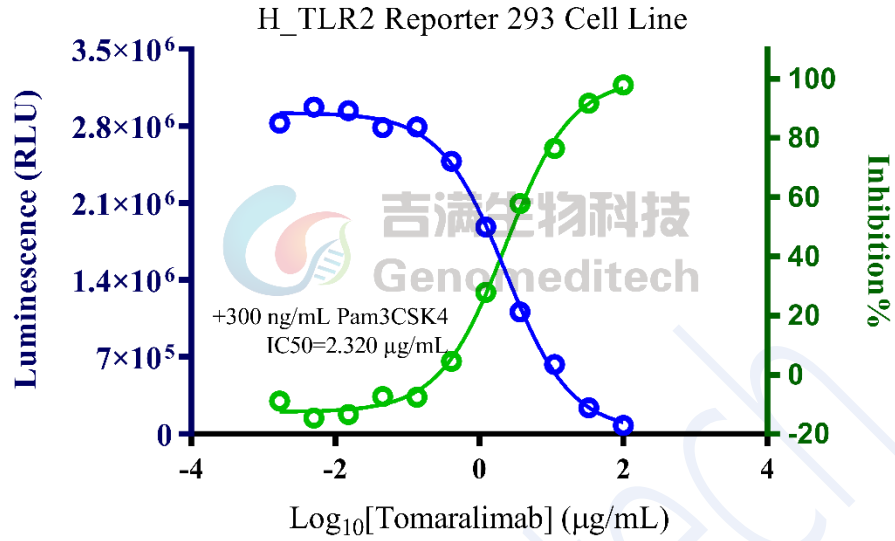


Fig 3. Inhibition of Pam3CSK4(TFA)-induced reporter activity by Tomaralimab (anti-TLR2). Serial dilutions of the Tomaralimab (anti-TLR2)(Aladdin/Ab176102) was incubated with 1.5E4 cells/well of the H_TLR2 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C15493) in a 96-well plate for 1 hour in assay buffer (EMEM+1% FBS+1% P.S). Subsequently, the Pam3CSK4(TFA) (MCE/HY-P1180A) at a concentration of 30 ng/well was added, and the coculture proceeded for an additional 6 hours. Firefly luciferase activity is then measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) (left Y-axis, relative luminescence units), with inhibition percentages shown on the right Y-axis.

附录 1 流式验证结果

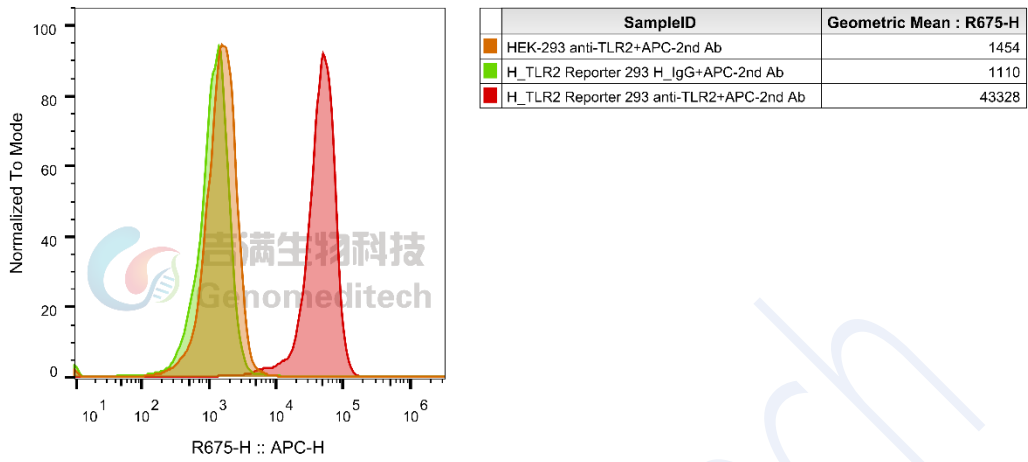


Fig 4. H_TLR2 Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C15493) was determined by flow cytometry using Tomaralimab (anti-TLR2) (Aladdin/Ab176102).

相关产品

TLR7	
H_TLR7 Reporter 293 Cell Line	Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line
TLR9	
H_TLR9 Reporter 293 Cell Line	Mouse_TLR9 Reporter 293 Cell Line
TLR8	
H_TLR8 Reporter 293 Cell Line	H_TLR8 HEK-293 Cell Line
STING	
H_STING KO THP1 Cell Line	H_STING KO U937 Cell Line
STING KO Reporter THP1 Cell Line	STING Reporter HEK-293 Cell Line
STING Reporter THP1 Cell Line	STING Reporter U937 Cell Line

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。