

## 产品手册

### H\_TLR4 Reporter 293 Cell Line

### H\_TLR4 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：V2.9.5

## 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
附录 1:	稳定性验证结果.....	9
使用许可协议:	.....	10

## 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-C02416	H_TLR4 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-C02416	H_TLR4 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

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。

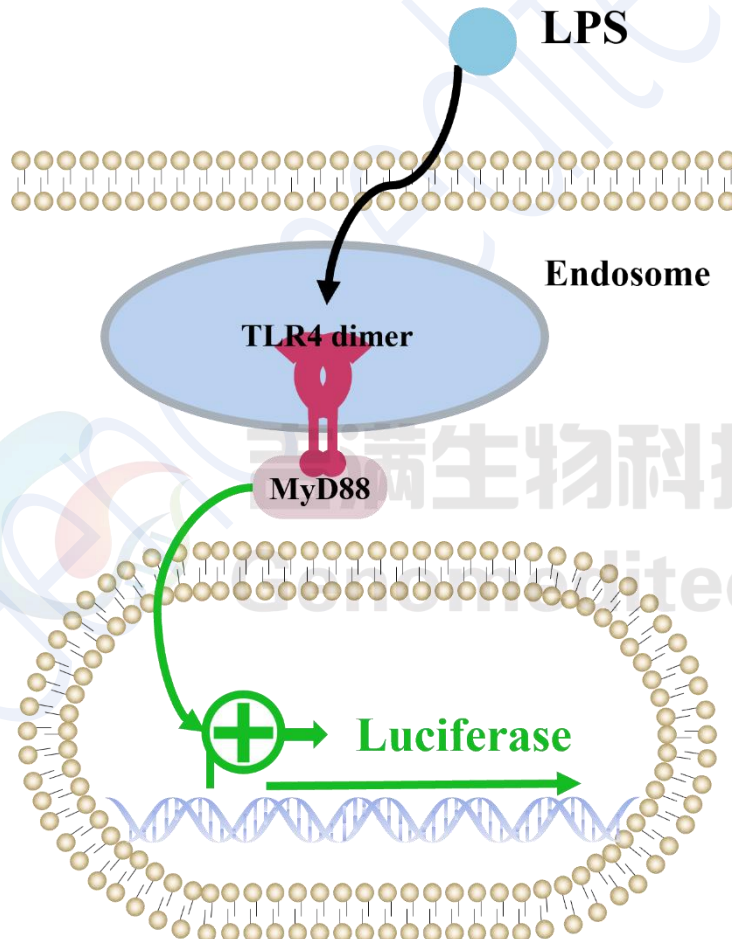


Fig 1. 原理示意图

## 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+150 $\mu\text{g/mL}$ Hygromycin+1.5 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	EMEM+1% FBS+1% P.S

注意: 细胞应使用 ATCC/30-2003 EMEM 培养基或购买吉满生物完全培养基培养, 血清需使用说明书相同血清或 gibco 血清。

### 2. 试剂耗材准备

#### 试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
G418	1 g	Genomeditech/ GM-040402-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/ GM-040403-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
EMEM	500 mL	ATCC/30-2003
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
LPS (TLR4 激活剂)	5mg	碧云天/ S1732
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C

#### 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 3 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  $3-4 \times 10^5$  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  $176 \times g$ ，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  $5 \times 10^6$  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，当细胞密度大于 80%，即可进行细胞传代。两次传代后复苏培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 天传代。
- 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， $176 \times g$  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%）。

#### 注意事项：

- 细胞刚复苏时，死细胞较多，贴壁不明显属于正常情况，2-3 天可以恢复贴壁，传代 2-3 次后贴壁细胞比例升高，细胞正常展开。
- 每次传代后会有 5-10%死细胞，但随着代次升高，细胞恢复速度变快，死细胞比例降低，细胞生长速度会趋于稳定。
- 细胞复苏后及每次观察时建议保留细胞照片，可用于辅助判断细胞状态，在出现异常时及时与吉满销售沟通。
- 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. 激动剂验证实验

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  $1.5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 LPS (TLR4 激活剂) 作为阳性药物 (以下简称 LPS)，Conc.01 终浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$ ，4 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	PBS	
B	LPS	PBS	1 $\mu\text{g/mL}$	250 $\text{ng/mL}$	62.5 $\text{ng/mL}$	15.63 $\text{ng/mL}$	3.91 $\text{ng/mL}$	976.56 $\text{pg/mL}$	244.14 $\text{pg/mL}$	61.04 $\text{pg/mL}$	15.26 $\text{pg/mL}$	0 $\text{pg/mL}$	PBS
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  $1.5 \times 10^5$  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。盖板上盖，于孵箱中孵育过夜使用。
- 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)。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
LPS	5 mg/mL	0.05 mg/mL	取 2 $\mu\text{L}$ 储液+198 $\mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 143.73  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 110  $\mu\text{L}$  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 B2 中加入 2.93  $\mu\text{L}$  LPS)，混匀。

母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 36.67 $\mu$ L, 加入次孔										对照孔	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	2.93 $\mu$ L LPS	加入	143.73 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 36.67  $\mu$ L, 加入到第二个梯度稀释孔 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, 每孔吸弃 90  $\mu$ L 培养基。
- j) 加入步骤 h 准备好的梯度稀释液, 每孔 100  $\mu$ L。
- k) 盖上班盖, 于 37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16 h。
- l) 使用 GMOne-step 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_TLR4 Reporter 293 Cell Line	0 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL	15.26 pg/mL
	76226	543270	70768

## 3) 验证结果

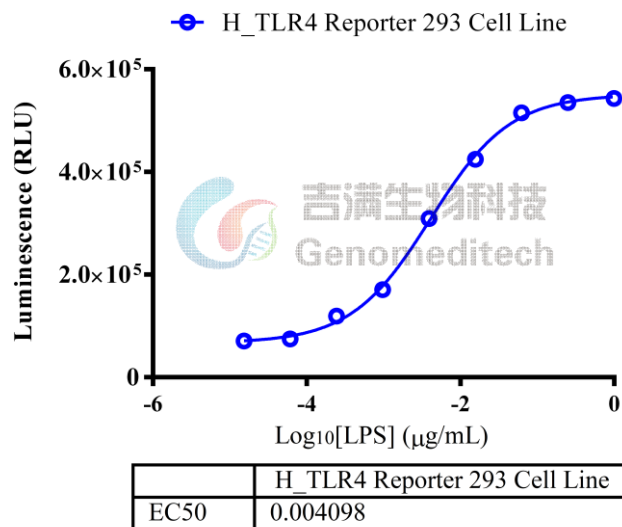


Fig 2. LPS 激活验证结果



## 附录 1: 稳定性验证结果

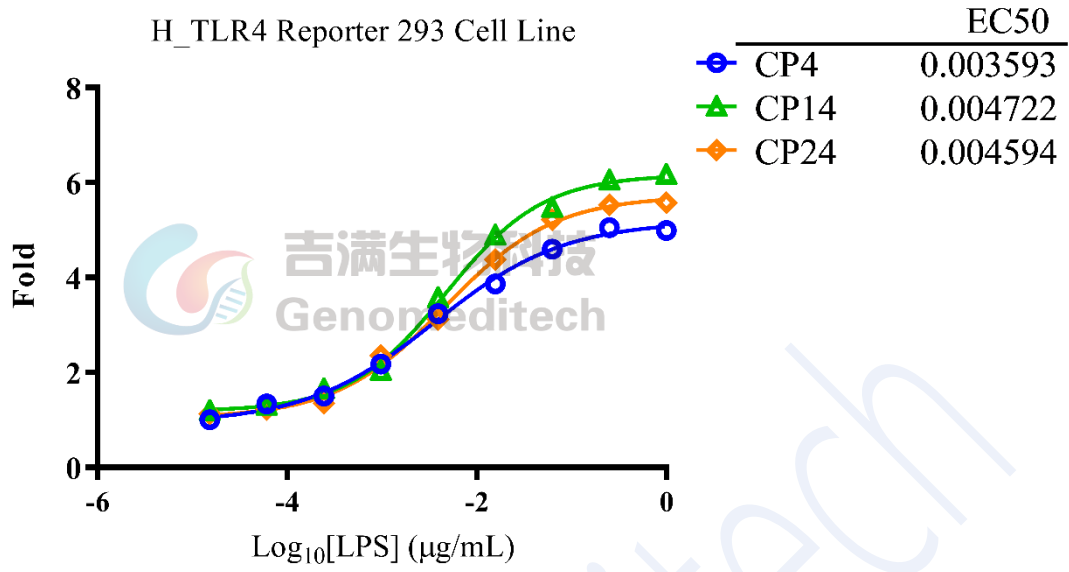


Fig 3. 稳定性验证结果

## 使用许可协议:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、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。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech