

产品手册

Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line

Mouse_TLR7 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：V2.8.240522

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.	Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line 细胞复苏.....	6
2.	Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line 细胞传代.....	6
3.	Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line 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
	使用许可协议:	9

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-C15439	Mouse_TLR7 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-C15439	Mouse_TLR7 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。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 Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系, 是基于 TLR7 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。该细胞稳定表达 TLR7 基因及 Luciferase 报告基因, 可用于针对 TLR7 激动剂的体外激活效果评价。

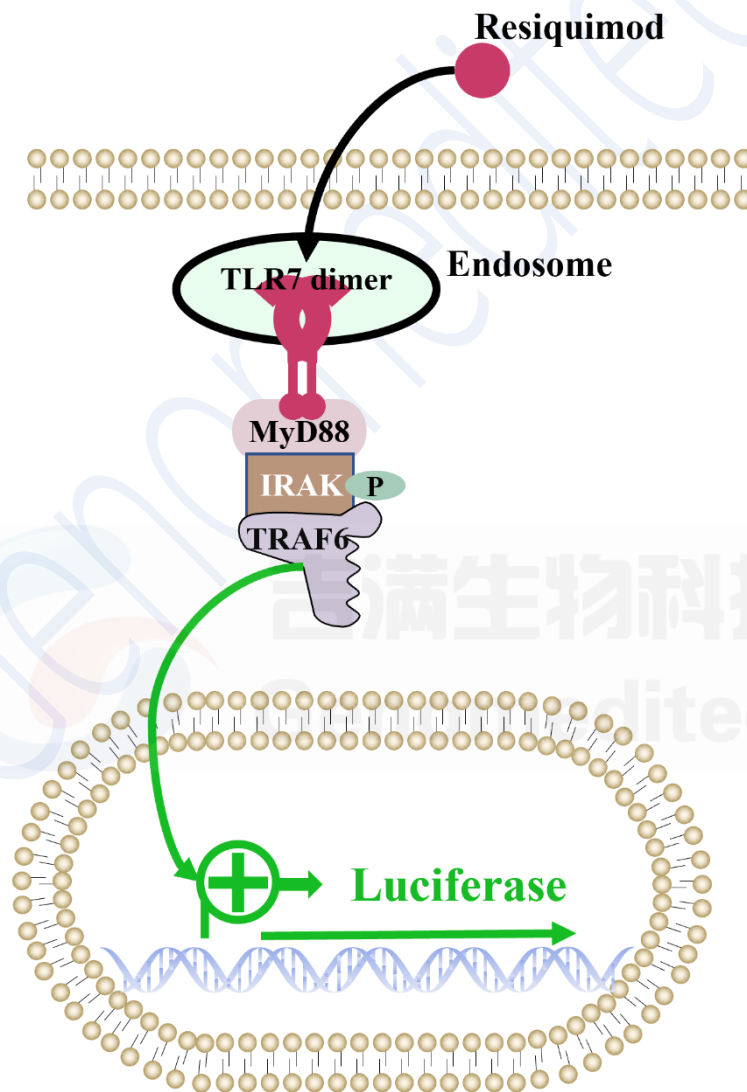


Fig 1. 原理示意图

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+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.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech /GM-040404-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
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	96-well	Corning/3912
Not Treated Microplate		
Passive Lysis 5X Buffer	30 mL	Promega/E1941
Firefly Luciferase Assay Reagent	100 mL	Genomeditech/G0483M002
Resiquimod	/	MCE/#HY-13740

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. Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line 细胞复苏

- a) 37°C水浴锅预热培养基，加入预热后的完全培养基 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°C恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。
- 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，800 rpm，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- d) 使用 1 mL 完全培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞。
- e) 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。

2. Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line 细胞传代

- a) 当细胞密度大于 80%，即可进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 天传代。
- 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 左右完全培养液混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，800 rpm 室温离心 3 min。
- e) 弃上清，细胞沉淀用完全培养液重悬，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%）。

3. Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line 细胞冻存

- a) 使用 1000 rpm，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°C 下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

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 Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line 细胞量为 2×10^4 cells/孔。本次实验使用 Resiquimod(314 Da)作为阳性药物, Conc.01 浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$, Conc.02 浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$, Conc.03-Conc.09 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 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	Resiquimod	PBS	30 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$	3.75 $\mu\text{g/mL}$	937.5 ng/mL	234.38 ng/mL	58.59 ng/mL	14.65 ng/mL	3.66 ng/mL	915.53 pg/mL	0	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 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
Resiquimod	3.142 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 290.5 μL Assay Buffer, B3 孔加入 73.3 μL Assay Buffer, B4-B11 孔, 加入 110 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 2.8 μL Resiquimod），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，从第一孔吸取 73.3 μL 到第二孔，往后依次从前孔吸取 36.7 μL ，加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	2.8 μL Resiquimod	加入	290.5 μL	73.3 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 73.3 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
 h) 从第二个梯度稀释孔 B3 中吸取 36.7 μL ，加入到第三个梯度稀释孔 B4，充分混匀，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 μL 培养基。
 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 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 7 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。

Mouse_TLR7 Reporter 293 Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	915.53 pg/mL
	157794	668600	161959

3) 验证结果

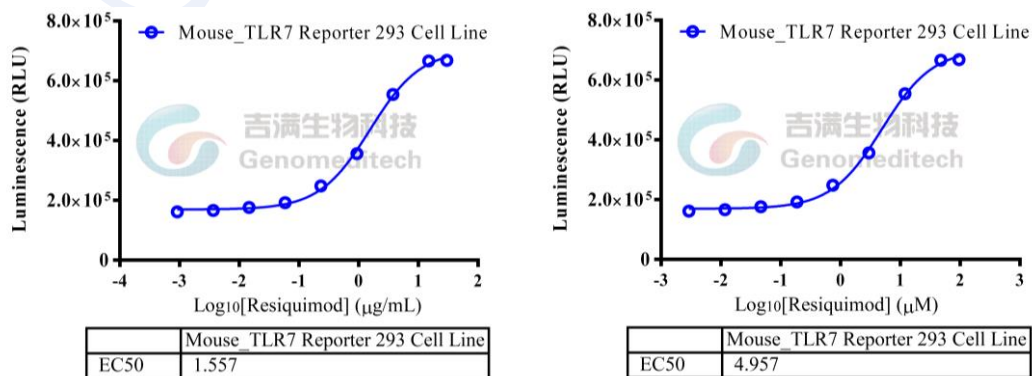


Fig 2. Resiquimod 激活验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

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