

TLR4/NF κ B-Luc/HEK293

CBP74128

操作说明书



4008-750-250

目录

1. 背景信息	1
2. 产品介绍	1
3. 细胞基本信息	2
4. 主要仪器试剂耗材	2
5. 细胞培养	2
5.1 细胞复苏	2
5.2 细胞传代	3
5.3 细胞冻存	3
6. 细胞实验流程	3
6.1 TLR4 Stimulation Assay	3
7. 数据展示	5
8. 相关产品	5

1. 背景信息

Toll 样受体(Tolllikereceptor,TLR)是一种 I 型跨膜蛋白,是人类免疫系统的重要模式识别受体家族,可识别病原体特有分子模式(PAMP),并激活先天性免疫反应。人 TLR 家族有多个成员,其中研究较明确的是 TLR1-TLR9,可分为两类:TLR1、TLR2、TLR4、TLR5 和 TLR6 主要位于细胞膜表面;TLR3、TLR7、TLR8 和 TLR9 主要位于细胞内涵体(endosomal)膜表面。在细胞内 TLR 主要以同源或异二聚体形式存在,在识别 PAMP 后,TLR 改变其构象并将信号传递给 TRIF、TRAM、MyD88 和 TIRAP 等连接蛋白,激活 NF- κ B 和 IRF 信号通路,导致促炎细胞因子和干扰素的产生。

2. 产品介绍

科佰生物推出 TLR4/NF κ B-Luc/HEK293 报告基因细胞,在由 NF κ B 调控并表达 Luc 荧光素酶报告基因的 HEK293 重组细胞 NF κ B-Luc/HEK293 上,稳定表达人 TLR4。

报告基因细胞模型可以很好的反映分子作用机制,同时具备更小的变异性和更好的可操作性,已被中检院及药企广泛应用于抗体药物生物活性的检定,对于药物研发、质量控制、批次放行都有重要意义。

TLR4/NF κ B-Luc/HEK293 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 TLR4 的信号转导过程,原理见图 1 所示。

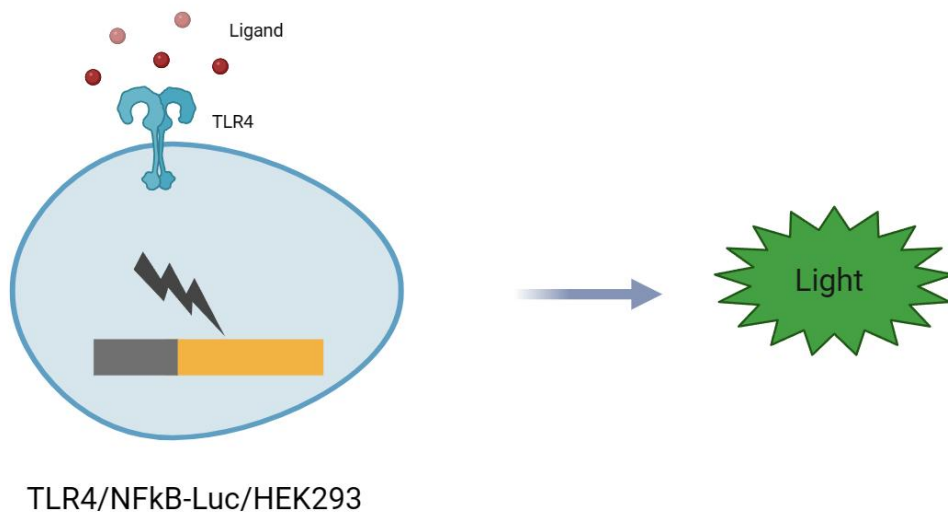


图 1: TLR4/NF κ B-Luc/HEK293 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

母细胞: HEK293

表达基因: TLR4,NFkB-Luc

传代培养基: MEM + 10% Foetal Bovine Serum (FBS)+ 1% Non Essential Amino Acids (NEAA) +
1mM Sodium Pyruvate (NaP) +100ug/ml hygromycin+1ug/ml puromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 贴壁

支原体检测: 阴性

稳定性: 32 代 (室内测试结果, 不表示超过 32 代以上不稳定)

保存条件: 液氮保存

应用: 细胞水平 TLR4 信号传导的激活剂的活性检测, 可用于高通量筛选或 QC 放行

4. 主要仪器试剂耗材

名称	品牌	货号
TLR4/NFkB-Luc/HEK293 完全培养基	Cobioer	CBP74128M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
LPS-EB	/	/
Ultra Luciferase Detection Kit	Cobioer	CBPH0001
96 Well Assay Plate (White Plate, Clear Bottom with Lid Tissue Culture Treated Polystyrene 1/Pack)	Costar	3610
Synergy H1 多功能酶标仪	Biotek	/

5. 细胞培养

5.1 细胞复苏

- 1) 在 37°C 水浴中快速融化细胞约 60 秒。一旦细胞解冻 (可能比 60 秒稍快或稍慢), 快速将冻存管中的细胞吸入装有 10 ml 预热 TLR4/NFkB-Luc/HEK293 完全培养基的 15ml 离心管中。

- 2) 1000 转、5 分钟离心细胞，除去培养基并将细胞重悬于 5 ml 预热的完全培养基中。
- 3) 加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中。
- 4) 复苏 24-36 小时左右换液或传代，将未贴壁的死细胞去掉。

5.2 细胞传代

- 1) 当细胞密度符合传代要求时，PBS 清洗细胞，加入 1ml 胰酶，消化细胞传代。当 80%以上细胞培养瓶轻轻晃动能脱落时，加培养基终止消化，吹打成单细胞，吸入 15ml 离心管，1000 转离心 5 分钟。
- 2) 离心后弃上清，加入新培养基吹打重悬细胞成单细胞，加入新的培养瓶中继续培养。

5.3 细胞冻存

每个 T75 或 10cm 培养皿的细胞消化离心后弃上清。加 2ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入 2 个细胞冻存管。立即放入细胞冻存盒(Nalgene 5100-0001)，加异丙醇到刻度线，放-80°C 冰箱。24 小时后将冻存管转到液氮中长期保存。

6. 细胞实验流程

6.1 TLR4 Stimulation Assay

TLR4 Stimulation Assay 由报告细胞 TLR4/NFκB-Luc/HEK293，Cat. #CBP74128 开展，本实验中使用 LPS-EB 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

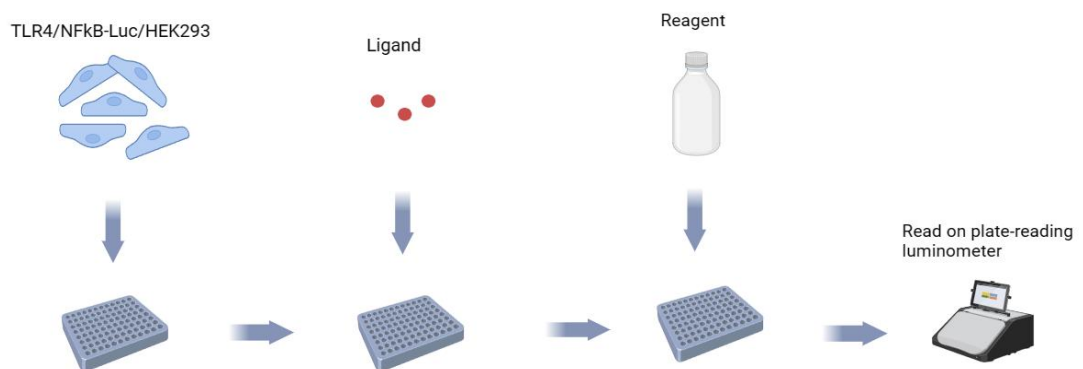


图 2: TLR4 Stimulation Assay 流程示意图

- 1) 取对数期生长的 TLR4/NFκB-Luc/HEK293 细胞消化离心去上清，重悬于新鲜 MEM + 10% Foetal Bovine Serum (FBS)+ 1% Non Essential Amino Acids (NEAA) + 1mM Sodium Pyruvate (NaP) +100ug/ml hygromycin+1ug/ml puromycin 培养基中，细胞密度调整为 3×10^5 Cells/ml。
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中，100ul/孔细胞悬液。
- 3) 第二天，用 MEM + 10% Foetal Bovine Serum (FBS)+ 1% Non Essential Amino Acids (NEAA) + 1mM Sodium Pyruvate (NaP) +100ug/ml hygromycin+1ug/ml puromycin 培养基对样品进行梯度，加入梯度稀释的 10*浓度样品（11.1 ul/孔）到接种好细胞的 96 孔板中，样品从最高浓度开始，3 倍稀释 11 个浓度梯度，每个浓度设置双复孔或三复孔，并设置 0 浓度对照，继续在 37°C 细胞培养箱培养 5.5 到 6 小时。（注意：样品浓度及梯度设置跟样品本身的特性及客户的实验需求高度相关，客户应根据自身的实际情况优化设置，我们不做具体推荐，本梯度稀释方案仅适用我们本次验证实验涉及样本）
- 4) 将 96 孔板从培养箱中取出，加入 100ul/孔 Ultra Luciferase Detection Kit, Cat.#CBPH0001 放置 3 到 5 分钟，放入酶标仪中读取数值。
- 5) 根据每个梯度浓度孔对应的读值，利用 Prism Graphpad 软件拟合样品对细胞激活的梯度曲线，并且计算样品的 EC50。

孔板排布：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
B	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
C	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
D	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
E	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
F	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
G	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照
H	稀释1	稀释2	稀释3	稀释4	稀释5	稀释6	稀释7	稀释8	稀释9	稀释10	稀释11	培养基对照

图 3： 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

TLR4/NF- κ B Reporter - HEK293 Recombinant Cell Line (C4)

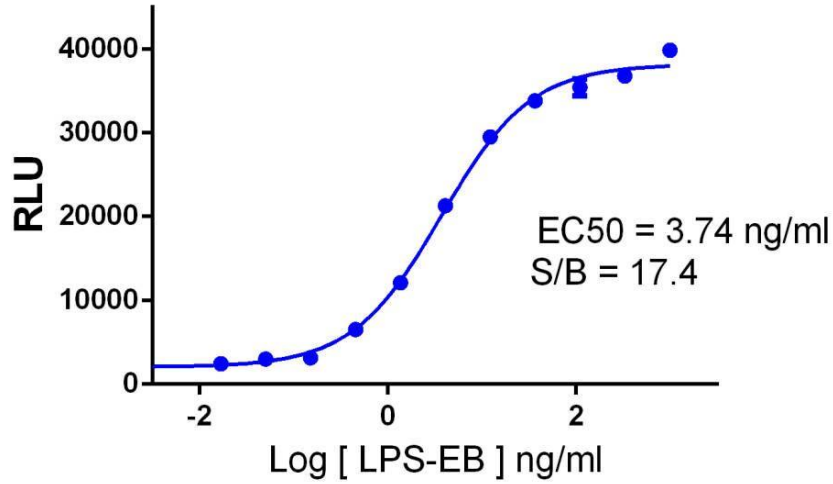


图 4: TLR4 Stimulation Assay 验证结果

8. 相关产品

名称	货号
TLR2/NF κ B-Luc/HEK293	CBP74113
TLR3/NF κ B-Luc/HEK293	CBP74057
TLR4/NF κ B-Luc/HEK293	CBP74128
TLR5/NF κ B-Luc/HEK293	CBP74053
TLR7/NF κ B-Luc/HEK293	CBP74090
TLR8/NF κ B-Luc/HEK293	CBP74021
TLR9/NF κ B-Luc/HEK293	CBP74091