

产品手册

Rat_CALCRR RAMP1(AMY1) Reporter COS-7 Cell Line

Rat_CALCRR RAMP1(AMY1) Reporter COS-7 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.1

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..... | 6 |
| 1. | 细胞培养、冻存、复苏试剂准备..... | 6 |
| 2. | 试剂耗材准备..... | 6 |
| 五、 | 细胞复苏、传代、冻存..... | 7 |
| 1. | 细胞复苏..... | 7 |
| 2. | 细胞传代（以 10 cm 皿为例）..... | 7 |
| 3. | 细胞冻存..... | 7 |
| 六、 | 使用方法..... | 8 |
| 1. | 激活实验..... | 8 |
| 1) | 加样步骤..... | 8 |
| 2) | 报告基因检测..... | 9 |
| 3) | 验证结果..... | 9 |
| 附录 1 : | Calcitonin 验证结果..... | 10 |
| 附录 2 : | RT 验证结果..... | 11 |
| 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-C43917 | Rat_CALCR RAMP1(AMY1) Reporter COS-7 Cell Line | 5E6 Cells/mL |

组成成分

| 产品编号 | 产品名称 | 规格 | 数量 | 储存 |
|-----------|--|--------------|-----|--------|
| GM-C43917 | Rat_CALCR RAMP1(AMY1) Reporter COS-7 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

降钙素基因相关肽家族,包括降钙素(CT, Calcitonin)、胰岛淀粉样肽(AMY, Amylin)、降钙素基因相关肽(CGRP, Calcitonin Gene Related Peptide)、肾上腺髓质素(AM, Adrenomedullin)。

Amylin 有三类潜在受体,均是由降钙素受体(CALCR、CTR)和受体活性修饰蛋白(RAMPs)形成的复合物。受体活性修饰蛋白(RAMPs)是一系列I型单跨膜蛋白,它们与G蛋白偶联受体形成异源二聚体,分为三种亚型:RAMP1, RAMP2和RAMP3。它们具有较大的细胞外氨基末端结构域,单个TM跨膜结构域和短的~10个氨基酸的胞质结构域。这三个RAMP具有相似的基本结构,但氨基酸序列中只有约30%的同源性。CALCR和RAMP1形成的复合物AMY1, CALCR和RAMP2形成的复合物AMY2, CALCR和RAMP3形成的复合物AMY3。

Amylin 由胰腺产生,并作为激素发挥作用,调节营养摄入。Amylin 神经元沉积的研究主要集中在 Amylin 在阿尔茨海默病中的作用。

Amylin 与受体复合物结合后,复合物与G蛋白相互作用,G α s亚基从复合物中分离并激活腺苷酸环化酶,产生cAMP。细胞内cAMP浓度的升高刺激cAMP依赖的信号通路,最终导致转录因子cAMP反应元件结合蛋白与启动子结合,诱导基因表达。

吉满生物 Rat_CALCR RAMP1(AMY1) Reporter COS-7 Cell Line 报告基因细胞系,是基于cAMP信号通路构建的一种Luciferase报告基因细胞系。当Amylin与CALCR/RAMPs结合后,通过激活cAMP信号通路激活荧光素酶(Luciferase)的表达。Luciferase读值即代表信号通路的激活效果,因此可用于Amylin相关药物的体外效果评价。

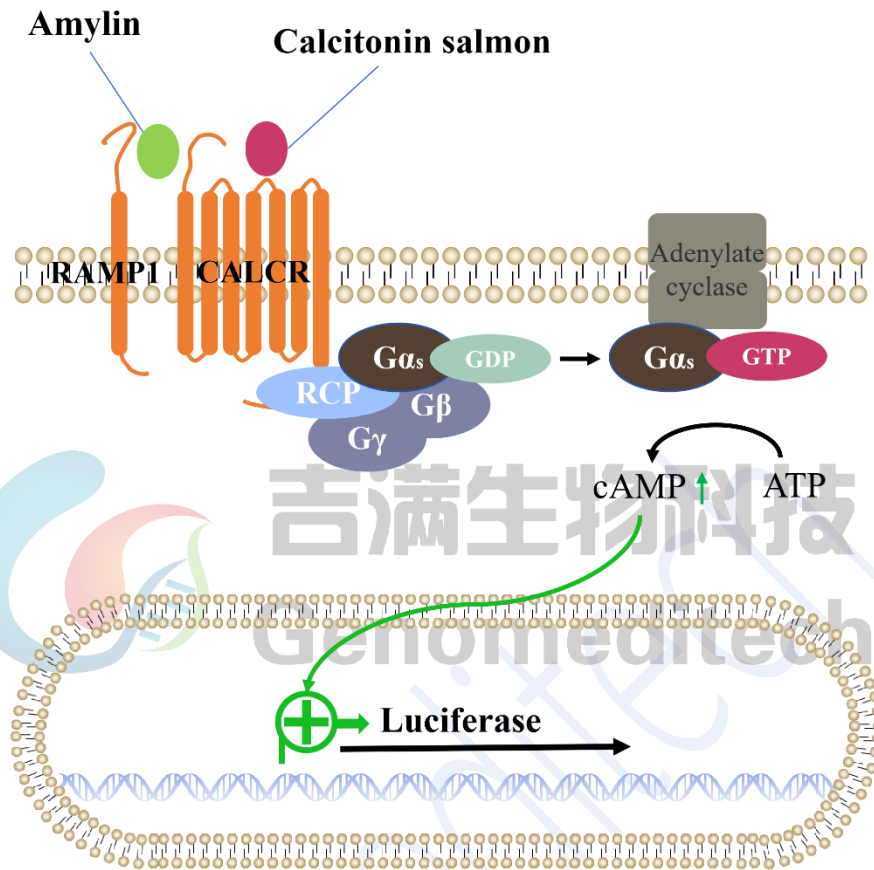


Fig.1 通路示意图

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: | DMEM+10% FBS+1% P.S |
| 细胞生长培养基: | DMEM+10% FBS+1% P.S+10 µg/mL Blasticidin+150 µg/mL Bleomycin+1 µg/mL Puromycin |
| 细胞冻存液: | 90% FBS+10% DMSO |
| Assay Buffer: | DMEM+1% FBS+1% P.S |

2. 试剂耗材准备

试剂准备

| Reagent | Specification | Manufacturer/Catalogue No. |
|---|---------------|------------------------------|
| DMEM | 500 mL | Gibco/C11995500BT |
| Fetal Bovine Serum | 500 mL | ExCell/FSP500 |
| Pen/Strep | 100 mL | Thermo/15140-122 |
| Blasticidin | 10 mg | Genomeditech/GM-040404-1 |
| Bleomycin | 100 mg | Genomeditech/GM-040407-100MG |
| Puromycin | 25 mg | Genomeditech/GM-040401-1 |
| 96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture | 96-well | Corning/3894 |
| 96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated | 96-well | Corning/3912 |
| Microplate | | |
| Amylin, amide, rat | 500 µg | Targetmol/TP1232 |
| Calcitonin salmon | 1 mg | GLPBIO/GC32851 |
| 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 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 $3-4 \times 10^5$ 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 5×10^6 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。

- 细胞为非洲绿猴 SV40 转化的肾细胞，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 90%，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 90%，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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

注意事项：

- FBS 血清需 56 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min，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. 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 Rat_CALCRRAMP1(AMY1) Reporter COS-7 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Amylin, amide, rat (以下简称 Amylin) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 $2 \mu\text{M}$ ，2 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.02 分别排布在 B1-B12，B12 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 | Amylin μM | 2.00 μM | 1.00 μM | 500.00 nM | 250.00 nM | 125.00 nM | 62.50 nM | 31.25 nM | 15.63 nM | 7.81 nM | 3.91 nM | 1.95 nM 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 1×10^5 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。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行）。
- 母液配置

| 药物名称 | 储液 | 母液 | 配置方法 |
|--------|---------------------|----|--------|
| Amylin | $255.1 \mu\text{M}$ | / | 直接使用储液 |

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B1 孔中加入 $240 \mu\text{L}$ 的 Assay buffer，B2-B10 加入 $120 \mu\text{L}$ 的 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 $1.90 \mu\text{L}$ Amylin）。

| 母液吸取 | 梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 120 μ L 加入次孔 | | | | | | | | | | | 对照孔 |
|------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | 1.90 μ L Amylin | 240 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 | 120 μ L |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

- g) 从第一个梯度稀释孔 (如 B1) 中吸取 120 μ L 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 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 孵育过夜的细胞孔板取出, 吸弃上清 100 μ L。
- j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 100 μ L。
- k) 盖上检测板盖, 于 37°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。

| | | | |
|-------------------------------|-----------|-------------|---------|
| Rat_CALCRRAMP3(AMY1) Reporter | 0 μ M | 2.0 μ M | 1.95 nM |
| COS-7 Cell Line | 39592 | 403570 | 55508 |

3) 验证结果

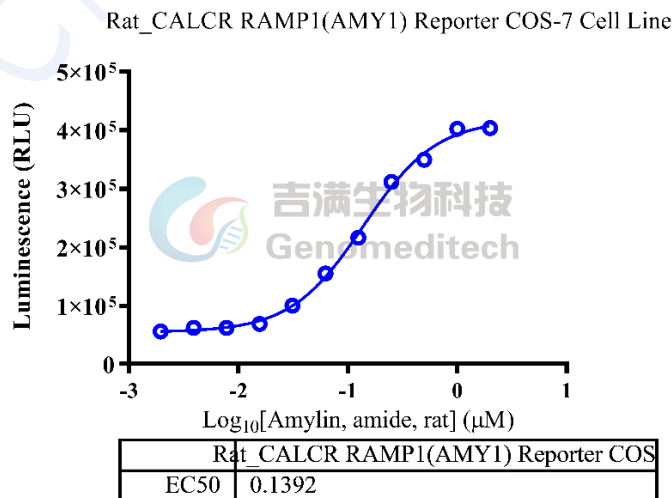


Fig 2. Response to Amylin, amide, rat. The Rat_CALCRRAMP1(AMY1) Reporter COS-7 Cell Line (Cat. GM-C43917) at a concentration of 1E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Amylin,

amide, rat (targetmol/TP1232) in assay buffer (DMEM + 1% FBS+ 1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [10.2]. Data are shown by drug molar concentration.

附录 1 : Calcitonin 验证结果

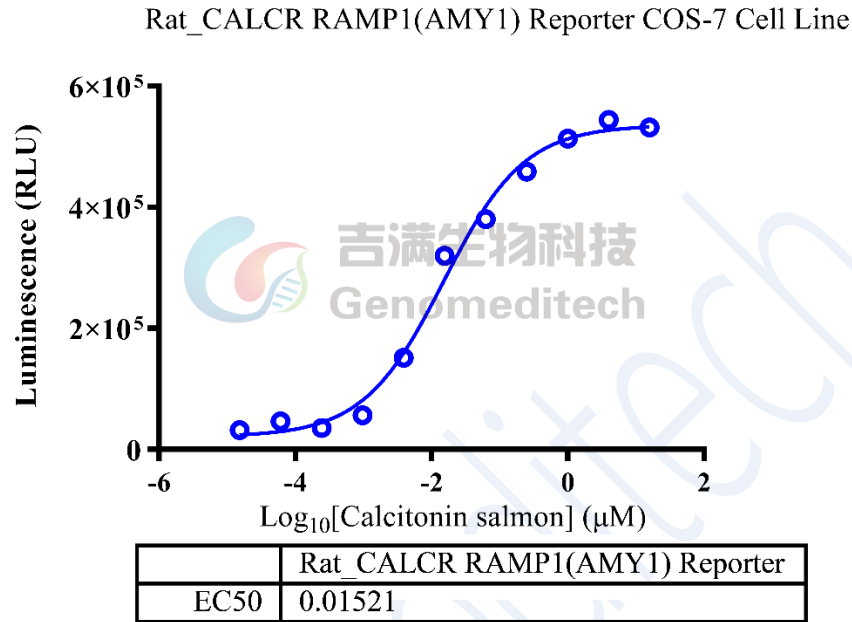


Fig 3. Response to Calcitonin salmon (Salmon calcitonin). The Rat_CALCRR RAMP1(AMY1) Reporter COS-7 Cell Line (Cat. GM-C43917) at a concentration of 1E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Calcitonin salmon (Salmon calcitonin) (Glpbio/GC32851) in assay buffer (DMEM + 1% FBS+ 1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [18.4]. Data are shown by drug molar concentration.

附录 2 : RT 验证结果

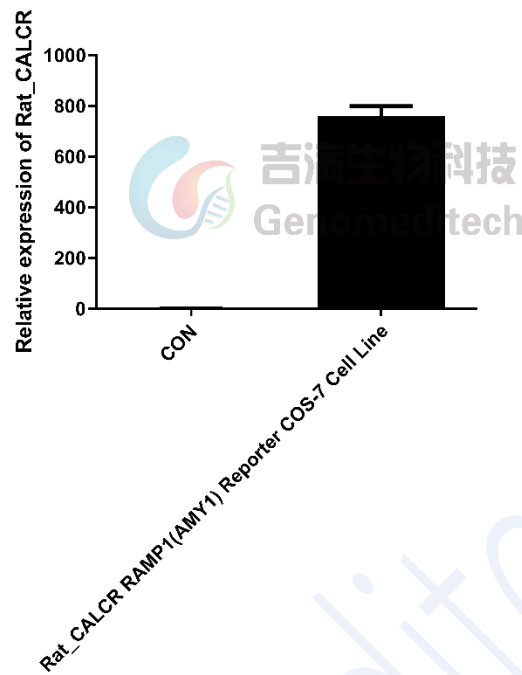


Fig 4. The mRNA expression levels of Rat_CALCR in the Rat_CALCR RAMP1(AMY1) Reporter COS-7 Cell Line (Cat. GM-C43917) were determined by RT-qPCR.

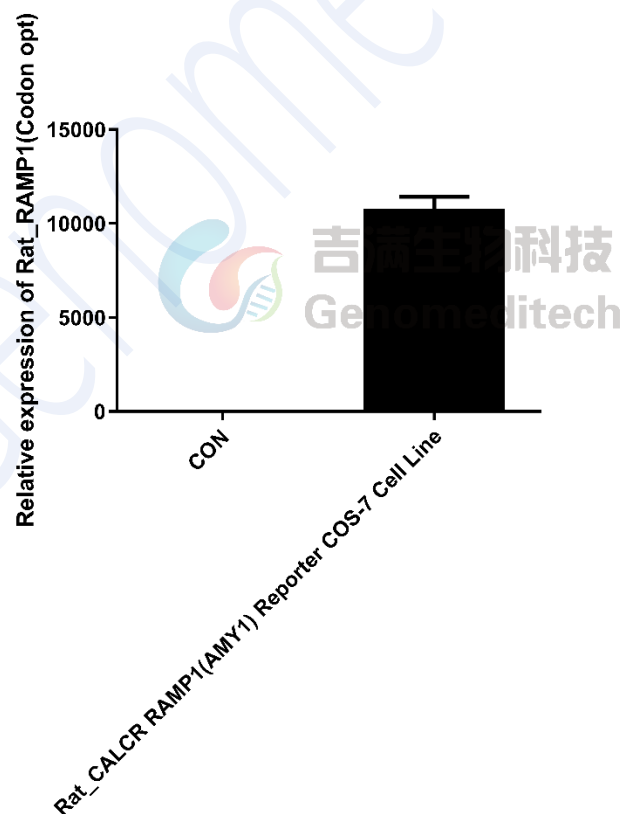


Fig 5. The mRNA expression levels of Rat_RAMP1 in the Rat_CALCR RAMP1(AMY1) Reporter COS-7 Cell Line (Cat. GM-C43917) were determined by RT-qPCR.

相关产品

| GCGR | |
|--|---|
| H_GCGR Reporter CHO-K1 Cell Line | H_GCGR Reporter HEK-293 Cell Line |
| H_GCGR Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line | Cynomolgus_GCGR HEK-293 Cell Line |
| H_GCGR CHO-K1 Cell Line | H_GCGR HEK-293 Cell Line |
| Mouse_GCGR HEK-293 Cell Line | |
| Anti-H_GCGR hIgG2 Antibody(volagidemab) | |
| GLP1R | |
| H_GLP1R Reporter CHO-K1 Cell Line | H_GLP1R Reporter HEK-293 Cell Line |
| H_GLP1R Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line | H_GLP1R β -Arrestin Reporter CHO-K1 Cell Line |
| Cynomolgus_GLP1R GIPR CHO-K1 Cell Line | Cynomolgus_GLP1R HEK-293 Cell Line |
| H_GLP1R CHO-K1 Cell Line | H_GLP1R GIPR CHO-K1 Cell Line |
| H_GLP1R HEK-293 Cell Line | Mouse_GLP1R GIPR CHO-K1 Cell Line |
| Mouse_GLP1R HEK-293 Cell Line | |
| Anti-GLP1R hIgG1 Antibody(mAb-36986) | Anti-H_GLP1R hIgG1 Antibody(glutazumab) |
| FGFR1 | |
| H_FGF21 Reporter HEK-293 Cell Line | |
| Human FGF-21 Protein; His Tag | |
| CALCA(CGRP): CALCRL RAMP | |
| H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 Cell Line | H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line |
| Cynomolgus_CALCRL RAMP1 HEK-293 Cell Line | H_CALCRL RAMP1 CHO-K1 Cell Line |
| H_CALCRL RAMP1 HEK-293 Cell Line | |
| Anti-CALCRL RAMP1 hIgG2 Antibody(Erenumab) | |
| GIP:GIPR | |
| H_GIPR Reporter CHO-K1 Cell Line | H_GIPR Reporter HEK-293 Cell Line |
| H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line | Cynomolgus_GIPR CHO-K1 Cell Line |
| Cynomolgus_GIPR HEK-293 Cell Line | H_GIPR CHO-K1 Cell Line |
| H_GIPR HEK-293 Cell Line | Mouse_GIPR CHO-K1 Cell Line |
| Mouse_GIPR HEK-293 Cell Line | |
| Anti-H_GIPR hIgG1 Antibody(AMG-133) | |
| ACVR2A: ACTRIIB: Active A | |
| ACVR2A KO HEK-293 Cell Line | Activin A Reporter Cell Line |
| BRE Reporter 293 Cell Line | H_ACVR2A Reporter Cell Line |
| H_ACVR2B Reporter Cell Line | ACVR2B KO HEK-293 Cell Line |
| H_ACVR2A HEK-293(ACVR2B KO) Cell Line | H_ACVR2B CHO-K1 Cell Line |
| H_ACVR2B HEK-293(ACVR2A KO) Cell Line | |
| Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Bimagrumab) | Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Fab-17G05) |
| Anti-ACVR2B mIgG2a Antibody(Bimagrumab) | Anti-H_ACVR2B hIgG1 Reference Antibody(Bimbio) |
| Biotinylated Human ACVR2A Protein; His-Avi Tag | Biotinylated Human ACVR2B Protein; His-Avi Tag |
| Biotinylated Mouse ACVR2A Protein; His-Avi Tag | Biotinylated Mouse ACVR2B Protein; His-Avi Tag |

| | |
|--|--|
| Human Activin A Protein; His Tag | Human Activin A Protein; His Tag (CHO) |
| Human Activin B Protein; His Tag | Human ACVR2A Protein; hFc Tag |
| Human ACVR2A Protein; hFc Tag (Sotatercept) | Human ACVR2A Protein; His Tag |
| Human ACVR2B Protein; hFc Tag | Human ACVR2B Protein; His Tag |
| Human latent GDF-8 Protein; His Tag | Mouse ACVR2A Protein; His Tag |
| Mouse ACVR2B Protein; His Tag | |
| AMY: CALCR RAMP | |
| H_CALCRRAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line | H_CALCRR Reporter CHO-K1 Cell Line |
| ASGR1 | |
| H_ASGR1 CHO-K1 Cell Line | H_ASGR1 HEK-293 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。