

产品手册

H_GLP1R CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1
Cell Line

H_GLP1R CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1
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	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.	激活验证实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	9
	附录 1 流式验证结果:	9
	附录 2 RT 验证结果	10
	相关产品	11
	使用许可协议:	12

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-C47057	H_GLP1R CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C47057	H_GLP1R CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 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

胰高血糖素样肽-1 受体(GLP1R)是由 GLP1R 基因编码的 B 类 G 蛋白偶联受体(GPCR),主要表达于胰岛 β 细胞、下丘脑、脑干及胃肠道等组织。作为 GLP-1 的高亲和力受体, GLP1R 可介导肠促胰岛素效应,促进胰岛素分泌、调节血糖稳态并抑制食欲,是 2 型糖尿病、肥胖症和代谢综合征的重要治疗靶点。

降钙素受体 (CALCR) 与受体活性修饰蛋白 3 (RAMP3) 组装形成胰淀素受体 3 (AMY3), 同属 B 类 GPCR。AMY3 主要分布于中枢神经系统及外周代谢组织, 响应胰淀素 (Amylin/IAPP) 刺激, 参与抑制胃排空、增强饱腹感以及调节能量与糖代谢。

GLP1R 与 AMY3 双靶点策略可协同实现降糖、减重及代谢改善。两者受配体激活后, 主要通过 G_s 蛋白激活腺苷酸环化酶 (AC), 升高胞内 cAMP 水平, 继而启动 PKA、EPAC 和 CREB 等下游信号, 促进胰岛素合成与分泌, 并调控食欲及代谢重编程。

吉满生物 H_GLPIR CALCR RAMP3 (AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line 是基于 cAMP-CRE 通路构建的荧光素酶报告基因细胞系。受体被 GLP-1、胰淀素或相关候选药物激活后, 可诱导 Luciferase 表达; 其发光读值可直接反映 GLP1R/AMY3 通路活性, 适用于双靶点药物的体外活性评价。

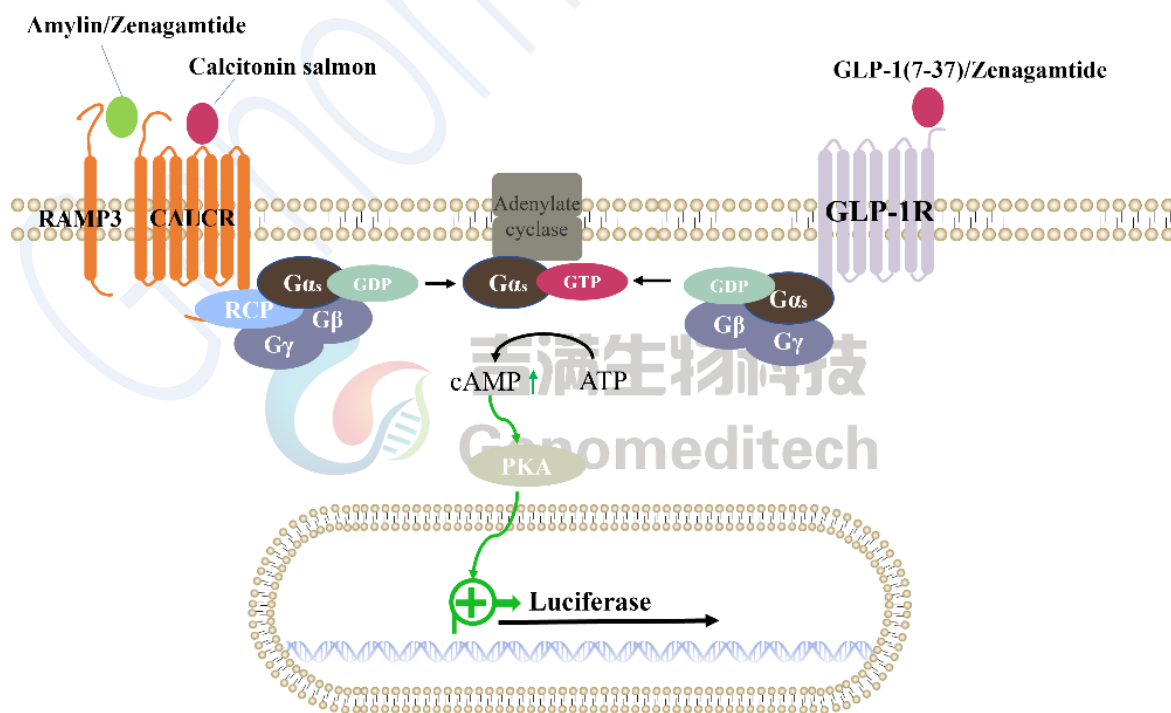


Fig 1.原理示意图

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:	F12K+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	F12K+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin+200 µg/mL G418+100 µg/mL Hygromycin+4 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	F12K+1% FBS+1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403
96 well round cell culture plate	96-well	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	96-well	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	96-well	Saining/1014010
Zenagantide sodium	1 mg	MCE/HY-P11274A
Anti-GLP1R hIgG1 Antibody(mAb-36986)	/	Genomeditech/GM-51168AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	Genomeditech/GM-040513

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。
- 通过补充复苏培养基的形式，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 $176 \times g$ ，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。

- 此细胞呈梭状，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 60%，即可进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:4-1:5，2-3 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 2-3 min，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 20-30%）。

注意事项：

- 细胞状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定，细胞形态均匀，胞体健壮。
- 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（示例）

1. 激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H₂GLP1R CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Zenagamtide sodium (7846.6 Da) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 300 nM，10 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.011 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μ 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	Zenagamtide 300.00 nM	30.00 nM	3.00 nM	300.00 pM	30.00 pM	3.00 pM	300.00 fM	30.00 fM	3.00 fM	300.00 aM	30.00 aM	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 μ L 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖上板盖，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）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Zenagamtide	10 mg/mL (1.274 mM)	12.74 μ M	取 2 μ L 储液+198 μ L Assay Buffer

- 96 孔 U 孔板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1 孔分别加入 133.3 μ L Assay Buffer；B2-B11 孔，分别加入 120 μ L Assay Buffer。

- e) 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 中加入 3.22 μL Zenagamtide），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 13.33 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
													
3.22 μL Zenagamtide	133.3 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL

- f) 从第一个梯度稀释孔 B1 中分别吸取 13.33 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3 中，充分混匀。
- g) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11）。
- h) 将步骤 1 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100 μL 培养基。
- a) 加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100 μL 。
- b) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 6 h。
- c) 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_GLP1R CALCR RAMP3(AMY3)	0.Conc	300.00 nM	30.00 μM
Reporter CHO-K1 Cell Line	799863	21118310	813920

3) 验证结果

H_GLP1R CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line

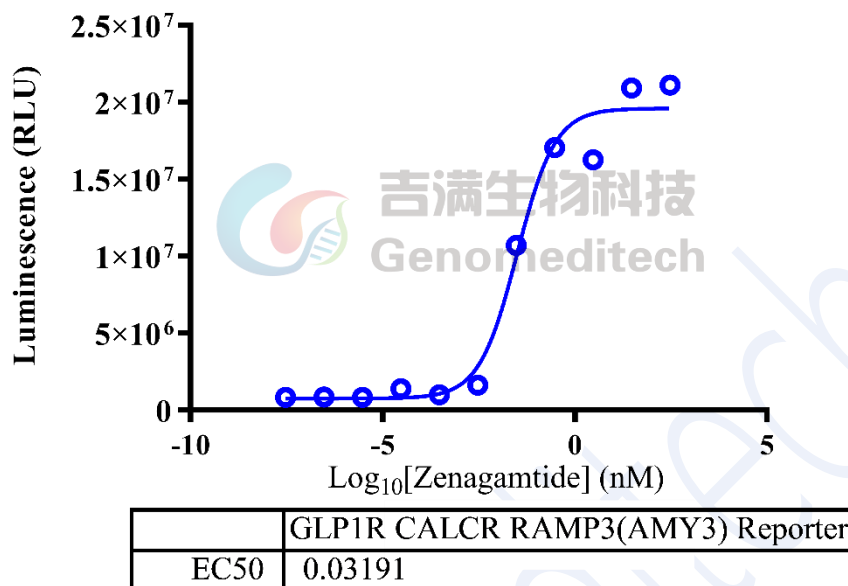


Fig 2. Response to Zenagamtide sodium. H_GLP1R CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C47057) was seeded at a density of 1E4 cells per well in a 96-well plate and incubated overnight. The next day, serial dilutions of the Zenagamtide sodium (MCE/HY-P11274A) were added to the pre-seeded cells. The mixture was incubated for an additional 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [26.4]. Data are shown by drug mass concentration.

附录 1 流式验证结果:

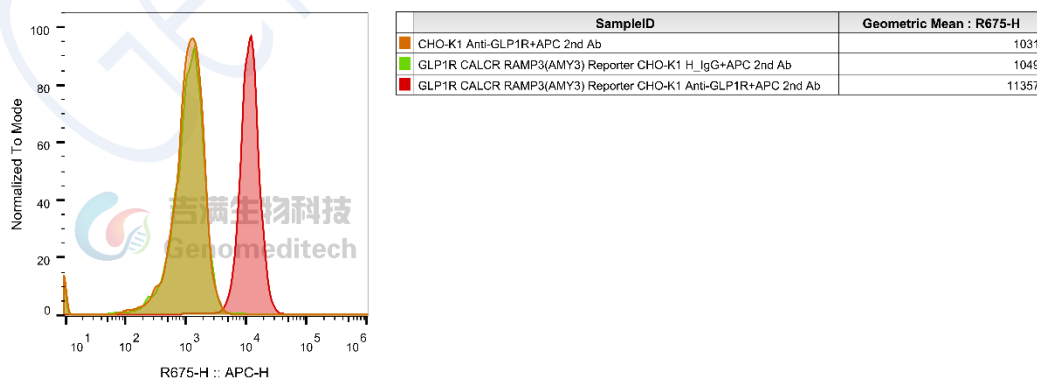


Fig 3. H_GLP1R CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C47057) was determined by flow cytometry using Anti-GLP1R hIgG1 Antibody(mAb-36986)(Cat. GM-51168AB).

附录 2 RT 验证结果

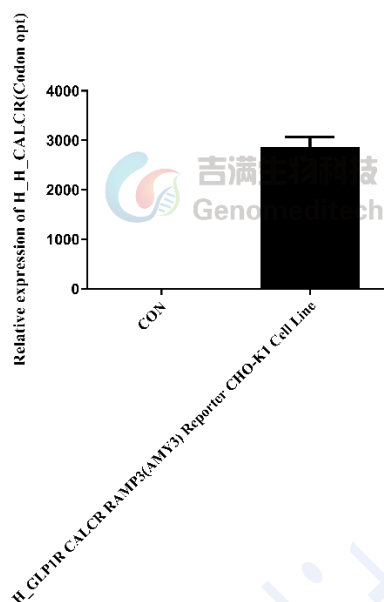


Fig 4. The mRNA expression levels of H_CALCR in the H_GLP1R CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line(Cat. GM-GM-C47057) were determined by RT-qPCR.

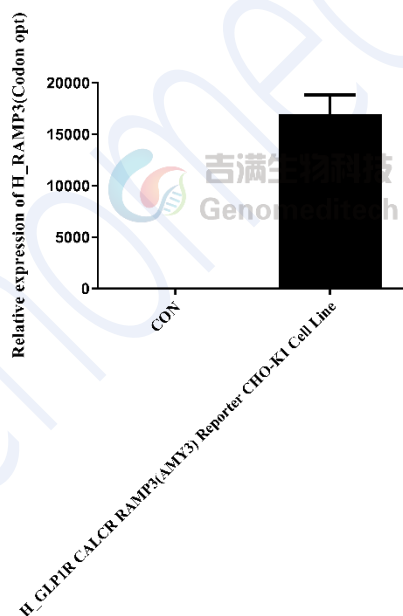


Fig 5. The mRNA expression levels of H_RAMP3 in the H_GLP1R CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line(Cat. GM-GM-C47057) were determined by RT-qPCR.

相关产品

GCGR	
H_GCGR Reporter CHO-K1 Cell Line	H_GCGR Reporter HEK-293 Cell Line
H_GCGR CHO-K1 Cell Line	Anti-H_GCGR hIgG2 Antibody(volagidemab)
H_GCGR HEK-293 Cell Line	Mouse_GCGR HEK-293 Cell Line
GLP1R	
H_GLP1R Reporter CHO-K1 Cell Line	H_GLP1R Reporter HEK-293 Cell Line
H_GLP1R Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line	Tango-H_GLP1R CHO-K1 Cell Line
Cynomolgus_GLP1R HEK-293 Cell Line	H_GLP1R CHO-K1 Cell Line
H_GLP1R HEK-293 Cell Line	Mouse_GLP1R HEK-293 Cell Line
Anti-GLP1R hIgG1 Antibody(mAb-36986)	Anti-H_GLP1R hIgG1 Antibody(glutazumab)
FGF21:FGFR	
H_FGF21 Reporter HEK-293 Cell Line	
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 DDX35TM Cell Line
Cynomolgus_GIPR HEK-293 Cell Line	H_GIPR CHO-K1 Cell Line
H_GIPR HEK-293 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
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 B Protein; His Tag
Human ACVR2A Protein; hFc Tag	Human ACVR2A Protein; His Tag
Human ACVR2B Protein; hFc Tag	Human ACVR2B Protein; His Tag
Human latent GDF-8 Protein; His Tag	Mouse ACVR2B Protein; His Tag
AMY: CALCR RAMP	
H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line	H_CALCR Reporter CHO-K1 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。