

产品手册

H_CALCR RAMP2(AMY2) Reporter CHO-K1 Cell Line

H_CALCR RAMP2(AMY2) 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.....	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
1)	报告基因检测.....	10
2)	验证结果.....	10
附录 1	RT 验证结果.....	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-C44180	H_CALCRRAMP2(AMY2) 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-C44180	H_CALCRRAMP2(AMY2) 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

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 H₂CALCR RAMP2(AMY2) Reporter CHO-K1 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。

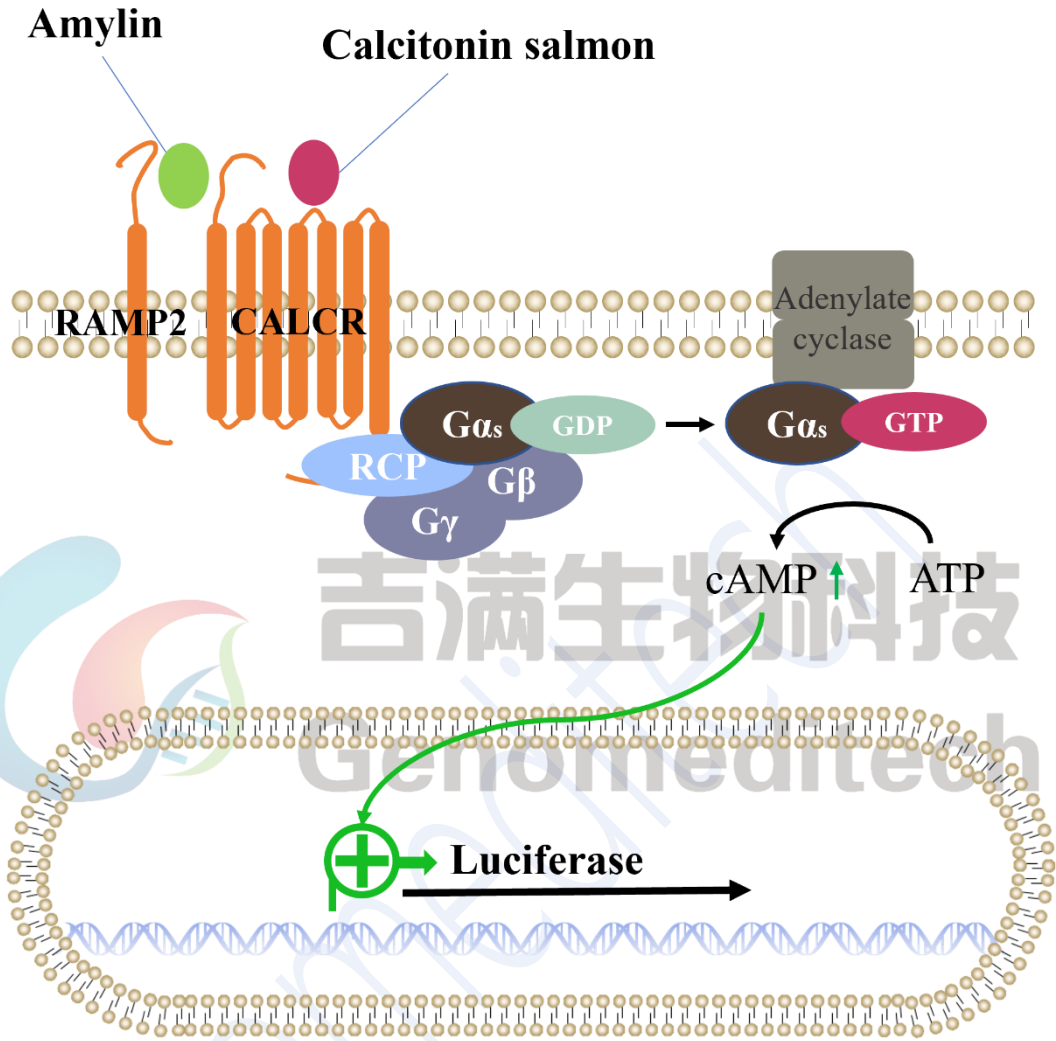


Fig.1 CALCR RAMP2(AMY2) 通路示意图

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:	F12K+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	F12K+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin+50 µg/mL Bleomycin+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.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Bleomycin	1 g	Genomeditech/ GM-040407-1G
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
96 well round cell culture plate	Plate	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	Plate	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	Plate	Saining/1014010
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C
Amylin, human, amide	0.5 mg	Genscript/RP11278CN
Eloralintide	/	MCE/HY-P10798
Calcitonin salmon (Salmon calcitonin)	/	TargetMOI/TP1040

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 × 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 $2-3 \times 10^5$ 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 × 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 × 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

1. 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_CALCR RAMP2(AMY2) Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。

本次实验使用 Amylin、Calcitonin salmon、Eloralintide 作为阳性药物，其中 Amylin、Calcitonin salmon (Salmon calcitonin) 药物 Conc.01 浓度为 150 nM，8 倍梯度稀释。Eloralintide 药物 Conc.01 浓度为 100 nM，10 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10、C2-C10、D2-D10，B11、C11、D11 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	Amylin	150.00 nM	18.75 nM	2.34 nM	292.97 pM	36.62 pM	4.58 pM	572.20 fM	71.53 fM	8.94 fM	0	PBS
C	Calcitonin salmon	150.00 nM	18.75 nM	2.34 nM	292.97 pM	36.62 pM	4.58 pM	572.20 fM	71.53 fM	8.94 fM	0	PBS
D	Eloralintide	100.00 nM	10.00 nM	1.00 nM	100.00 pM	10.00 pM	1.00 pM	100.00 fM	10.00 fM	1.00 fM	0	PBS
E		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
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/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。
- 使用无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行、C 行、D 行）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Amylin	100 μ M	10 μ M	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer

Calcitonin salmon	1 mM	10 μ M	取 2 μ L 储液+198 μ L Assay Buffer
Eloralintide	1 mM	10 μ M	取 2 μ L 储液+198 μ L Assay Buffer

- e) 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 137.1 μ L 的 Assay buffer, B3-B11 加入 120 μ L 的 Assay Buffer; C2 孔中加入 137.1 μ L 的 Assay buffer, C3-C11 加入 120 μ L 的 Assay Buffer; D2 孔中加入 133.3 μ L 的 Assay buffer, D3-D11 加入 120 μ L 的 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 2.09 μ L Amylin, C2 中加入 2.09 μ L Calcitonin salmon, D2 中加入 1.35 μ L Eloralintide)。

母液吸取		梯度稀释孔, B 行和 C 行依次从前孔吸取 17.14 μ L 加入次孔, D 行依次从前孔吸取 13.33 μ L 加入次孔,										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	2.09 μ L Amylin 加入		137.1 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	2.09 μ L Calcitonin salmon 加入		137.1 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	
D	1.35 μ L Eloralintide 加入		133.3 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	
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 (如 B2、C2) 中吸取 17.14 μ L 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 B3、C3), 从第一个梯度稀释孔 (如 D2) 中吸取 13.3 μ L 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 D3) 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10、C10、D10)。
- 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) 收样检测 Luciferase。

1) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CALCR RAMP1(AMY1) Reporter CHO-K1 Cell Line+Amylin	0 nM	150 nM	8.94 fM
	898722	31403038	773229
H_CALCR RAMP1(AMY1) Reporter CHO-K1 Cell Line+Calcitonin salmon	0 nM	150 nM	8.94 fM
	857210	37674307	762730
H_CALCR RAMP1(AMY1) Reporter CHO-K1 Cell Line+Eloralintide	0 nM	100 nM	1.00 fM
	854577	25295814	746154

2) 验证结果

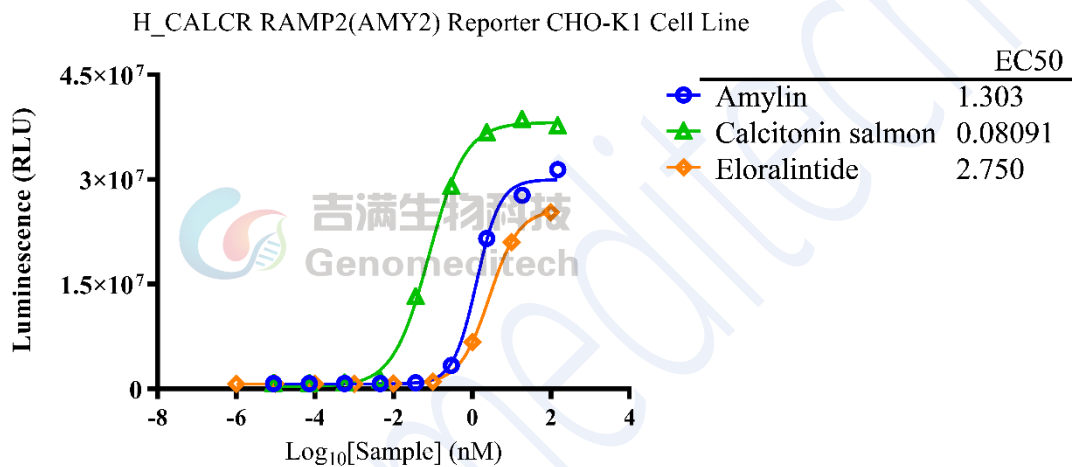


Fig. 2 Response to Amylin, Calcitonin salmon and Eloralintide. The H_CALCR RAMP2(AMY2) Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C44180) at a density of 1E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Amylin (Genscript/RP11278CN), Calcitonin salmon (TargetMOI/TP1040) and Eloralintide(MCE/HY-P10798) in assay buffer (F12K+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 [34.9], [43.9] and [29.6]. Data are shown by drug molar concentration.

附录 1 RT 验证结果

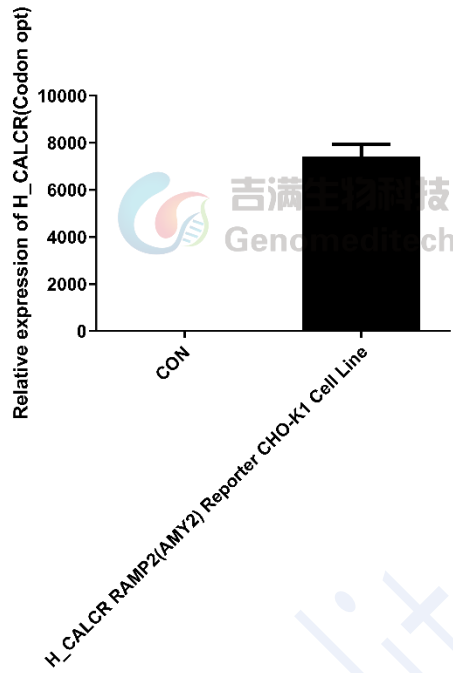


Fig. 3 The mRNA expression levels of H_CALCR in the H_CALCR RAMP2(AMY2) Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C44180) were determined by RT-qPCR.

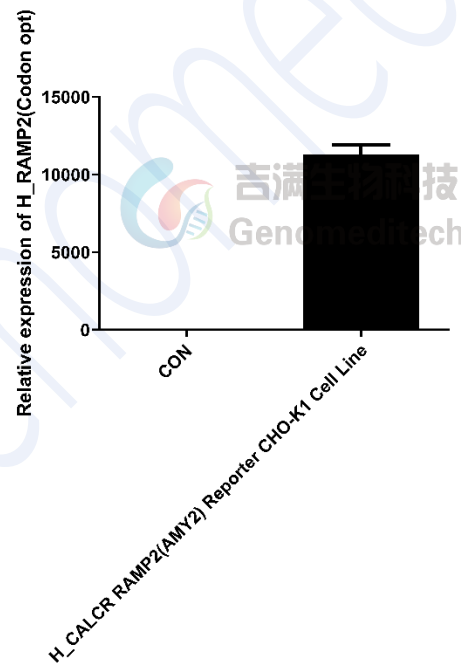


Fig. 4 The mRNA expression levels of H_RAMP2 in the H_CALCR RAMP2(AMY2) Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C44180) were determined by RT-qPCR.

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: CALCRRAMP	
H_CALCRRAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line	H_CALCRRAMP 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。