

## 产品手册

### H\_LPAR1 Reporter CHO-K1 Cell Line

### H\_LPAR1 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：V2.12.2

## 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.	激活实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	抑制实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	11
3)	验证结果.....	11
相关产品:	.....	12
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-C43374	H_LPAR1 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-C43374	H_LPAR1 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

LPAR1基因（Lysophosphatidic Acid Receptor 1）编码一种属于G蛋白偶联受体（GPCR）家族的跨膜蛋白，是溶血磷脂酸（Lysophosphatidic acid, LPA）的受体之一。该受体能够介导LPA在细胞内触发的多种信号转导途径，包括Rho、Ras、PLC、PI3K和MAPK等信号通路，从而调控细胞增殖、迁移、存活、分化及细胞骨架重塑等生物学过程。LPAR1在多种组织中广泛表达，尤其在神经系统、心血管系统及肾脏中具有较高水平。越来越多的研究显示，LPAR1在胚胎发育、神经系统发育及纤维化、肿瘤转移等多种病理生理过程中发挥重要作用。因此，LPAR1不仅是研究细胞信号转导的重要分子，也被认为是多种疾病潜在的治疗靶点。

吉满生物H\_LPAR1 Reporter CHO-K1 Cell Line细胞系，是一种 Luciferase 报告基因细胞系。当LPA等结合受体后，激活下游信号通路，从而激活荧光素酶（Luciferase）的表达。Luciferase读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于LPAR1相关药物的体外效果评价。

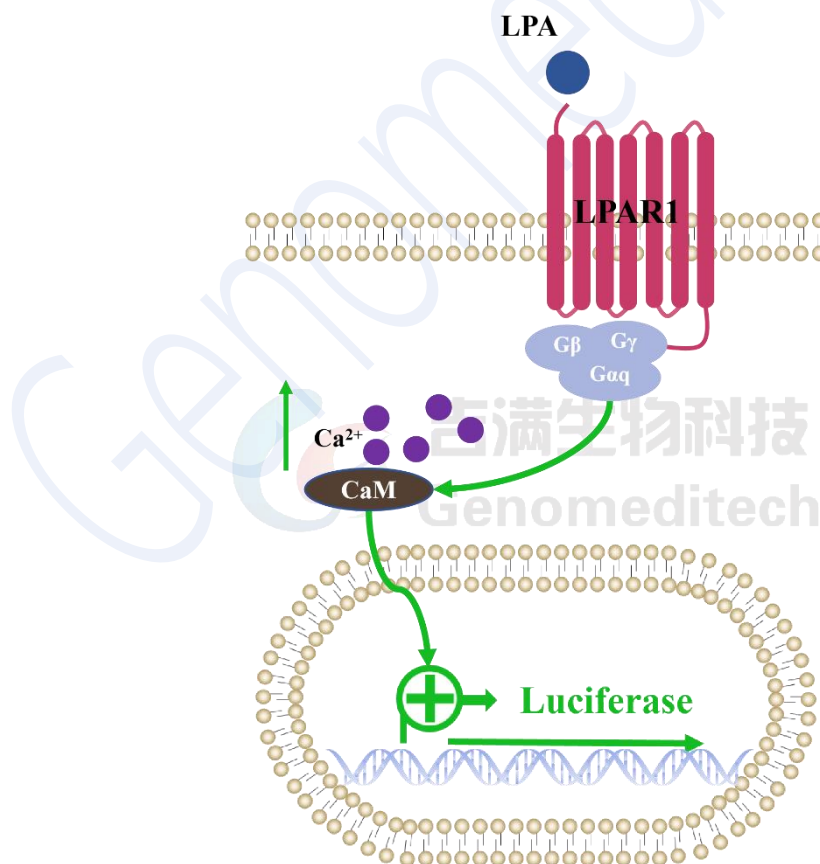


Fig 1.作用原理

## 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+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
96-well U-bottom Plate	96-well	Saining/1014010
96-well White Opaque Plate	96-well	Thermo/236108
96 well round cell culture plate	Plate	PakGent/CL-PT096
1-Oleoyl lysophosphatidic acid sodium	1 mg	MCE/HY-107614
Anti-LPAR1 hIgG1 Antibody(Ab17)	/	Genomeditech/GM-88355AB
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

- 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 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  $2-3 \times 10^5$  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  $5 \times 10^6$  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（示例）

### 1. 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_LPAR1 Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 1-Oleoyl lysophosphatidic acid sodium（以下简称 LPA；分子量 458.50 Da）作为阳性药物，Conc.01 浓度终为  $60 \mu\text{M}$ ，2 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.8 分别排布在 B2-B9，B10 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	
B	LPA	PBS	60.00 $\mu\text{M}$	30.00 $\mu\text{M}$	15.00 $\mu\text{M}$	7.50 $\mu\text{M}$	3.75 $\mu\text{M}$	1.88 $\mu\text{M}$	937.50 nM	468.75 nM	0	PBS
C	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  $1 \times 10^5$  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 U 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
LPA	5 mM	/	直接使用储液

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入  $240 \mu\text{L}$  的 Assay buffer，B2-B12 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  $2.91 \mu\text{L}$  LPA）。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 120 $\mu$ L 加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	2.91 $\mu$ L LPA	加入	240 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	
C												
D												
E						1						
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 (如 B2) 中吸取 120  $\mu$ L 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 B3), 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 10 个梯度稀释孔 (B9)。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出, 吸弃上清。
- j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 100  $\mu$ L。
- k) 盖上检测板盖, 于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16 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。

H_LPAR1 Reporter CHO-K1 Cell Line	0 $\mu$ M	60 $\mu$ M	468.75 $\mu$ M
	1057259	4356097	902232

## 3) 验证结果

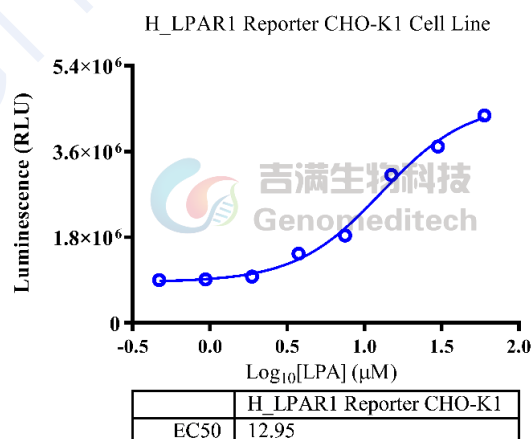


Fig. 2 Response to 1-Oleoyl lysophosphatidic acid sodium. The H\_LPAR1 Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C43374) at a concentration of 1E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of 1-Oleoyl lysophosphatidic acid sodium (MCE/HY-107614) in assay buffer (F12K + 1% FBS + 1% P.S) for 16 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [4.1]. Data are shown by drug molar concentration.

## 2. 抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_LPAR1 Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^4$  cells/孔。本次实验分别使用 1-Oleoyl lysophosphatidic acid sodium (以下简称 LPA) 作为激活药物 (定浓  $15 \mu\text{M}$ )，Anti-LPAR1 hIgG1 Antibody(Ab17)作为 block 抗体 (以下简称 Anti-LPAR1)。Conc.01 终浓度分别为  $2 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.9 分别排布在 B2-B10，B11 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	Anti-LPAR1	2.00 $\mu\text{g/mL}$	666.67 $\text{ng/mL}$	222.22 $\text{ng/mL}$	74.07 $\text{ng/mL}$	24.69 $\text{ng/mL}$	8.23 $\text{ng/mL}$	2.74 $\text{ng/mL}$	914.49 $\text{pg/mL}$	304.83 $\text{pg/mL}$	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  $1 \times 10^5$  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。
- 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 B2-B11)。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-LPAR1	2.84 $\text{mg/mL}$	/	直接使用储液

- 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 加入  $90 \mu\text{L}$  Assay Buffer，B3-B11 孔，加入  $60 \mu\text{L}$  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 加入  $0.13 \mu\text{L}$  Anti-LPAR1)，混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 30 $\mu$ L, 加入次孔										对照组	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.13 $\mu$ L Anti-LPAR1	加入	90 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 30  $\mu$ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 充分混匀;
- h) 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, 吸弃上清。加入步骤 h 梯度稀释好的抗体, 每孔 50  $\mu$ L, 盖上盖板, 放入培养箱中孵育 1 h。
- j) 配置激活药物 LPA (2  $\times$  激活浓度), 30  $\mu$ M LPA (7.24  $\mu$ L 5 mM LPA 母液加入到 1.20 mL Assay Buffer 中, 混匀后使用)。
- k) 1 h 后, 将步骤 i 细胞孔板取出, 加入步骤 j 准备好的激活药物, 每孔 50  $\mu$ L。
- l) 盖上班盖, 于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 15 h。
- m) 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_LPAR1 Reporter CHO-K1 Cell Line+Anti-LPAR1 hIgG1 Antibody(Ab17)	LPA+ 0 $\mu\text{g/mL}$ Ab17	LPA +2 $\mu\text{g/mL}$ Ab17	LPA +304.83 $\mu\text{g/mL}$ Ab17
	4991218	1735122	4983512

## 3) 验证结果

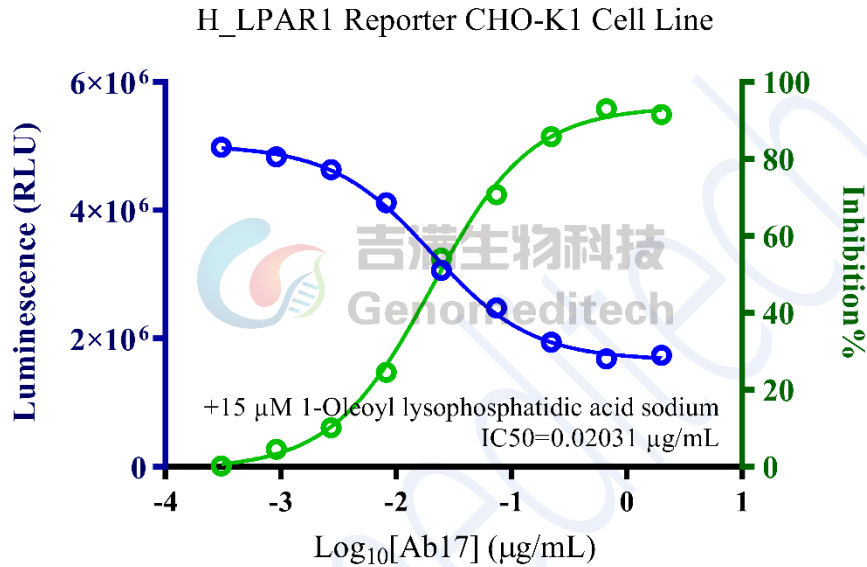


Fig 3. Inhibition of 1-Oleoyl lysophosphatidic acid sodium-induced reporter activity by Anti-LPAR1 hIgG1 Antibody(Ab17). Serial dilutions of the Anti-LPAR1 hIgG1 Antibody(Ab17) (Cat. GM-88355AB) were incubated with  $1 \times 10^4$  cells/well of the H\_LPAR1 Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C43374) in a 96-well plate for 1 hour in assay buffer (F12K + 1% FBS + 1% P.S). Subsequently, the 1-Oleoyl lysophosphatidic acid sodium (MCE/HY-107614) at a density of 15  $\mu\text{M}$  was added, and the coculture proceeded for an additional 6 hours. Firefly luciferase activity was then measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) (left Y-axis, relative luminescence units), with inhibition percentages shown on the right Y-axis. Data are shown by drug mass concentration.

## 相关产品:

LPAR1	
<a href="#">H_LPAR1 CHO-K1 Cell Line</a>	

## 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。