

产品手册

H_GLP1R Reporter CHO-K1 Cell Line

H_GLP1R 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.	激动剂激活实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	8
2.	Block 抗体抑制实验	9
1)	加样步骤	9
2)	报告基因检测	10
3)	验证结果	11
附录 1	cAMP 检测	12
相关产品		12
使用许可协议：		14

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-C09150	H_GLP1R 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-C09150	H_GLP1R 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(GLP-1R)是在胰腺细胞和大脑神经元上发现的一种受体蛋白。在人类中，它是由位于 6 号染色体上的 GLP1R 基因合成的。它是 G 蛋白偶联受体中胰高血糖素受体家族的成员。

被激活的 GLP-1R 刺激腺苷酸环化酶通路，导致胰岛素合成和胰岛素释放增加。因此，GLP-1R 一直是开发治疗糖尿病药物(通常称为 GLP1R 激动剂)的目标。GLP-1R 也在大脑中表达，参与控制食欲。

GLP-1R 是一种多效性偶联受体，N 端识别特异性的配体，通过与多种 G 蛋白 (Gas、Gai、Gao 和 Gaq/11) 偶联来调控细胞通路。当与 GLP-1(7-37)结合后，G 蛋白 α 亚基与 β 、 γ 亚基解离，Gas 蛋白偶联，激活腺苷酸环化酶 (cAMP)，促使 cAMP 在细胞内含量升高并增加蛋白激酶 A (PKA) 的含量，激活下游信号通路，引起胰岛素基因转录增加。

吉满生物 H_GLP1R Reporter CHO-K1 Cell Line 报告基因细胞系，是基于 cAMP-PKA 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 GLP-1(7-37)与其受体结合时，亚基互相解离。Gas 蛋白偶联，激活腺苷酸环化酶，促使 cAMP 在细胞内含量升高并增加 PKA 的含量。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 GLP1R 相关药物的体外效果评价。

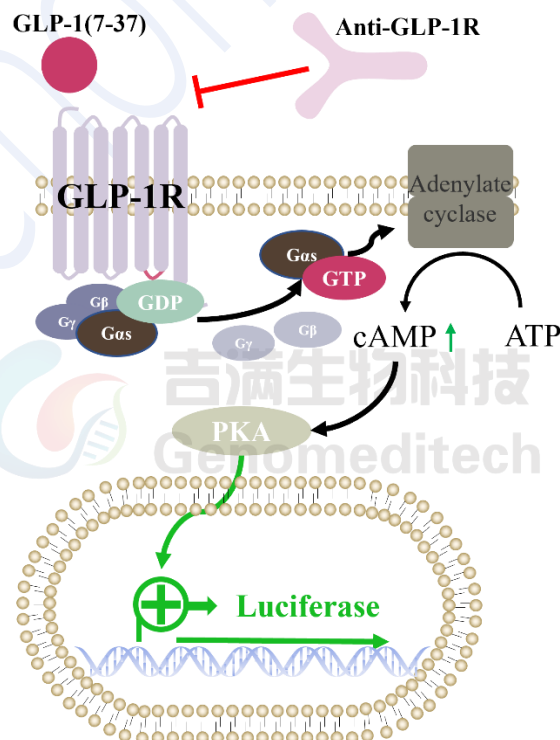


Fig 1.原理示意图

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+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
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C
GLP-1(7-37)	/	MCE/HY-P0055
Anti-GLP1R hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/GM-51168AB

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 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 $176 \times g$ ，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. 激动剂激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_GLP1R Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。本次实验使用 GLP-1(7-37) (3355.67 Da) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.10 分别排布在 B2-B11，B12 为 0 浓度对照。周围为 $100 \mu\text{L}$ PBS，以防止边孔蒸发。

孔板布局：

	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	GLP-1(7-37)	1 $\mu\text{g/mL}$	333.33 ng/mL	111.11 ng/mL	37.04 ng/mL	12.35 ng/mL	4.12 ng/mL	1.37 ng/mL	457.25 pg/mL	152.42 pg/mL	50.81 pg/mL	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 1.5×10^5 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 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B11）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
GLP-1(7-37)	10 mg/mL	0.1 mg/mL	取 $2 \mu\text{L}$ 储液+ $198 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 $163.3 \mu\text{L}$ Assay Buffer，B3-B12 孔，加入 $110 \mu\text{L}$ 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 中加入 $1.65 \mu\text{L}$ GLP-1(7-37)），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 55 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.65 μL GLP-1(7-37)	加入	163.3 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 55 μ L, 加入到第 2 个梯度稀释孔 B3, 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 10 个梯度稀释孔 (B11)。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出, 每孔吸弃 90 μ L 培养基。
- j) 加入之前准备好的梯度稀释液, 每孔 100 μ L。
- k) 盖上板盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 7 h。
- l) 使用报告基因检测试剂盒, 检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_GLP1R Reporter CHO-K1	0 μ g/mL	1 μ g/mL	16.94 pg/mL
Cell Line	331137	21976487	311211

3) 验证结果

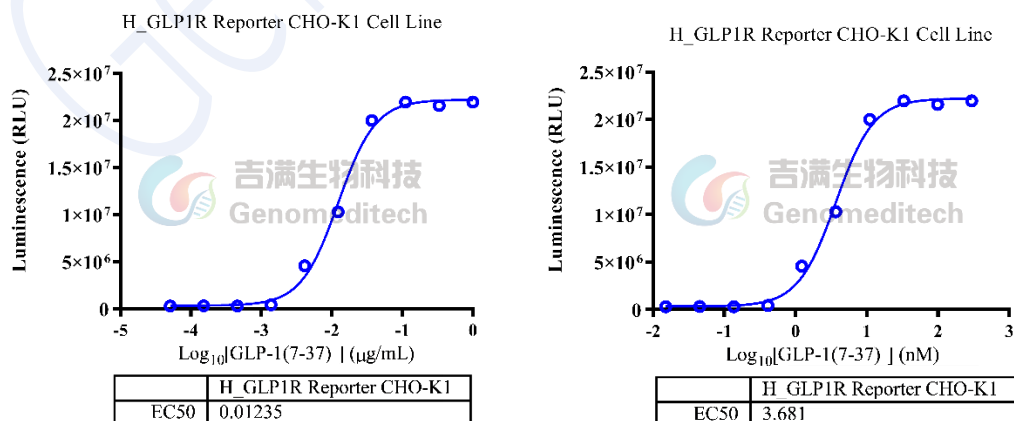


Fig 2. 功能验证结果

(右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

2. Block 抗体抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_GLP1R Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。本次实验使用 GLP-1(7-37) (3355.67 Da) 作为激活药物（激活终浓度为每孔 10 ng/mL）以及 Anti-GLP1R hIgG1 Antibody（以下简称为 Anti-GLP1R; 150 kDa）作为 block 抗体, Conc.01 终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 3 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照。周围为 100 μL PBS，以防止边孔蒸发。

孔板布局:

	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-GLP1R	100 $\mu\text{g/mL}$	33.33 $\mu\text{g/mL}$	11.11 $\mu\text{g/mL}$	3.7 $\mu\text{g/mL}$	1.23 $\mu\text{g/mL}$	411.52 ng/mL	137.17 ng/mL	45.72 ng/mL	15.24 ng/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 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜使用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
GLP-1(7-37)	10 mg/mL	0.01 mg/mL	取 2 μL 储液+1998 μL Assay Buffer
Anti-GLP1R	2.17 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 74.9 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 μL 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 7.6 μL Anti-GLP1R），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 27.5 μ L，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	7.6 μ L Anti-GLP1R	加入	74.9 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5 μ L，加入到第 2 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，每孔吸弃 90 μ L 培养基。加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 50 μ L，盖上盖板，在培养箱中孵育 1 h。
- j) 此时配置激活药物 GLP-1(7-37)（2 $\times$ 激活浓度），取 1.7 μ L 稀释后的母液，加入到 823.4 μ L 的 Assay Buffer 中，混匀。
- k) 1 h 后，将步骤 i 的细胞孔板取出，加入步骤 j 配置好的激活药物，每孔 50 μ L。
- l) 盖上板盖，于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- m) 使用报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_GLP1R Reporter CHO-K1 Cell Line+Anti-GLP1R	GLP-1(7-37) + No Ab Control	GLP-1(7-37) + 100 μ g/mL Anti- GLP1R	GLP-1(7-37) + 15.24 ng/mL Anti-GLP1R
	5734728	252093	5393917

3) 验证结果

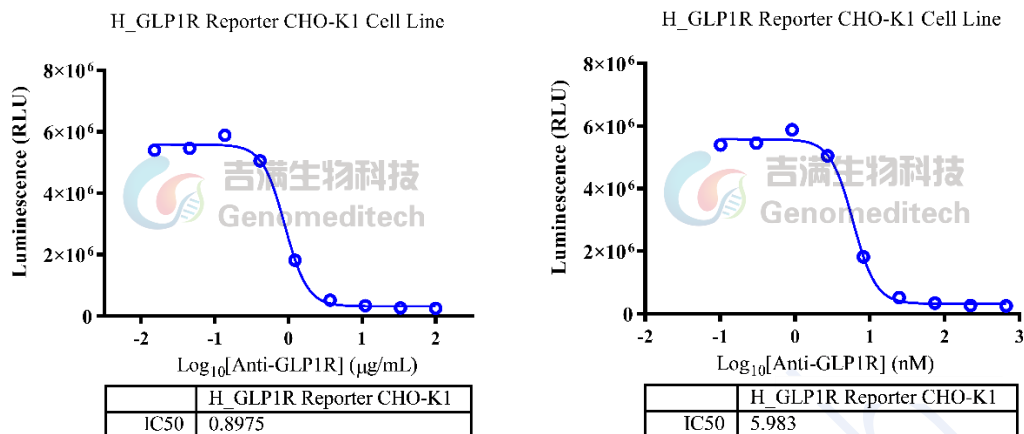


Fig 3.抗体抑制验证结果
 (右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1 cAMP 检测

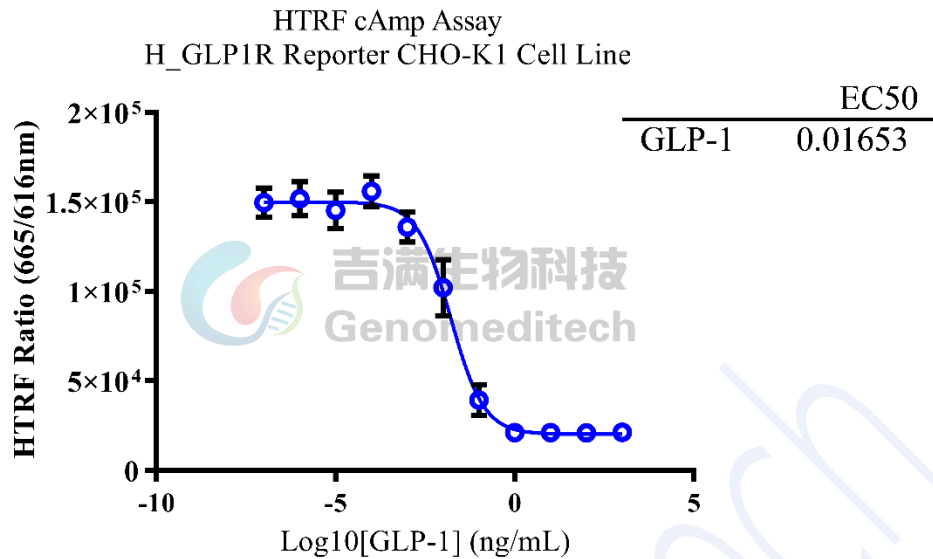


Fig 4. 将 H_GLP1R Reporter CHO-K1 细胞以 7500 cells/孔 的密度接种于 白色 384 孔微孔板 (5 μ L/孔) 中。随后添加梯度稀释的人 GLP-1 溶液, 并在室温下孵育 30 min。然后使用 HTRF cAMP Gs Dynamic Detection Kit (revvity/62AM4PEB) 按照厂商说明书进行检测, 使用 Molecular Devices i3x 多功能读板仪, 以 340 nm 激发光、在 616 nm 和 665 nm 波长下测定发射信号。信号值以 665 nm/616 nm * 100000 (HTRF Ratio) 表示, 并用于计算 EC50 值。

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 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_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line	H_CALCR Reporter CHO-K1 Cell Line
Rat_CALCR Reporter COS-7 Cell Line	
MC4R	
H_MC4R Reporter HEK-293 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。