

产品手册

H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line

H_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：V2.12.2

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	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	7
3.	细胞冻存	7
六、	使用方法	8
1.	Calcitonin salmon 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
2.	Amylin 激活实验	10
1)	加样步骤	10
2)	报告基因检测	11
3)	验证结果	11
附录 1	RT 验证结果	12
附录 2	稳定性验证结果	13
附录 3	cAMP 检测 (Calcitonin salmon)	13
附录 4	cAMP 检测 (Amylin)	14
	使用许可协议:	15

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-C26533	H_CALCRR 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-C26533	H_CALCRR 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

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% 的同一性。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, $G_{\alpha s}$ 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 H_CALCR RAMP3 (AMY3) 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。

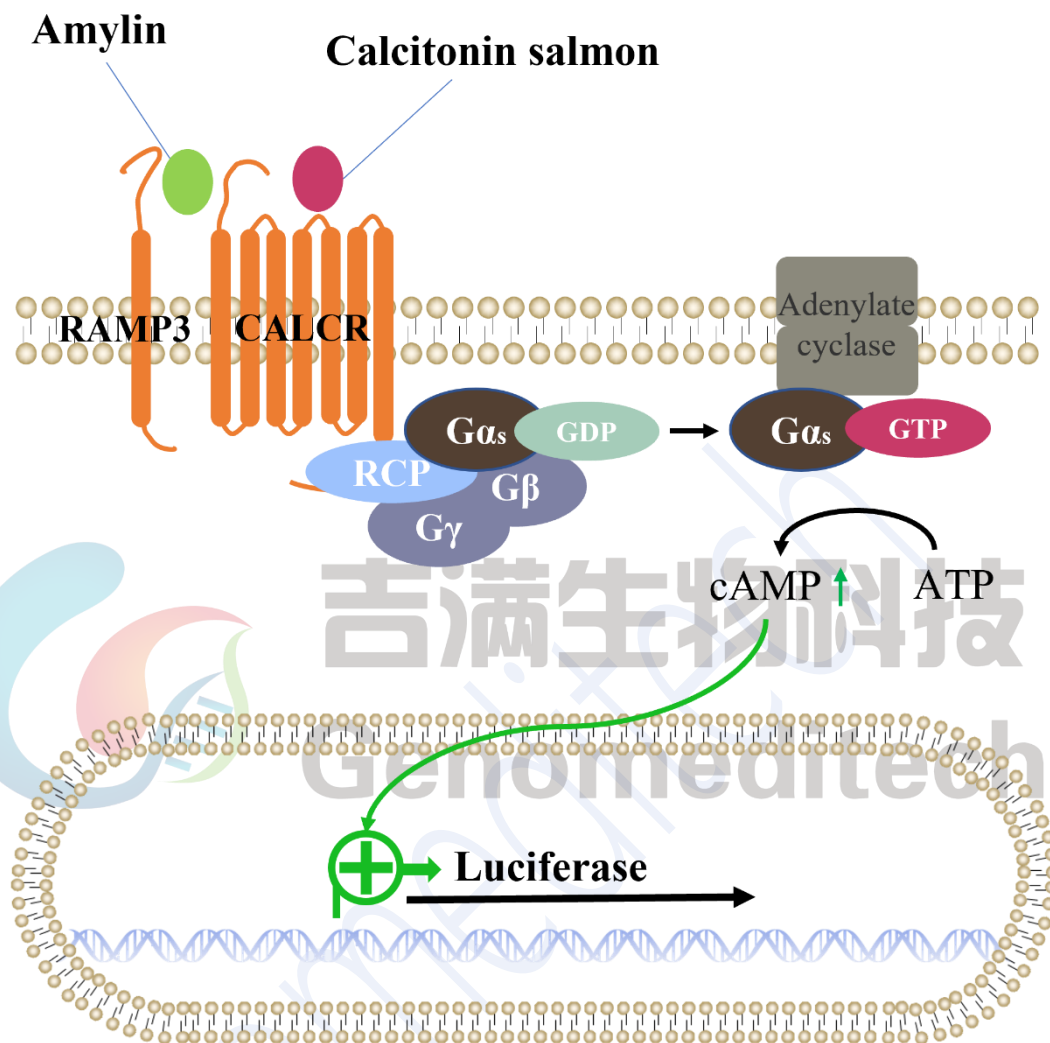


Fig.1 CALCR RAMP3(AMY3) 通路示意图

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+200 µg/mL G418+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
G418	1 g	Genomeditech/ GM-040402-1
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	96-well	Corning/3912
Microplate		
GMOOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C
Calcitonin salmon (Salmon calcitonin)	1 mg	Glpbio/GC32851
Amylin, human, amide	0.5 mg	金斯瑞/RP11278CN
Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (Low Rox Plus)	5 × 1 mL	Yeasten/11202ES08
Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix	100 T	Yeasten/11120ES60

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

注:细胞复苏后的 1 至 2 代,使用复苏培养基,待细胞状态稳定后开始细胞维持和繁殖,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。

六、 使用方法

1. Calcitonin salmon 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Calcitonin salmon 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 10 nM，10 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	
B	Calcitonin salmon	PBS	10 nM	1 nM	100 pM	10 pM	1 pM	100 fM	10 fM	1 fM	100 aM	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 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 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
Calcitonin salmon	2.917 mM	0.2917 μ M	取 2 μ L 储液+19998 μ L Assay Buffer

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 118.03 μ L 的 Assay buffer，B3-B11 加入 110 μ 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 4.19 μ L Calcitonin salmon）。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 12.22 μL 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	4.19 μL Calcitonin salmon	加入	118.03 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) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 12.22 μ 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 9 个梯度稀释孔（B10）。
- 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。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line	0 nM	10 nM	100 aM
	850175	26537419	760909

3) 验证结果

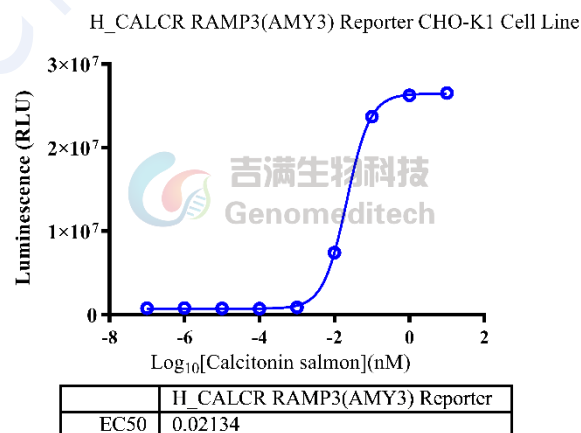


Fig. 2 激活功能验证结果

2. Amylin 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Amylin 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 25 nM，5 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	PBS	25 nM	5 nM	1 nM	200 pM	40 pM	8 pM	1.6 pM	320 fM	64 fM	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 1×10^5 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 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	100 μ M	10 μ M	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 135.5 μ L 的 Assay buffer，B3-B11 加入 110 μ 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 0.35 μ L Amylin）。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 27.5 μL 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.34 μL Amylin	加入	135.5 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) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 27.5 μ 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 9 个梯度稀释孔（B10）。
- 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。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line	0 nM	25 nM	64 fM
	620867	27014032	632849

3) 验证结果

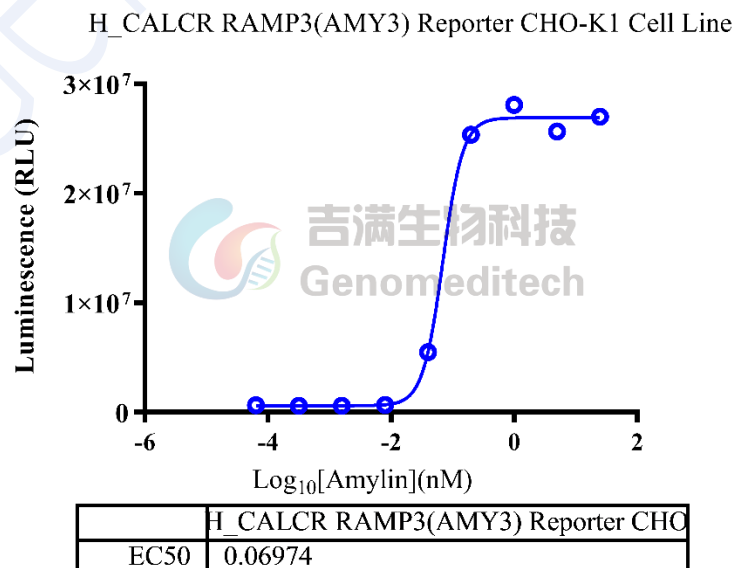


Fig. 3 激活功能验证结果

附录 1 RT 验证结果

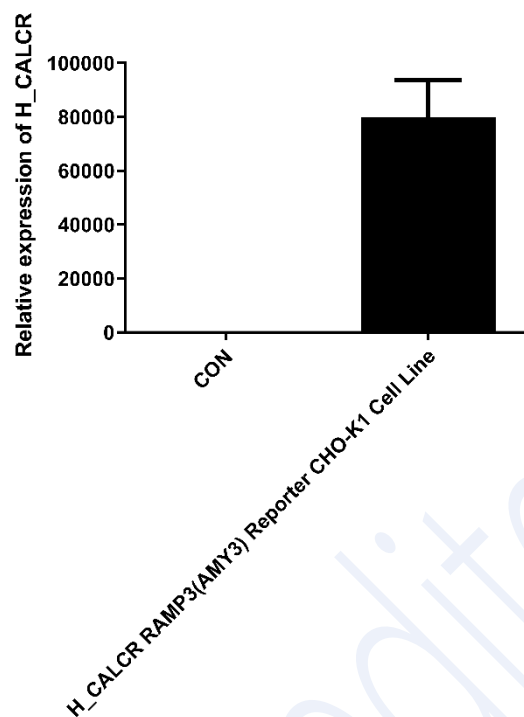


Fig. 4 H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line 使用 RT 验证 CALCR 的表达

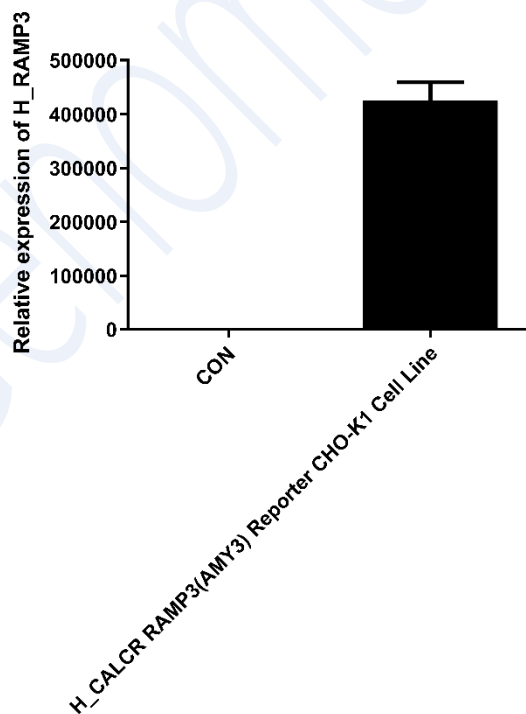


Fig. 5 H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line 使用 RT 验证 RAMP3 的表达

附录 2 稳定性验证结果

H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line

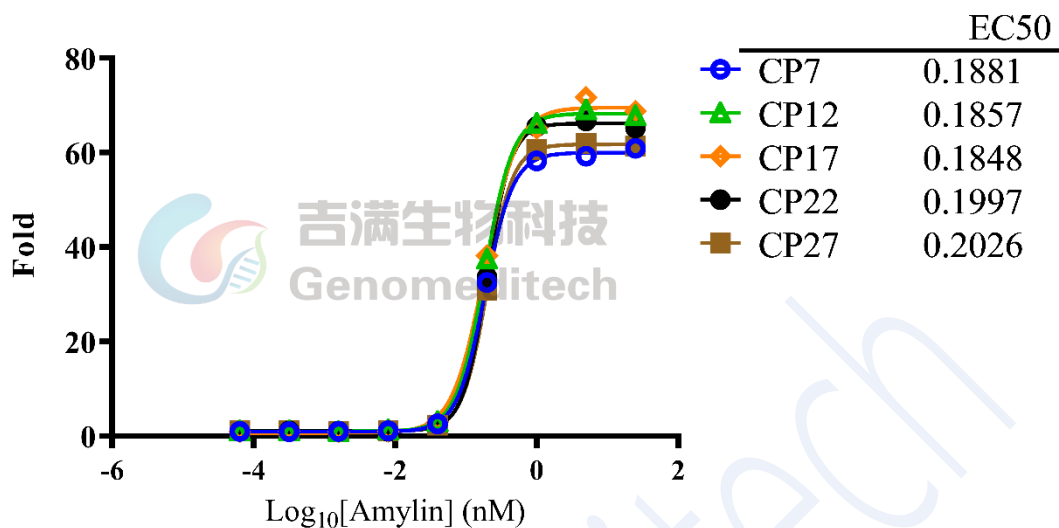


Fig. 6 稳定性验证结果

附录 3 cAMP 检测 (Calcitonin salmon)

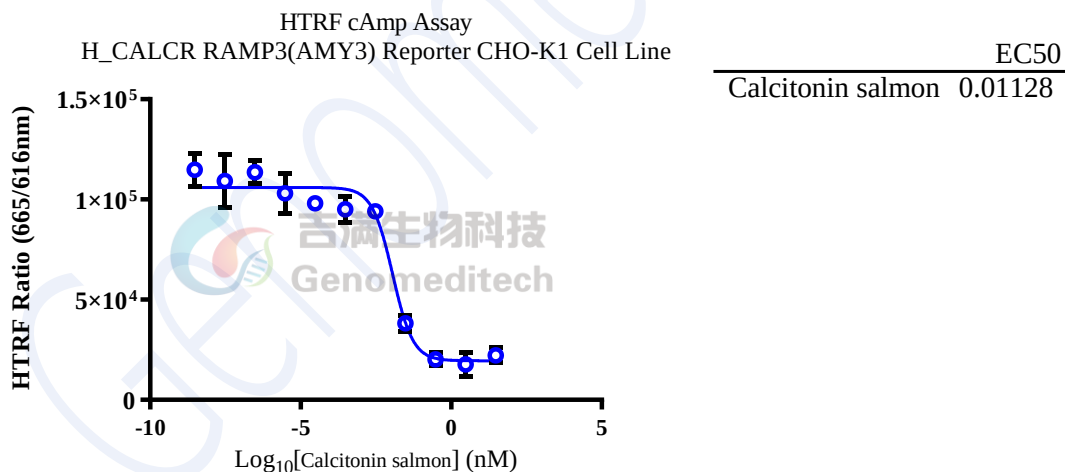


Fig. 7 将 H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 细胞以 7500 cells/孔 的密度接种于 白色 384 孔微孔板 (5 μ L/孔) 中。随后添加梯度稀释的人 Calcitonin salmon 溶液, 并在室温下孵育 30 min。然后使用 HTRF cAMP Gs Dynamic Detection Kit (revvity/62AM4PEB) 按照厂商说明书进行检测, 使用 Molecular Devices i3x 多功能读板仪, 以 340 nm 激发光、在 616 nm 和 665 nm 波长下测定发射信号。信号值以 665 nm/616 nm *100000 (HTRF Ratio) 表示, 并用于计算 EC50 值。

附录 4 cAMP 检测 (Amylin)

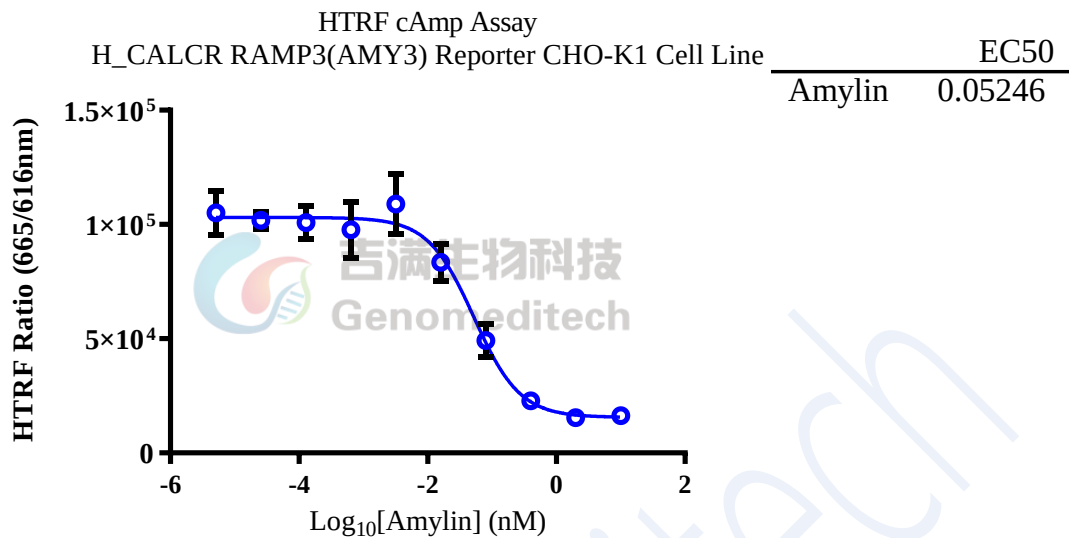


Fig. 8 将 H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 细胞以 7500 cells/孔 的密度接种于 白色 384 孔微孔板 (5 μ L/孔) 中。随后添加梯度稀释的人 Amylin 溶液, 并在室温下孵育 30 min。然后使用 HTRF cAMP Gs Dynamic Detection Kit (revvity/62AM4PEB) 按照厂商说明书进行检测, 使用 Molecular Devices i3x 多功能读板仪, 以 340 nm 激发光、在 616 nm 和 665 nm 波长下测定发射信号。信号值以 665 nm/616 nm *100000 (HTRF Ratio) 表示, 并用于计算 EC50 值。

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。