

产品手册

H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line

H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35TM 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、	传代稳定性验证结果.....	5
五、	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
六、	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
七、	使用方法（示例）.....	8
1.	Assay 验证实验.....	8
1)	加样步骤.....	8
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	9
附录 1:	cAmp 检测.....	10
使用许可协议:		11

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-C36478	H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35 TM Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C36478	H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35 TM 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

胃抑制多肽受体（GIPR）是一种在人体中由 GIPR 基因编码的蛋白质，由胃抑制多肽（GIP）激活，是一类 G 蛋白偶联受体家族的成员。胃抑制多肽受体主要存在于胰腺的 β 细胞中。胃抑制多肽激活的 GIPR 通过与异源三聚体 Gs ($\alpha\beta\gamma$) 结合，诱导腺苷酸环化酶活化，增加细胞质中的 cAMP 水平，cAMP 激活 PKA，使调节基因转录蛋白磷酸化，并导致其移位至细胞核。

吉满生物 H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35™ Cell Line 报告基因细胞系，是基于 GIPR 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当胃抑制多肽与其受体 GIPR 结合时，使调节基因转录蛋白磷酸化从而激活荧光素酶（Luciferase）的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 GIPR 相关药物的体外效果评价。细胞通过多轮单克隆筛选，是具有高稳定特性同时兼具高灵敏性、高倍率性的优选单克隆。可以满足客户批量建库、放行实验等标准。

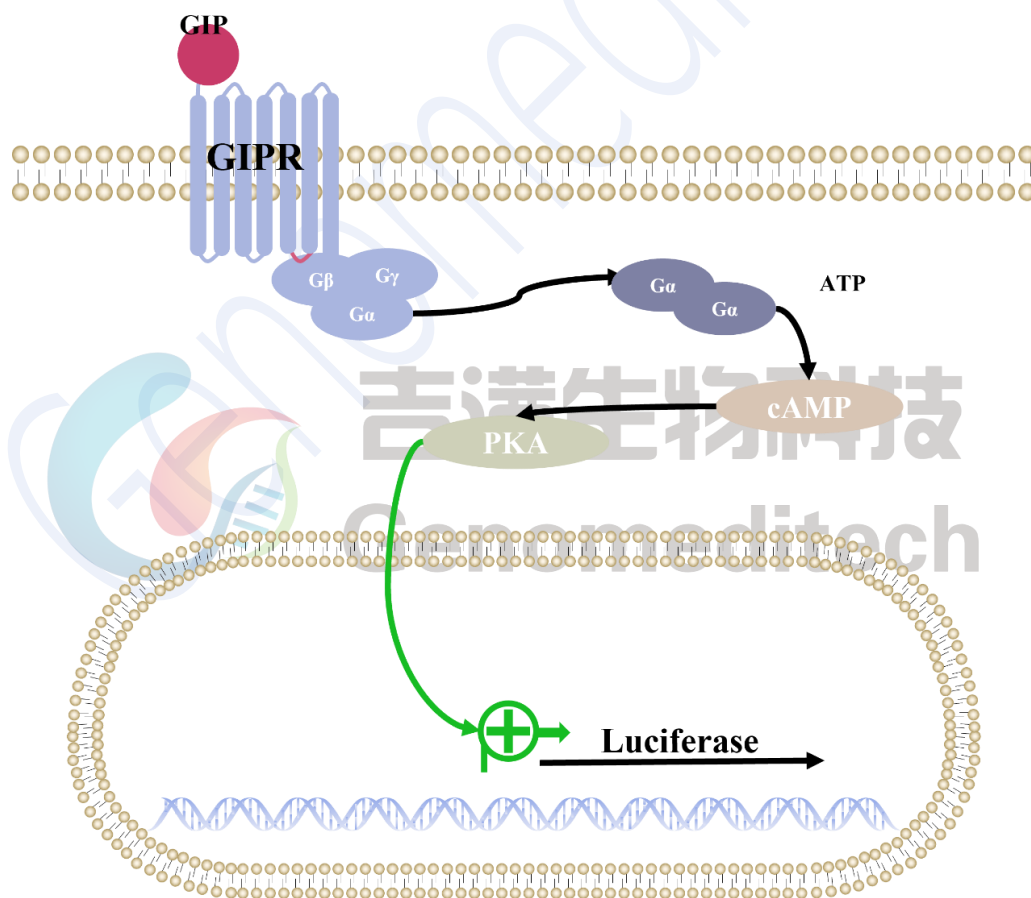


Fig 1. 信号通路图

四、 传代稳定性验证结果

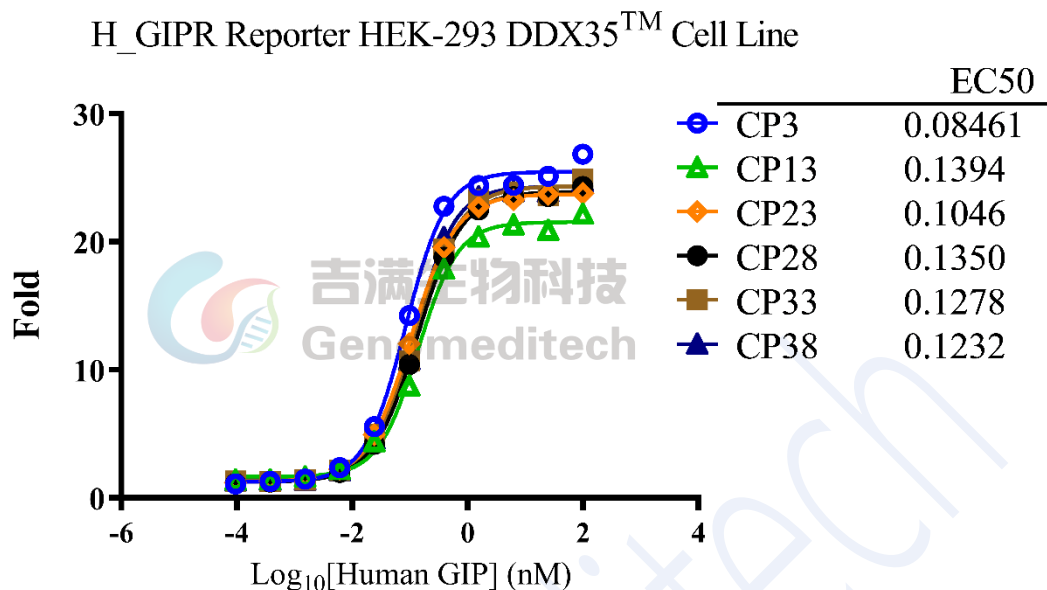


Fig 2. 制备 Human GIP (RP10795CN/金斯瑞) 梯度稀释液; 提前 16-24 h 配置 H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line (Genomeditech/# GM-C36478), 每孔细胞量 1.5×10^4 个。将过夜培养的细胞吸弃上清, 加入稀释好的 Human GIP, 孵育 16 h 后检测 Luciferase 数值, 使用 GraphPad 系统进行数据分析, 纵坐标转换为倍率。结果显示, 不同代次间倍率、EC50 数值稳定。

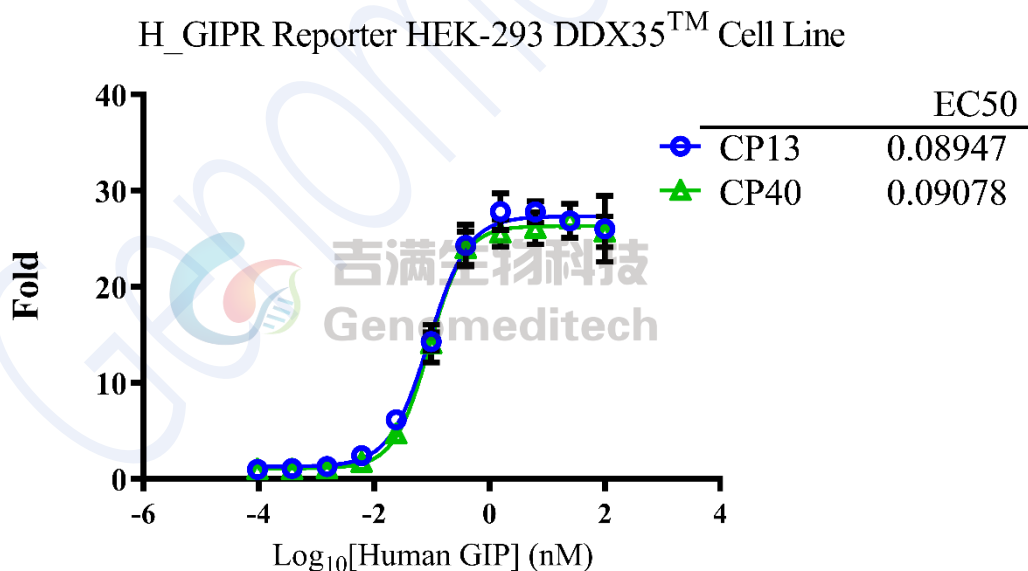


Fig 3. 制备 Human GIP (RP10795CN/金斯瑞) 梯度稀释液; 提前 16-24 h 配置 H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line (Genomeditech/# GM-C36478), 每孔细胞量 1.5×10^4 个。将过夜培养的细胞吸弃上清, 加入稀释好的 Human GIP, 3 复孔, 孵育 16 h 后检测 Luciferase 数值, 使用 GraphPad 系统进行数据分析, 纵坐标转换为倍率。结果显示, CP13 代与 CP40 代倍率、EC50 数值稳定。

五、 材料准备

1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

细胞复苏培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin+0.75 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	DMEM+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
DMEM	500 mL	gibco/C11995500BT
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
Gastric Inhibitory Peptide (GIP), human	0.5 mg	GenScript/RP10795CN
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

注：在实际情况下，我们可能会使用同等效价或更优效价的试剂或仪器，因此如果与列出品牌货号不一致，将不再另行通知。

六、 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（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。

- 细胞为上皮细胞，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 80%，即可进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 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 30-60 s，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 30-40%）。

注意事项：

细胞刚复苏，死细胞较多，属于正常现象，经调整会有明显好转，状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定。

七、 使用方法（示例）

1. Assay 验证实验

操作步骤可根据示例调整优化，对于本次实验，推荐 H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35™ Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Gastric Inhibitory Peptide (GIP), human (4983.6 Da; 以下简称 Human GIP) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 100 nM，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.11 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	Human GIP	100 nM	25 nM	6.25 nM	1.56 nM	390.63 pM	97.66 pM	24.41 pM	6.1 pM	1.53 pM	381.47 fM	95.37 fM	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 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。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B1-B11）。
- 母液准备

药物名称	储液	母液	配置方法
Human GIP	0.5 mg/mL (100 μ M)	0.05 mg/mL (10 μ M)	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1 孔加入 145.2 μ L Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 110 μ L 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 B1 中加入 1.47 μL Human GIP），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 36.67 μL ，加入次孔											对照组
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.47 μL Human GIP	145.2 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL

- g) 从第一个稀释孔 B1 中吸取 36.67 μL ，加入到第二个稀释孔 B2，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 11 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 100 μL 上清。
- j) 加入梯度稀释好的药物，100 μL 每孔。
- k) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 16 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_GIPR Reporter HEK-293 DDX35 TM Cell Line	0 nM	100 nM	95.37 fM
	1013818	30298613	1112439

3) 验证结果

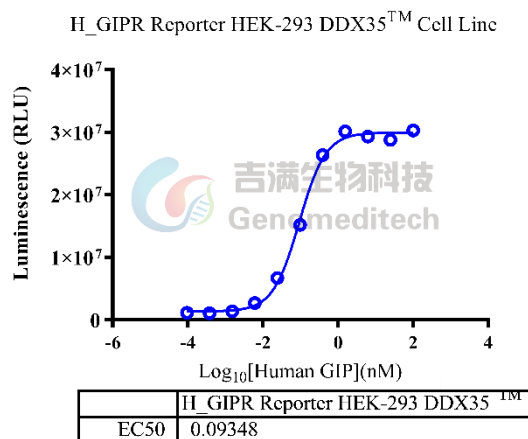


Fig 4. 验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）。

附录 1: cAmp 检测

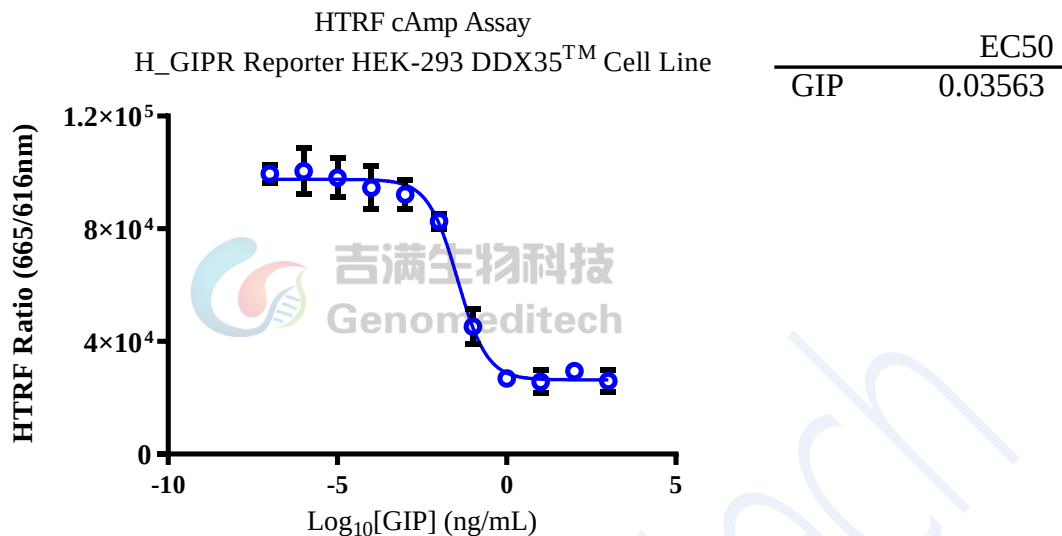


Fig 5. 将 H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35TM细胞以 7500 cells/孔的密度接种于白色 384 孔微孔板（5 μ L/孔）中。随后添加梯度稀释的人 GIP 溶液，并在室温下孵育 30 min。然后使用 HTRF cAMP Gs Dynamic Detection Kit（revvity/62AM4PEB）按照厂商说明书进行检测，使用 Molecular Devices i3x 多功能读板仪，以 340 nm 激发光、在 616 nm 和 665 nm 波长下测定发射信号。信号值以 665 nm/616 nm * 100000（HTRF Ratio）表示，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。