

## 产品手册

### H\_GLP1R GIPR GCGR Triple Reporter 293 Cell Line

### H\_GLP1R GIPR GCGR Triple Reporter 293 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.      | 激活剂验证实验 .....           | 7  |
| 1)      | 加样步骤 .....              | 7  |
| 2)      | 报告基因检测 .....            | 8  |
| 3)      | 验证结果 .....              | 9  |
| 附录 1:   | 功能验证结果 .....            | 10 |
| 附录 2:   | 流式验证结果 .....            | 10 |
| 相关产品    | .....                   | 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-C44406 | H_GLP1R GIPR GCGR Triple Reporter 293 Cell Line | 5E6 Cells/mL |

### 组成成分

| 产品编号      | 产品名称                                            | 规格           | 数量  | 储存     |
|-----------|-------------------------------------------------|--------------|-----|--------|
| GM-C44406 | H_GLP1R GIPR GCGR Triple Reporter 293 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

GIPR（胃抑制多肽受体）属于 B 类 G 蛋白偶联受体（GPCR），由 GIP 激活，主要分布于胰腺  $\beta$  细胞。其激活后通过  $G_s$  蛋白启动经典的 cAMP-PKA 信号通路，进而调节基因转录与细胞功能。GCGR（胰高血糖素受体）亦属于 B 类 GPCR，由胰高血糖素激活，主要在肝脏和肾脏表达。激活后同样通过  $G_s$  蛋白介导 cAMP-PKA 信号通路，促进肝糖原分解等生理效应。GLP-1R（胰高血糖素样肽-1 受体）是 B 类 GPCR 成员，在胰腺细胞与大脑神经元中表达。被配体激活后，它能偶联多种 G 蛋白（如  $G_{\alpha s}$ ），并通过 cAMP-PKA 通路促进胰岛素合成与释放，同时还参与食欲调控。因其关键作用，GLP-1R 已成为糖尿病药物研发的重要靶点。传统单靶点疗法（如胰岛素、GLP-1 单激动剂）虽具有一定治疗效果，但仍难以系统纠正代谢网络的整体失调。近年来，以 GLP-1R、GCGR 及 GIPR 为靶点的双靶点与三靶点药物快速发展，凭借其在“协同增效、减轻副作用”方面的显著优势，已成为该领域药物研发的重要趋势。

吉满生物 H\_GLP1R GIPR GCGR Triple Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系，是基于三受体信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当配体如 Retatrutide 与三受体结合时，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，因此可用于三受体相关药物的体外效果评价。

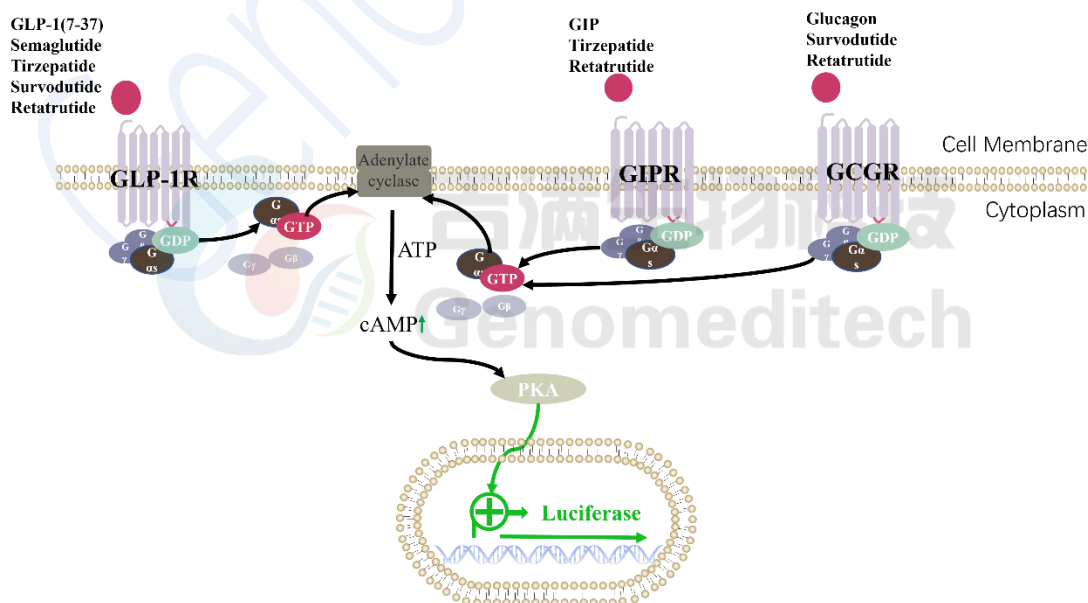


Fig 1. Signal pathway diagram

## 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:      | DMEM+10% FBS+1% P.S                                                                              |
| 细胞生长培养基:      | DMEM+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin+400 µg/mL G418+125 µg/mL Hygromycin+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   |
| G418                                              | 1 g           | Genomeditech/GM-040402-1   |
| Hygromycin                                        | 1 g           | Genomeditech/GM-040403-1   |
| Pen/Strep                                         | 100 mL        | Thermo/15140-122           |
| Fetal Bovine Serum                                | 500 mL        | ExCell/FSP500              |
| DMEM                                              | 500 mL        | Gibco/C11995500BT          |
| 96-well U-bottom Plate                            | 96-well       | Saining/1014010            |
| 96 well round cell culture plate                  | 96-well       | PakGent/CL-PT096           |
| 96-well White Opaque Plate                        | 96-well       | Thermo/236108              |
| Retatrutide                                       | /             | Targetmol/T76279           |
| Glucagon (1-29)                                   | /             | MCE/HY-P0082               |
| GIP(Human)                                        | /             | Genscript/RP10795          |
| Tirzepatide                                       | /             | aladdin/T412109            |
| Semaglutide                                       | /             | aladdin/S774153            |
| Survodutide                                       | /             | MCE/HY-P4146               |
| Anti-GLP1R hIgG1 Antibody(mAb-36986)              | /             | Genomeditech/GM-51168AB    |
| Anti-H_GIPR hIgG1 Antibody(AMG-133)               | /             | Genomeditech/GM-84915AB    |
| Anti-H_GCGR hIgG2 Antibody(volagidemab)           | /             | Genomeditech/GM-84555AB    |
| 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， $176 \times g$ ，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  $5 \times 10^6$  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。

- 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。

## 六、 使用方法（示例）

### 1. 激活剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_GLP1R GIPR GCGR Triple Reporter 293 Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 Retatrutide 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 10 nM，8 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  $\mu$ 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 | Retatrutide | PBS | 10.00<br>nM | 1.25<br>nM | 156.25<br>pM | 19.53<br>pM | 2.44<br>pM | 305.18<br>fM | 38.15<br>fM | 4.77<br>fM | 596.05<br>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  $1.5 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加 100  $\mu$ L 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 100  $\mu$ L PBS。盖上班盖，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                                                     |
|-------------|------|-----------|----------------------------------------------------------|
| Retatrutide | 1 mM | 1 $\mu$ M | 使用 2 $\mu$ L 储液+18 $\mu$ L Assay Buffer，然后同样的方法再连续稀释 2 次 |

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 137.1  $\mu$ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 120  $\mu$ 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 B2 中加入 1.39  $\mu\text{L}$  Retatrutide），混匀。

| 母液吸取 |                        | 梯度稀释孔，依次从前孔吸取 17.14 μL，加入次孔 |                                                                                    |        |        |        |        |        |        |        |        | 对照孔    |    |
|------|------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|
|      |                        | 1                           | 2                                                                                  | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11     | 12 |
| A    |                        |                             |  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |    |
| B    | 加入 1.39 μL Retatrutide | 加入                          | 137.1 μL                                                                           | 120 μL | 120 μL | 120 μL | 120 μL | 120 μL | 120 μL | 120 μL | 120 μL | 120 μL |    |
| C    |                        |                             |                                                                                    |        |        |        |        |        |        |        |        |        |    |
| D    |                        |                             |                                                                                    |        |        |        |        |        |        |        |        |        |    |
| E    |                        |                             |                                                                                    |        |        |        |        |        |        |        |        |        |    |
| F    |                        |                             |                                                                                    |        |        |        |        |        |        |        |        |        |    |
| G    |                        |                             |                                                                                    |        |        |        |        |        |        |        |        |        |    |
| H    |                        |                             |                                                                                    |        |        |        |        |        |        |        |        |        |    |

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 17.14  $\mu\text{L}$ ，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，每孔吸弃 100  $\mu\text{L}$  培养基。
- j) 加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100  $\mu\text{L}$ 。
- k) 盖上班盖，于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  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_GIPR Reporter HEK-293 Cell<br>Line | 0 nM | 10 nM  | 596.05 aM |
|                                      | 3295 | 253379 | 4037      |

### 3) 验证结果

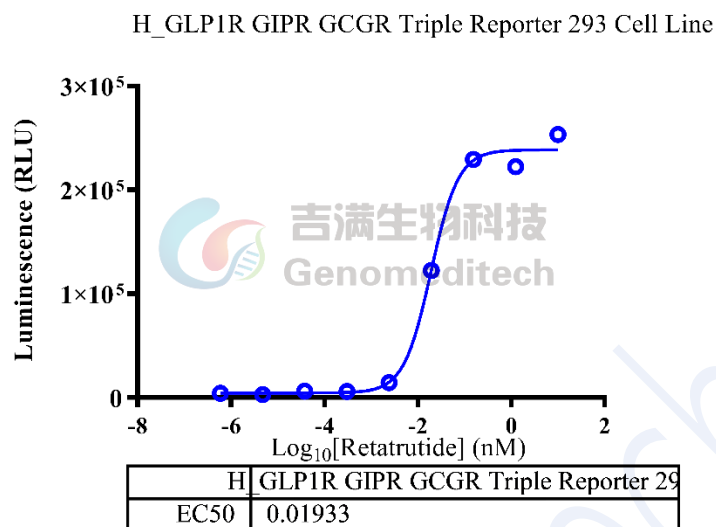


Fig 2. Response to Retatrutide. The H\_GLP1R GIPR GCGR Triple Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C44406) at a concentration of 1.5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Retatrutide (targetmol/T76279) in assay buffer (DMEM + 1% FBS + 1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [76.9]. Data are shown by drug molar concentration.

## 附录 1：功能验证结果

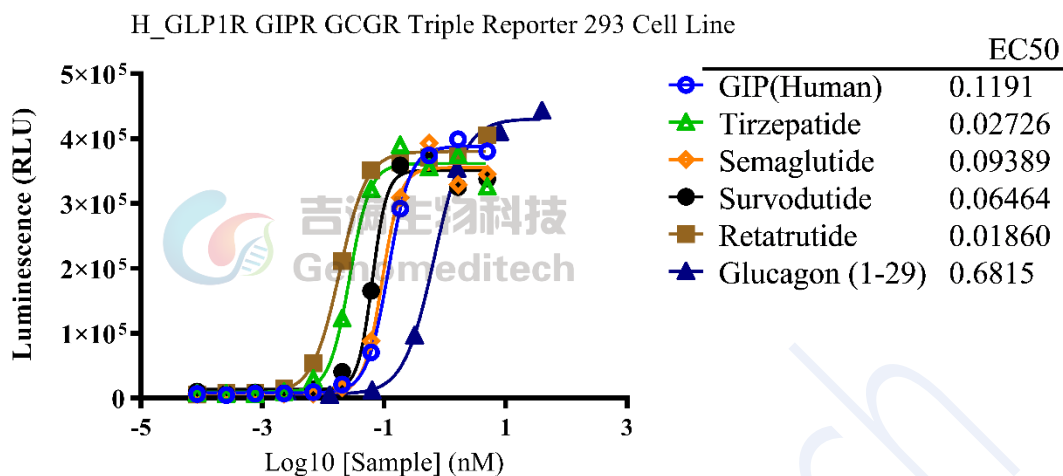


Fig 4. Response to Glucagon (1-29), GIP, Tirzepatide, Semaglutide, Survodutide, Retatrutide. The H\_GLP1R GIPR GCGR Triple Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C44406) at a concentration of 1.5E4 cells/well (96-well format) were stimulated with serial dilutions of Glucagon (1-29), GIP, Tirzepatide, Semaglutide, Survodutide, Retatrutide in assay buffer (DMEM + 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 [63.3],[56.5],[48.8],[51.3],[50.3] and [60.3]. Data are shown by drug molar concentration.

## 附录 2：流式验证结果

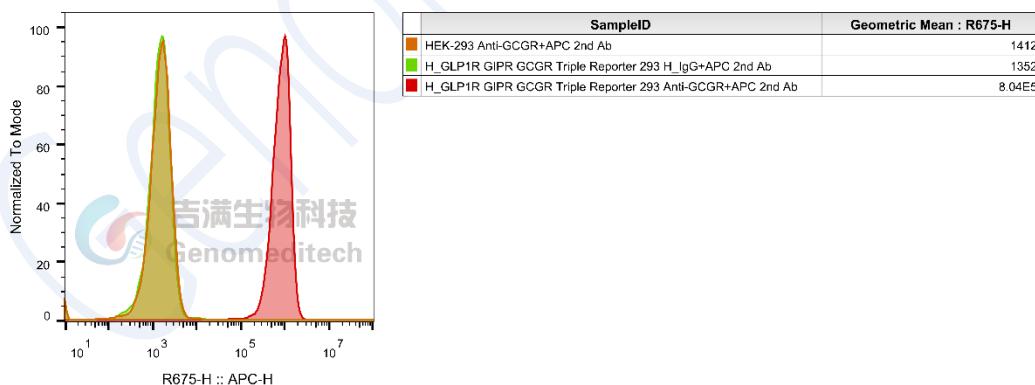


Fig 3. H\_GLP1R GIPR GCGR Triple Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C44406) Was determined by flow cytometry using Anti-H\_GCGR hIgG2 Antibody(volagidemab) (Cat. GM-84555AB).

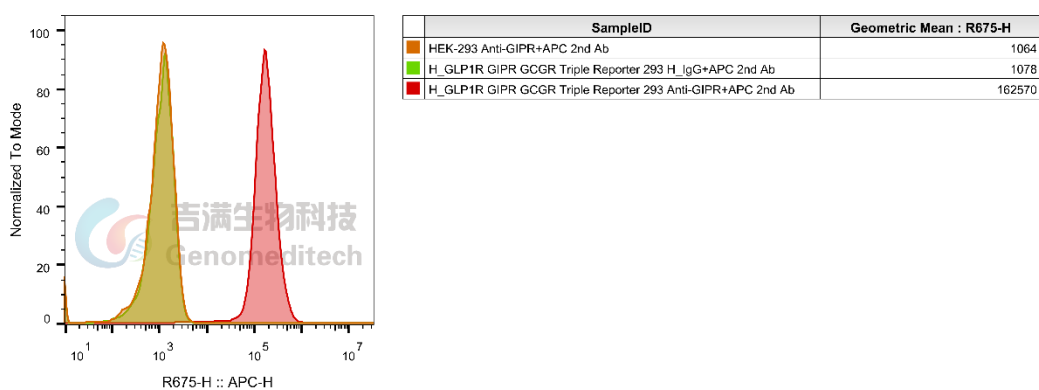


Fig 4. H\_GLP1R GIPR GCGR Triple Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C44406) Was determined by flow cytometry using Anti-H\_GIPR hIgG1 Antibody(AMG-133) (Cat. GM-84915AB).

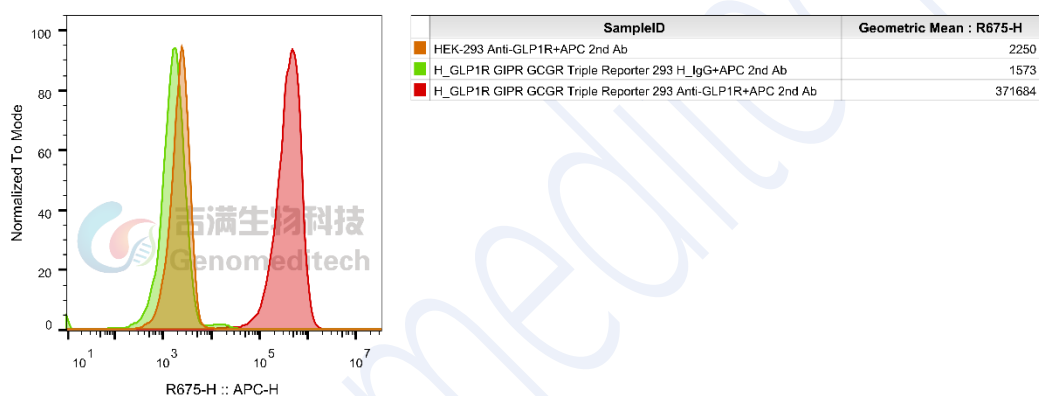


Fig 5. H\_GLP1R GIPR GCGR Triple Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C44406) was determined by flow cytometry using Anti-GLP1R hIgG1 Antibody(mAb-36986) (Cat. GM-51168AB).

## 相关产品

| GCGR                                       |                                         |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------|
| H_GCGR Reporter CHO-K1 Cell Line           | H_GCGR Reporter 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 | Tango-H_GLP1R CHO-K1 Cell Line          |
| Cynomolgus_GLP1R HEK-293 Cell Line         | H_GLP1R CHO-K1 Cell Line                |
| H_GLP1R HEK-293 Cell Line                  | Mouse_GLP1R HEK-293 Cell Line           |
| Anti-GLP1R hIgG1 Antibody(mAb-36986)       | Anti-H_GLP1R hIgG1 Antibody(glutazumab) |
| FGF21:FGFR                                 |                                         |
| H_FGF21 Reporter HEK-293 Cell Line         |                                         |

| 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 DDX35TM Cell Line         |
| Cynomolgus_GIPR HEK-293 Cell Line              | H_GIPR CHO-K1 Cell Line                           |
| H_GIPR HEK-293 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                      |
| 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 B Protein; His Tag                  |
| Human ACVR2A Protein; hFc Tag                  | Human ACVR2A Protein; His Tag                     |
| Human ACVR2B Protein; hFc Tag                  | Human ACVR2B Protein; His Tag                     |
| Human latent GDF-8 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                 |

## 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。