

产品手册

Tango-H_OX2R CHO-K1 Cell Line

Tango-H_OX2R 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：V2.12.1

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	7
1.	激动剂验证实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	8
附录：	流式验证结果	9
使用许可协议：		9

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-C47780	Tango-H_OX2R 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-C47780	Tango-H_OX2R 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

OX2R (Orexin Receptor Type 2, 食欲素受体 2 型) 是一种 G 蛋白偶联受体 (GPCR), 主要表达于下丘脑、脑干及大脑皮层等中枢神经系统区域。OX2R 受体参与多种生理和病理过程, 包括睡眠-觉醒周期的调控、能量代谢、和情绪调节。它能识别并与内源性神经肽配体——食欲素 A (Orexin A) 和食欲素 B (Orexin B) 高亲和力结合, 同时也与多种合成小分子配体相互作用。OX2R 与睡眠障碍密切相关, 如发作性睡病 (Narcolepsy), 因其功能缺失或抗体阻断可导致异常的快速眼动睡眠和日间过度嗜睡。此外, 该受体还参与抑郁、焦虑等精神类疾病的病理进程, 因此在神经精神疾病药物开发中具有重要的医学价值。

吉满生物的 Tango-H_OX2R CHO-K1 Cell Line 细胞系以 CHO-K1 为工具细胞, 采用慢病毒感染的方式, 依靠 Tango 技术构建 Tango OX2R 报告基因的细胞系, 当配体激活 OX2R β -arrestin2 通路时, β -arrestin2 携带蛋白酶切下转录激活元件, 转录激活元件移位到细胞核中, 激活荧光素酶报告基因; 使用阻断型的抗体可以阻断这一信号的传导。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果。因此可用于靶向 OX2R 功能性抗体的活性检测

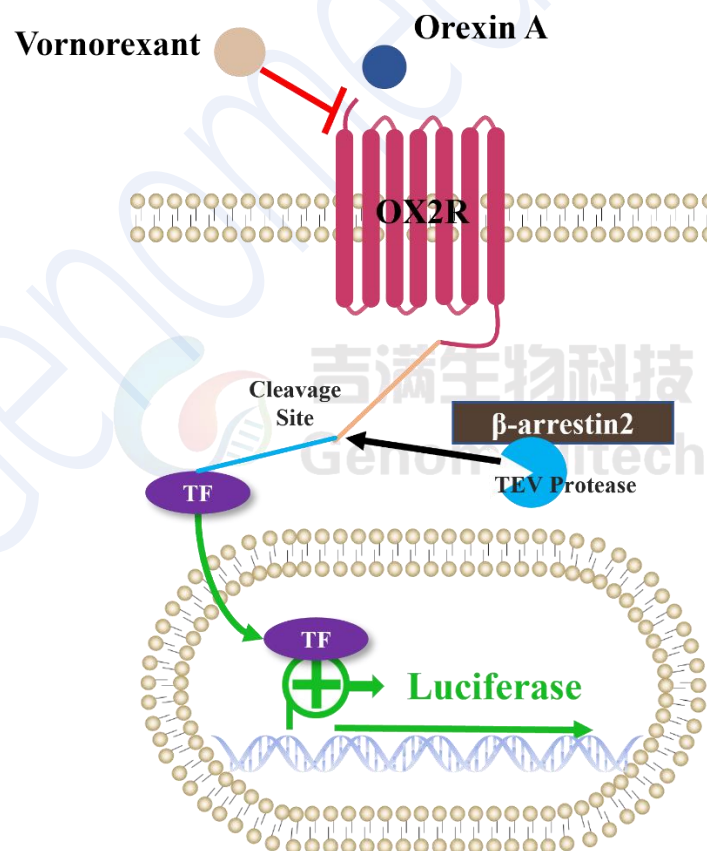


Fig 1. 原理示意图

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+100 µg/mL Hygromycin+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
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
96 well round cell culture plate	96-well	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	96-well	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	96-well	Saining/1014010
Orexin A	1 mg	MCE/HY-106224
Human Orexin R2/HCRTR2 Antibody	/	R&D/MAB5246
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech GM-040513

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（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

1. 激动剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 Tango-H_OX2R CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Orexin A（分子量 3561 Da）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 $1 \mu\text{M}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.10 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	Orexin A	PBS	1.00 μM	250.00 nM	62.50 nM	15.63 nM	3.91 nM	976.56 pM	244.14 pM	61.04 pM	15.26 pM	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，使用适量的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 $100 \mu\text{L}$ 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 1 个无菌 96 孔 U 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
Orexin A	1 mM	$10 \mu\text{M}$	取 $2 \mu\text{L}$ 储液+ $198 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 $160 \mu\text{L}$ Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 $120 \mu\text{L}$ 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 $17.78 \mu\text{L}$ Orexin A），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 40 μL, 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	17.78 μL Orexin A	加 入	160 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 40 μ 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 准备过夜的细胞孔板取出, 吸弃上清 100 μ L。
- j) 加入步骤 h 准备好的梯度稀释液, 每孔 100 μ L。
- k) 盖盖板盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 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。

Tango-H_OX2R CHO-K1 Cell Line + Orexin A	0 μ M	1 μ M	15.26 pM
	554358	2917465	691060

3) 验证结果

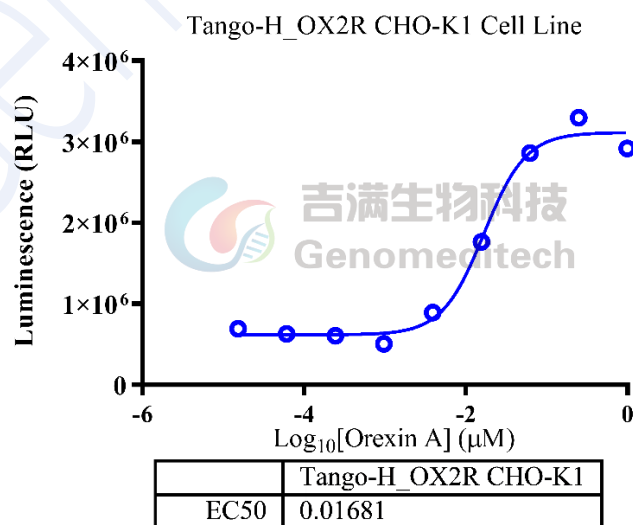


Fig 2. Response to Orexin A. Tango-H_OX2R CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C47780) was seeded at a density of 1E4 cells per well in a 96-well plate and incubated overnight. The next day, serial dilutions of the Orexin A(MCE/HY-106224) were added to the pre-seeded cells. The mixture was incubated for an additional 16 hours.

The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [5.3]. Data are shown by drug molar concentration.

附录：流式验证结果

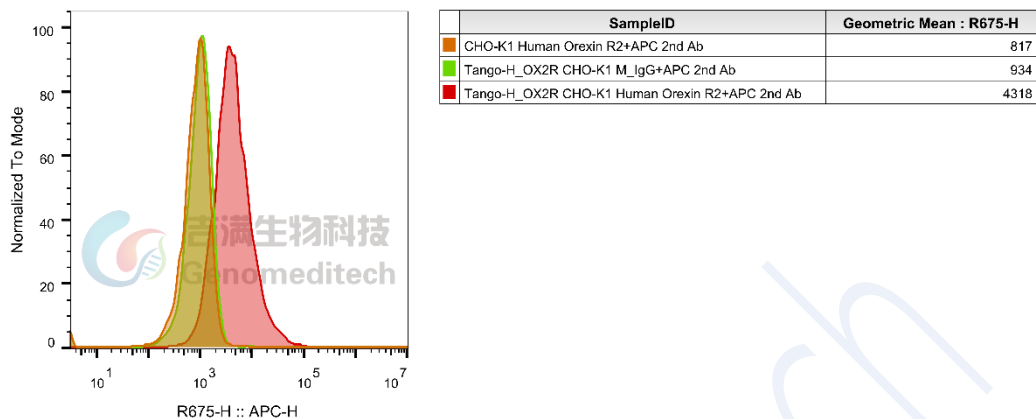


Fig 5. Tango-H_OX2R CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C47780) was determined by flow cytometry using Human Orexin R2/HCRTR2 Antibody (R&D/MAB5246).

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。