

产品手册

H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line

H_TACR3(NK3R) 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：V2.12.4

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.	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:	功能验证结果（block）	10
附录 3:	RT 验证结果	11
附录 4	稳定性验证.....	11
相关产品		12
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-C39224	H_TACR3(NK3R) 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-C39224	H_TACR3(NK3R) 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

TACR3 (Tachykinin Receptor 3), 也称为神经激肽-3受体 (Neurokinin 3 Receptor, NK3R), 属于G蛋白偶联受体 (GPCR) 家族, 广泛分布于中枢神经系统和外周组织。TACR3的激活能够影响神经调节、内分泌调控、生殖功能等多种生理过程。研究表明, TACR3与性腺轴调节、疼痛传导、心血管系统及多种神经精神疾病相关联。因其重要的生理功能和疾病关联性, TACR3成为治疗某些内分泌失调、神经性疾病等新型靶点之一。

吉满生物的H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line是一种Luciferase报告基因细胞系, 当Neurokinin A或Substance P结合TACR3(NK3R)时, TACR3(NK3R)与胞内G蛋白偶联, 导致Ca²⁺释放, 从而激活荧光素酶报告基因, Luciferase报告基因读值即代表信号通路的激活效果, 因此可用于靶向TACR3(NK3R) 相关药物的活性检测。

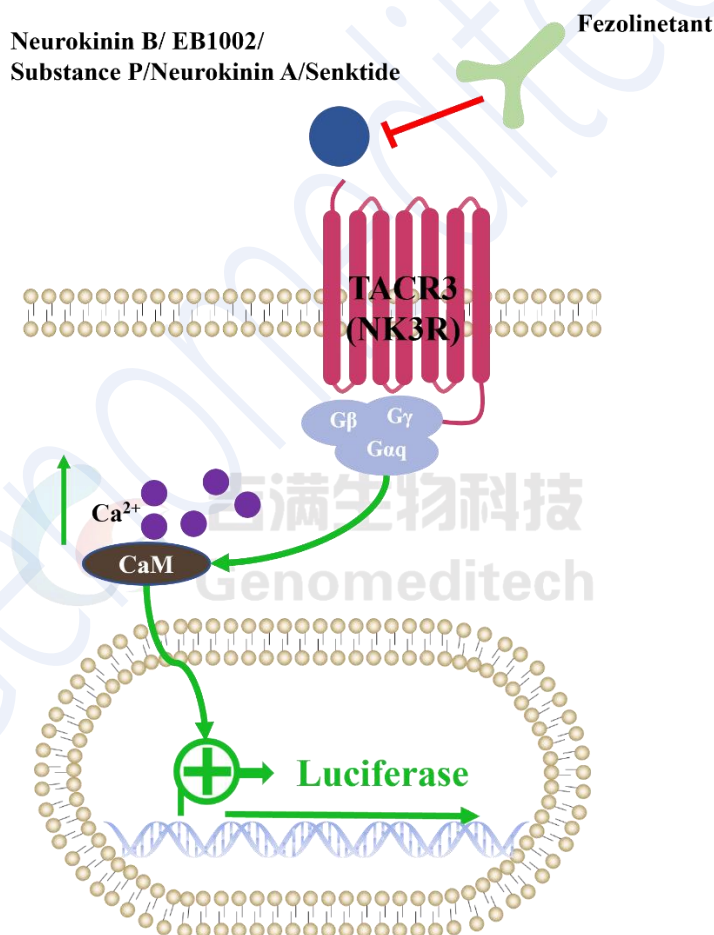


Fig 1. 作用原理

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+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.
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
DMEM	500 mL	gibco/C11995500BT
96 Well round Well culture plate	96-Well	NEST/701001
96 孔 U 底细胞培养板	96-well	角端/1014010
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
Neurokinin A	1 mg	MCE/HY-P0197
Substance P	1 mg	MCE/HY-P0201
EB1002	1 mg	MCE/HY-P10746
Neurokinin B	/	aladdin/N118980
Senktide	1 mg	MCE/HY-P0187
Fezolinetant	/	MCE/HY-19632
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

注：为确保最高存活率，应在收到冻存细胞后立即解冻并复苏培养。如果在收到细胞后需要继续储存，将其置于液氮罐中，严禁储存在 -70°C ，因为在 -70°C 下储存会导致活性丧失。

- 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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，当细胞密度达到 80%，需要进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 天传代。注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

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。
- 注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- FBS 血清需 56 $^{\circ}\text{C}$ 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. 验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。本次实验分别使用 Neurokinin A、Substance P 作为阳性药物；Neurokinin A 的 Conc.01 终浓度为 $1 \mu\text{M}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10；Substance P 的 Conc.01 终浓度为 $1 \mu\text{M}$ ，2 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 C2-C10，B11、C11 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	Neurokinin A	PBS	1 μM	250 nM	62.5 nM	15.63 nM	3.91 nM	976.56 pM	244.14 pM	61.04 pM	15.26 pM	0	PBS
C	Substance P	PBS	1 μM	500 nM	250 nM	125 nM	62.5 nM	31.25 nM	15.63 nM	7.81 nM	3.91 nM	0	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 16-24 h，离心收集 H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line，以完全培养基重悬细胞，计算细胞密度及活力，通过补加完全培养基的方式，调整细胞浓度到 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。盖上班盖，于孵箱中孵育过夜。
- 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 B2-B10、C2-C10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Neurokinin A	1 mM	/	直接使用储液
Substance P	1 mM	/	直接使用储液

- e) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 加入 160 μL Assay Buffer、C2 孔加入 240 μL Assay Buffer，B3-B11、C2-C11 孔分别加入 120 μL 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 0.16 μL Neurokinin A、C2 中加入 0.24 μL Substance P），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，Neurokinin A 依次从前孔吸取 40 μL，加入次孔； Substance P 依次从前孔吸取 120 μL，加入次孔。										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.16 μL Neurokinin A	加入	160 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	
C	0.24 μL Substance P	加入	240 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 40 μL 、C2 中吸取 120 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3、C3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10、C10）。
- i) 取出步骤 a 孵育过夜的细胞孔板，吸弃上清。
- j) 分别加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100 μL 。
- k) 盖上盖板，继续孵育 6 h。
- l) 使用报告基因检测试剂盒，收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line + Neurokinin A	0 μM	1 μM	15.26 pM
	25478	290699	26687
H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line + Substance P	0 μM	1 μM	3.91 nM
	30531	315974	30102

3) 验证结果

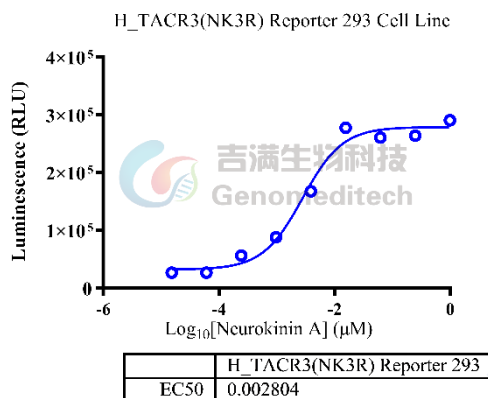


Fig 2. Response to Neurokinin A. The H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C39224) at a concentration of 1.5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Neurokinin A (MCE/HY-P0197) in assay buffer (DMEM+1% FBS+1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [11.4]. Data are shown by drug molar concentration.

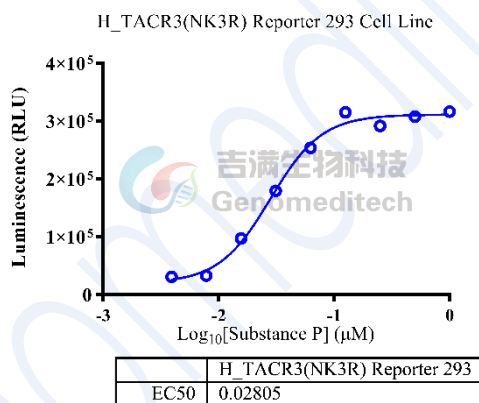


Fig 3. Response to Substance P. The H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C39224) at a concentration of 1.5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Substance P (MCE/HY-P0201) in assay buffer (DMEM+1% FBS+1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [10.3]. Data are shown by drug molar concentration.

附录 1：功能验证结果

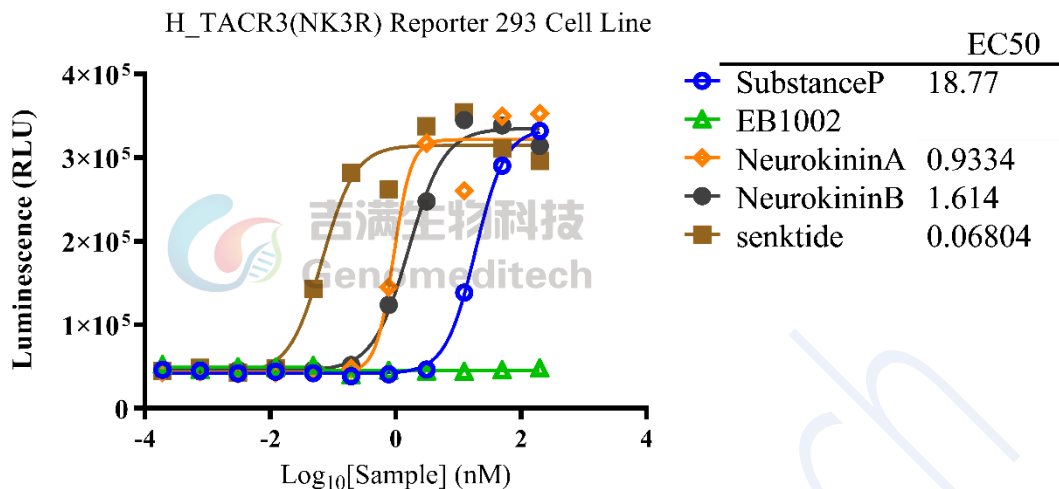


Fig 4. Response to Substance P, EB1002, Neurokinin A, Neurokinin B, Senktide. The H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C39224) at a concentration of 1.5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of NeurokininA(MCE/HY-P0197), SubstanceP(MCE/HY-P0201), EB1002(MCE/HY-P10746), Neurokinin B(aladdin/N118980) and Senktide(MCE/HY-P0187) 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 [7.6],[7.2],[1.0],[6.8],[6.4]. Data are shown by drug molar concentration.

附录 2：功能验证结果 (block)

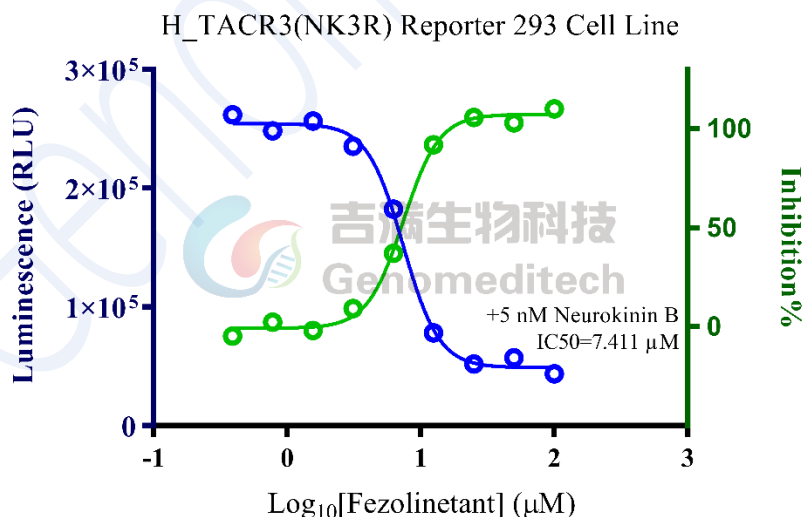


Fig 5. Inhibition of Neurokinin B-induced reporter activity by Fezolinetant. Serial dilutions of the Fezolinetant (MCE/HY-19632) was incubated with 1.5E4 cells/well of the HH_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C39224) in a 96-well plate for 1 hour in assay buffer (DMEM +1% FBS+1% P.S). Subsequently, the Neurokinin B(aladdin/N118980) was added to each well to a final concentration of 5 nM, and the coculture proceeded for an additional 6 hours. Firefly luciferase activity is then measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech)(left Y-axis, relative luminescence units), with inhibition percentages shown on the right Y-axis.

附录 3：RT 验证结果

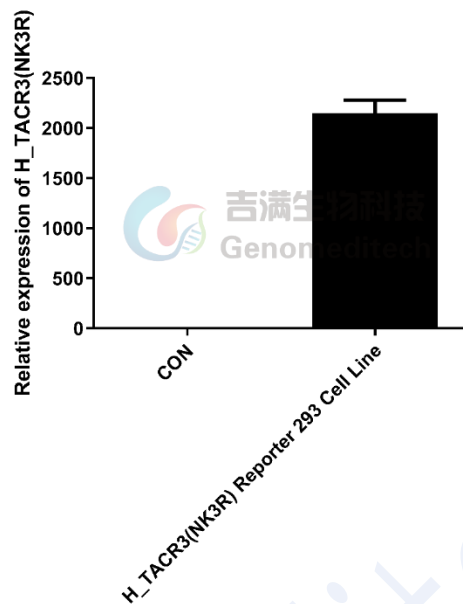


Fig 6. The mRNA expression levels of H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C39224) were determined by RT-qPCR.

附录 4 稳定性验证

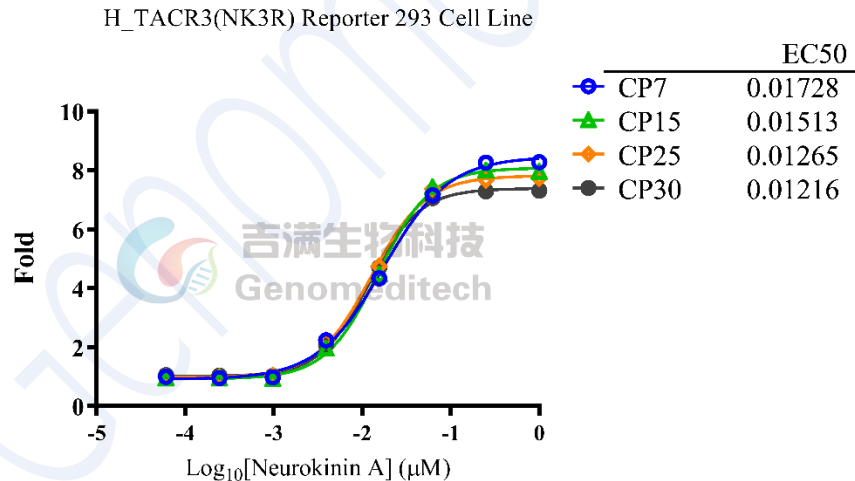


Fig 7. The passage stability of response to Neurokinin A. The passage 7, 15, 25, and 30 of H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C39224) at a concentration of 1.5E4 cells/well (96-well format) were stimulated with serial dilutions of Neurokinin A (TargetMol/TP1008) in assay buffer (DMEM + 1% FBS + 1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). Data are shown by drug molar concentration.

相关产品

TACR1& TACR2& TACR3	
H_TACR2(NK2R) Reporter 293 Cell Line	H_TACR3(NK3R) Reporter 293 Cell Line
H_TACR2(NK2R) Gs Reporter 293 Cell Line	H_TACR1(NK1R) Reporter 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。