Genomeditech (Shanghai) Co.,Ltd.
Order: 021-68455258/50432826/50432825
Toll-free: 400 627 9288
Email: service@genomeditech.com

产品手册

H_PRL(prolactin) Reporter Cell Line

H_PRL(prolactin) Reporter 细胞系

For research use only!
本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.11.1

Genomeditech

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. 配体激活实验.....7
1) 细胞准备.....7
2) 药物准备.....7
3) 加样步骤.....8
4) 报告基因检测.....8
5) 验证结果.....9
2. 抗体抑制实验.....9
1) 细胞准备.....9
2) 药物准备.....10
3) 加样步骤.....10
4) 报告基因检测.....11
5) 验证结果.....11
附录：流式验证结果.....12
相关产品.....12
使用许可协议：.....13

Genomeditech (Shanghai) Co.,Ltd.
Order: 021-68455258/50432826/50432825
Toll-free: 400 627 9288
Email: service@genomeditech.com

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-C19941	H_PRL(prolactin) Reporter Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C19941	H_PRL(prolactin) Reporter Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196℃

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

催乳素(PRL)由 199 个氨基酸残基组成的单一肽链组成，含有 3 个二硫键，其结构和生长激素（GH）有很强的同源性。催乳素由垂体前叶分泌，在渗透调节、黄体形成、乳房发生、乳酸菌发生、泌乳和生产作物乳中发挥广泛作用。在鸟类中，催乳素(PRL)被普遍认为是繁殖的开始和维持的关键。催乳素(PRL)激素的所有作用都是由其受体(PRLR)介导的，PRLR 在 PRL 信号转导级联中起着重要作用。

催乳素受体(PRLR)是人类第 5p13-14 号染色体上的 PRLR 基因编码的 I 型细胞因子受体。PRLR 是细胞因子受体超家族的一种膜结合蛋白。PRLR 还可以结合生长激素(GH)和人胎盘催乳素(hPL)并被其激活。在妊娠期和哺乳期乳腺小叶肺泡发育中起重要作用。

催乳素在乳腺中传递信号的经典方式是 Jak2-STATs 通路。当催乳素与其受体结合时，受体二聚体和 Jak2 被磷酸化活化。Jak2 介导 STATs 的磷酸化，STATs 二聚体转运到细胞核内，在那里激活靶基因。

吉满生物 H_PRL(prolactin) Reporter Cell Line 报告基因细胞系，是基于 Jak2-STATs 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当催乳素与其受体结合时，受体二聚体和 Jak2 被磷酸化活化。Jak2 进一步介导 STATs 的磷酸化，使 STATs 二聚体转运到细胞核内，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 PRLR 相关药物的体外效果评价。

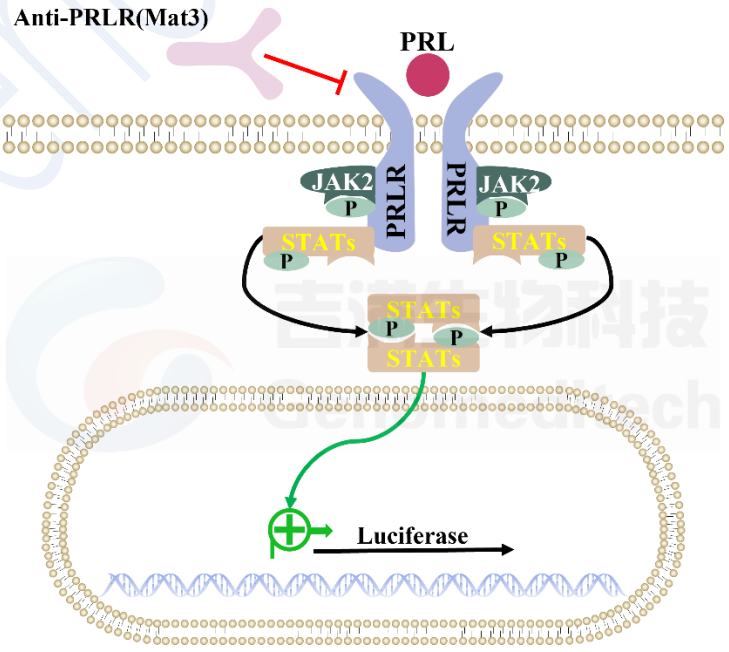


Fig 1.原理示意图

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：	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
细胞冻存培养基：	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	Cegrogen biotech/A0500-3010
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
Luciferase Assay Kit	100 tests	Genomeditech/GM-040501A
Prolactin Protein, Human, Recombinant	200 μg	SinoBiological/10275-H08B
Anti-PRLR hIgG1 Antibody(Mat3)	/	Genomeditech/GM-27198AB

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。

a) 37℃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。

b) 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37℃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）。

c) 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 × g，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。

d) 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≥ 3 × 10^6 cells/mL。

e) 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 2-3 × 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

a) 使用 176 × g，3 min 离心收集细胞。

b) 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。

c) 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中，-80℃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。

a) 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。

b) 将皿或培养瓶中的培养液弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。

c) 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。

d) 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 × g 室温离心 3 min。

注意事项：

a) **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。**

b) 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。

c) 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. 配体激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_PRL(prolactin) Reporter Cell Line 细胞量为 1.5 × 10^4 Cells/孔。使用 Human PRL（24.3 kDa）起始终浓度(Conc.01)为 1 μg/mL，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围为 100 μL 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 PRL	PBS	1 μg/mL	333 ng/mL	111 ng/mL	37.04 ng/mL	12.35 ng/mL	4.12 ng/mL	1.37 ng/mL	457.25 pg/mL	152.42 pg/mL	0	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

1) 细胞准备

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 μL 细胞/孔至中间 12 个孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜使用。

2) 药物准备

a) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。

b) 每个待测抗体，使用一行（如 B1-B12）。

c) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human PRL	1 mg/mL	0.1 mg/mL	取 2 μL 储液，加入 18 μL 的 Assay Buffer 进行稀释

d) 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 163.35 µL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 110 µL Assay Buffer。

e) 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 1.65 µL Human PRL），混匀。

	母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 55 µL，加入次孔									对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.65 µL Human PRL	加入	163.35 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													

f) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 55 µL，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。

g) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。

3) 加样步骤

a) 将步骤 1 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100 µL 培养基。

b) 加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100 µL。

c) 盖上板盖，于 37 ℃ CO_2 培养箱中培养 16 h。

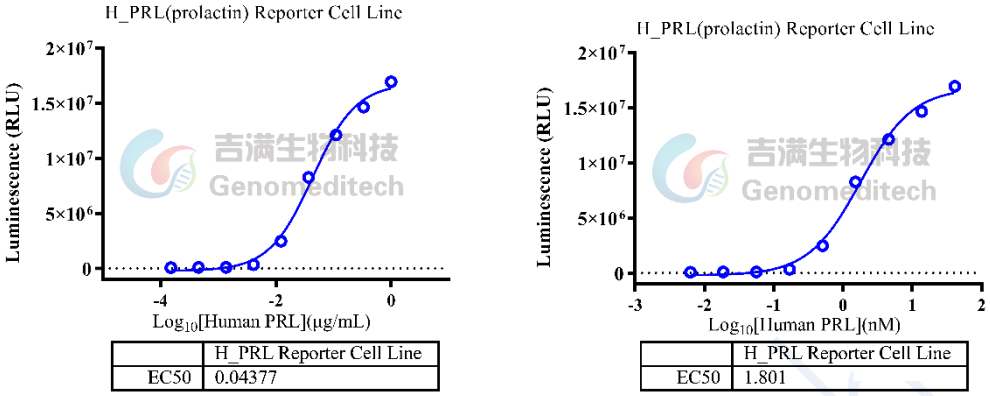
d) 使用报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

4) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_PRL(prolactin) Reporter Cell Line	0 µg/mL	1 µg/mL	152.42 pg/mL
	88461	16954016	84271

5) 验证结果



	H_PRL Reporter Cell Line
EC50	0.04377

	H_PRL Reporter Cell Line
EC50	1.801

Fig 2.Human Prolactin / PRL Protein 激活验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. 抗体抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_PRL(prolactin) Reporter Cell Line 细胞量为 1.5 × 10^4 Cells/孔。使用 Human PRL（24.3 kDa）终浓度为 0.21 μg/mL（EC80=0.21 μg/mL），Anti-PRLR（150 kDa）起始终浓度(Conc.01)为 15 μg/mL， 3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围为 100 μL 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	0.21 μg/mL Human PRL +Anti-PRLR	15 μg/mL	5 μg/mL	1.67 μg/mL	555.56 ng/mL	185.19 ng/mL	61.73 ng/mL	20.58 ng/mL	6.86 ng/mL	2.29 ng/mL	762.08 pg/mL	254.03 pg/mL	0
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

1) 细胞准备

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 μL 细胞/孔至中间 12 个孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜使用。

2) 药物准备

a) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。

b) 每个待测抗体，使用一行（如 B1-B11）。

c) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-PRLR	6 mg/mL	0.6 mg/mL	取 2 μL 储液，加入 18 μL 的 Assay Buffer 进行稀释
Human PRL	1 mg/mL	0.1 mg/mL	取 2 μL 储液，加入 18 μL 的 Assay Buffer 进行稀释

d) 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B1 孔加入 78.38 μL Assay Buffer，B2-B12 孔，加入 55 μL Assay Buffer。

	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	4.13 μL Anti-PRLR	78.38 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL
C													
D													
E													
F													
G													
H													

e) 吸取 4.13 μL 待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B1），混匀。

f) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5 μL，加入到第二个梯度稀孔 B2，充分混匀。

g) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔（B11），B12 为不加抗体的对照。

h) 将装有稀释好的药物的多孔板盖上盖板。

3) 加样步骤

a) 取出步骤 1 中装有细胞的孔板，吸弃 90 μL。

b) 将稀释好的抗体取 50 μL 加入到孔板中，孵育 1 h。

c) 孵育的同时配置 2 × 激活剂，0.42 μg/mL Human PRL（4.17 μL 0.1 mg/mL Human PRL 加入到 985.92 μL Assay Buffer 中，混匀后使用）。

d) 1 h 后，将步骤 c 配置的激活剂加入到步骤 b 孵育过的孔板中，每孔 50 μL，混匀后盖上检测盖板，于 37°C CO_2 培养箱中继续孵育 15 h。

e) 收样检测 Luciferase。

4) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_PRL(prolactin) Reporter Cell Line	0.21 μg/mL Human PRL + 0 μg/mL Anti-PRLR	0.21 μg/mL Human PRL + 15 μg/mL Anti-PRLR	0.21 μg/mL Human PRL + 254.03 pg/mL Anti-PRLR
	3018265	64363	2981740

5) 验证结果

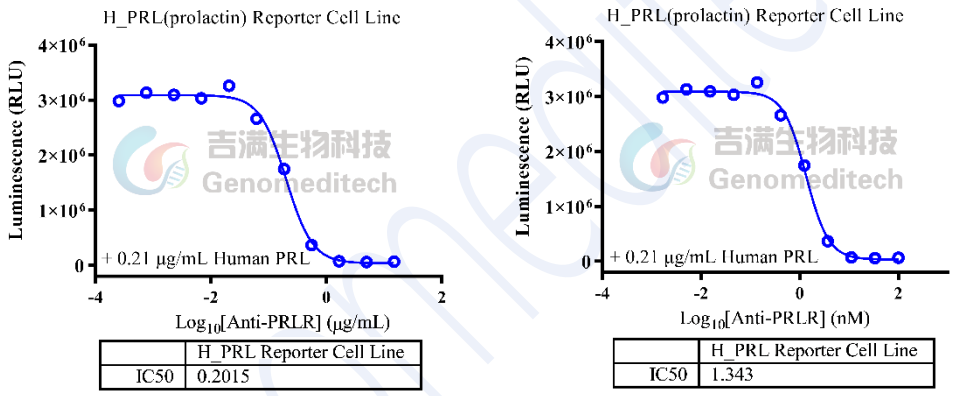
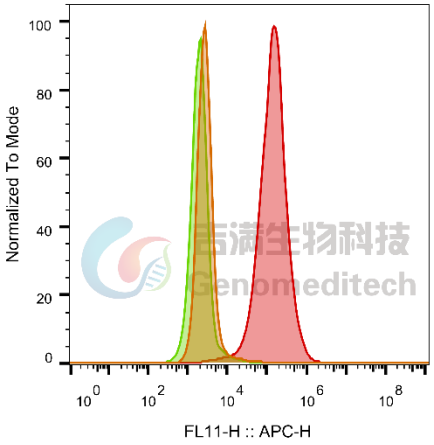


Fig 3.Anti-PRLR 抑制验证结果

（右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

附录：流式验证结果



SampleID	Geometric Mean : FL11-H
Null anti-PRLR+APC-2nd Ab	2831
H_PRL(prolactin) Reporter H_IgG+APC-2nd Ab	2024
H_PRL(prolactin) Reporter anti-PRLR+APC-2nd Ab	138057

Fig 4 .使用 Anti-PRLR hIgG1 Antibody(Mat3)（Genomeditech/GM-27198AB）抗体流式验证结果

相关产品

PRL:PRLR	
Cynomolgus_PRLR CHO-K1 Cell Line	H_PRLR CHO-K1 Cell Line
Mouse_PRLR CHO-K1 Cell Line	Mouse_PRLR HEK-293 Cell Line
Anti-PRLR hIgG1 Antibody(Mat3)	Anti-PRLR hIgG1 Reference Antibody(Mat3)

Genomeditech (Shanghai) Co.,Ltd.
Order: 021-68455258/50432826/50432825
Toll-free: 400 627 9288
Email: service@genomeditech.com

使用许可协议：

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech