

产品手册

H_APJ Reporter HEK-293 Cell Line

H_APJ Reporter HEK-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：V2.11.1

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.	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	稳定性验证结果	10
附录 2	流式验证结果	10
相关产品		11
使用许可协议：		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-C29525	H_APJ Reporter HEK-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-C29525	H_APJ Reporter HEK-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

APJ受体是一种G蛋白偶联受体（GPCR），在细胞膜上表达。它可以与多种配体结合，但最重要的内源性配体是Apelin。Apelin是由Apelin基因编码的一系列肽，这些肽可以与APJ受体结合并激活它。Apelin肽的形式多样，包括Apelin-36、Apelin-17和Apelin-13等。

当Apelin肽与APJ受体结合时，受体发生构象变化，受体与G蛋白（通常是Gai/o蛋白）结合并激活G蛋白。激活的G蛋白可以通过多种途径传递信号，包括抑制腺苷酸环化酶（降低cAMP水平）、激活磷脂酶C（PLC）及其下游的蛋白激酶C（PKC）和钙离子信号通路。APJ受体和Apelin在心血管功能、代谢调节、胚胎发育方面都起到重要的作用。

吉满生物的H_APJ Reporter HEK-293 Cell Line是一种Luciferase报告基因细胞系，配体结合APJ受体后，可以阻断由激活剂（如Forskolin）导致的cAMP通路信号的激活，随后通过测定荧光信号确定荧光素酶（LUC）的表达，间接评估APJ配体对信号通路的影响程度，从而达到判断配体结合受体的验证效果。

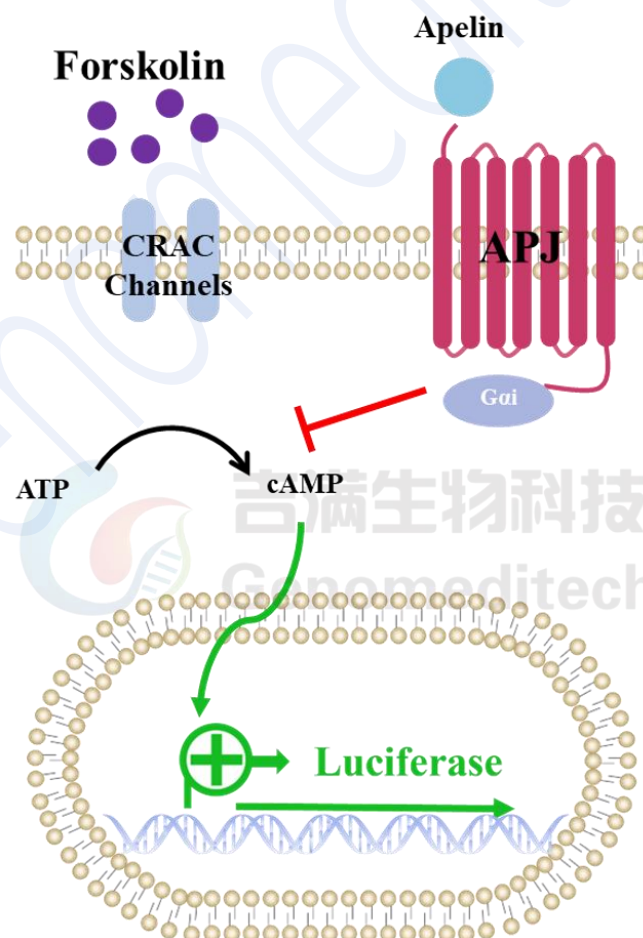


Fig 1. 作用原理

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	Cegrogen biotech/A0500-3010
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
Forskolin	10 mg	sigma/F6886
Apelin-13 TFA	1 mg	MCE/HY-P1944A
Anti-APJ mIgG2a Antibody	/	In house
GMOne-Step 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

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 $\times 10^6$ 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_APJ Reporter HEK-293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。本次实验使用 Apelin-13 TFA (1664.85 Da) 作为阳性 Block 抗体；Conc.01 终浓度为 1 μ M，4 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 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	Apelin-13 TFA	PBS	1μM	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		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 16-24 h，离心收集 H_APJ Reporter HEK-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 μ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖上车盖，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）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Apelin-13 TFA	1 mM	0.1 mM	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer
forskolin	60.9 mM	6.09 mM	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 B2 孔加入 71.87 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 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 B2 中加入 1.47 μL Apelin-13 TFA），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.33 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.47 μL Apelin-13 TFA	加入	71.87 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													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.33 μL ，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) 配置 2 $\times$ 激活剂，6 μM forskolin（7.2 μL 6.09 mM forskolin 母液加入到 7326 μL Assay Buffer 中，混匀后使用）。
- j) 取出步骤 a 孵育过夜的细胞孔板，吸弃上清 100 μL 。
- k) 然后加入步骤 h 准备好的梯度稀释溶液，每孔加入 50 μL 混匀，盖上盖板放入培养箱孵育 1 h。
- l) 1 h 后取出步骤 i 准备好的溶液，加入到步骤 k 的细胞孔板中，每孔加入 50 μL 混匀。
- m) 盖上盖板，继续孵育 16 h。
- n) 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_APJ Reporter HEK-293 Cell Line	forskolin + 0 μM Apelin-13 TFA	forskolin + 1 μM Apelin-13 TFA	forskolin + 15.26 pM Apelin-13 TFA
	453953	124390	371282

3) 验证结果

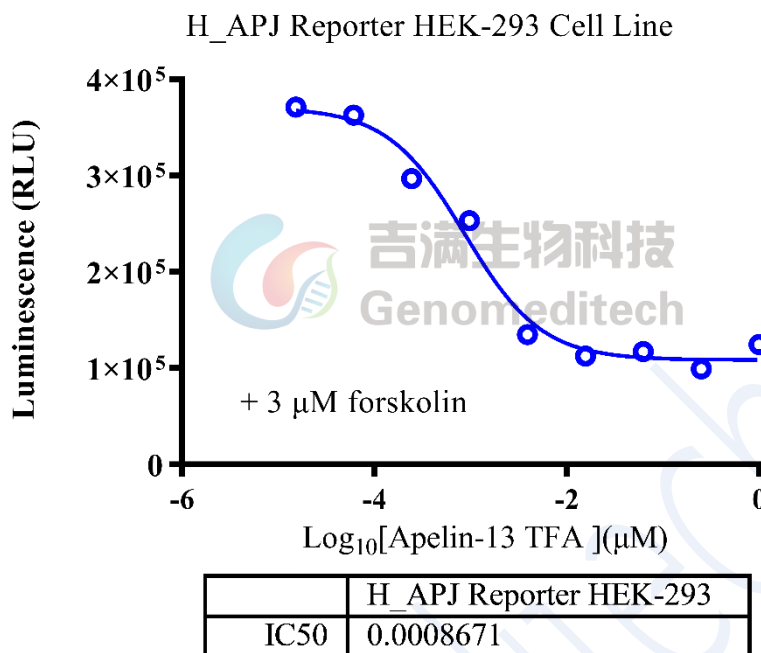


Fig 2. 验证结果

附录 1 稳定性验证结果

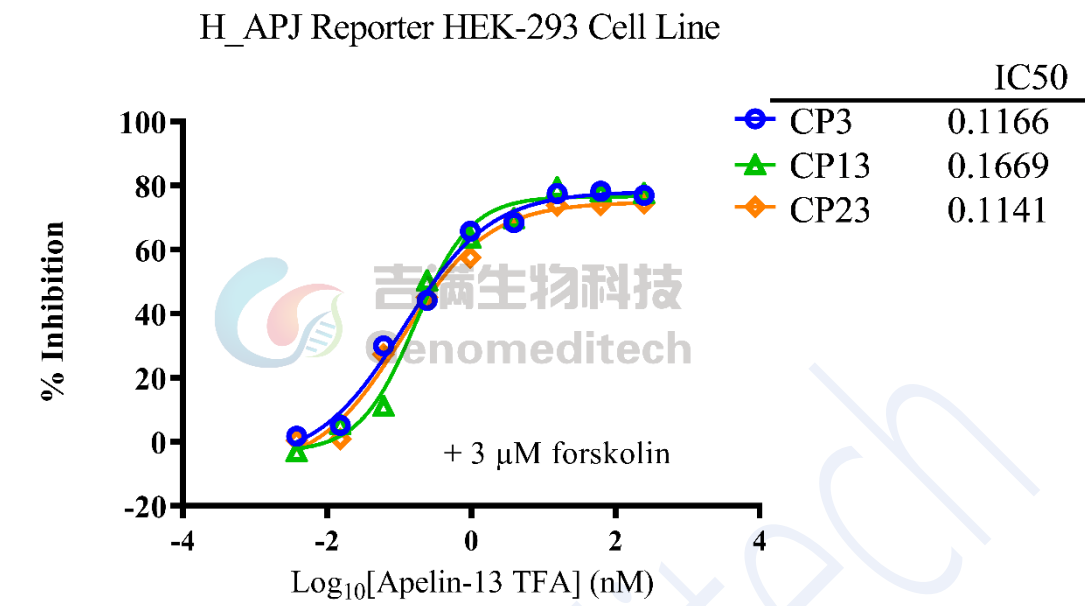


Fig 3. 稳定性验证结果

附录 2 流式验证结果

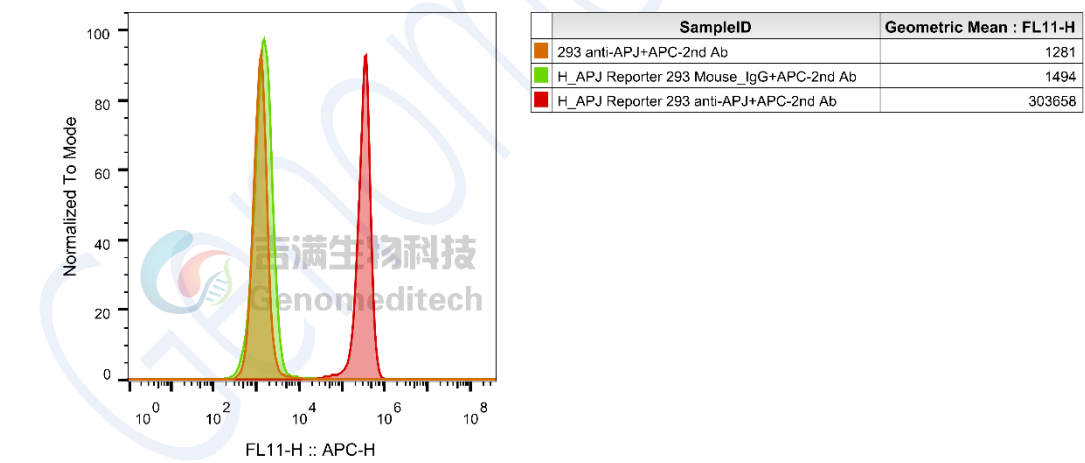


Fig 4. 流式验证结果

相关产品

NPR1	
H_NPR1 Reporter Cell Line	Cynomolgus_NPR1 CHO-K1 Cell Line
Flag-Mouse_NPR1 CHO-K1 Cell Line	H_NPR1 CHO-K1 Cell Line
H_NPR1 HEK-293 Cell Line	Mouse_NPR1 CHO-K1 Cell Line
Rat_NPR1 CHO-K1 Cell Line	
Anti-NPR1 hIgG1 Antibody(XX-16)	Anti-NPR1 hIgG1 Reference Antibody (XX-16)
Anti-NPR1 hIgG4 Antibody(REGN-5381)	Anti-NPR1 hIgG4 Reference Antibody (REGN-5381)

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。