

产品手册

Rat_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter COS-7 Cell Line

Rat_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter COS-7 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	6
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备	6
2.	试剂耗材准备	6
五、	细胞复苏、传代、冻存	7
1.	细胞复苏	7
2.	细胞传代（以 10 cm 皿为例）	7
3.	细胞冻存	7
六、	使用方法	8
1.	激活实验	8
1)	加样步骤	8
2)	报告基因检测	9
3)	验证结果	9
附录 1 :	Calcitonin 验证结果	10
附录 2 :	RT 验证结果	10
相关产品		12
使用许可协议:		13

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-C36541	Rat_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter COS-7 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C36541	Rat_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter COS-7 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

降钙素基因相关肽家族, 包括降钙素 (CT, Calcitonin)、胰岛淀粉样肽 (AMY, Amylin)、降钙素基因相关肽 (CGRP, Calcitonin Gene Related Peptide)、肾上腺髓质素 (AM, Adrenomedullin)。

Amylin 有三类潜在受体, 均是由降钙素受体 (CALCR、CTR) 和受体活性修饰蛋白 (RAMPs) 形成的复合物。受体活性修饰蛋白 (RAMPs) 是一系列 I 型单跨膜蛋白, 它们与 G 蛋白偶联受体形成异源二聚体, 分为三种亚型: RAMP1, RAMP2 和 RAMP3。它们具有较大的细胞外氨基末端结构域, 单个 TM 跨膜结构域和短的 ~10 个氨基酸的胞质结构域。这三个 RAMP 具有相似的基本结构, 但氨基酸序列中只有约 30% 的同一性。CALCR 和 RAMP1 形成的复合物 AMY1, CALCR 和 RAMP2 形成的复合物 AMY2, CALCR 和 RAMP3 形成的复合物 AMY3。

Amylin 由胰腺产生, 并作为激素发挥作用, 调节营养摄入。Amylin 神经元沉积的研究主要集中在 Amylin 在阿尔茨海默病中的作用。

Amylin 与受体复合物结合后, 复合物与 G 蛋白相互作用, $G_{\alpha s}$ 亚基从复合物中分离并激活腺苷酸环化酶, 产生 cAMP。细胞内 cAMP 浓度的升高刺激 cAMP 依赖的信号通路, 最终导致转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白与启动子结合, 诱导基因表达。

吉满生物 Rat_CALCR RAMP3 (AMY3) Reporter COS-7 Cell Line 报告基因细胞系, 是基于 cAMP 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 Amylin 与 CALCR/RAMPs 结合后, 通过激活 cAMP 信号通路激活荧光素酶 (Luciferase) 的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果, 因此可用于 Amylin 相关药物的体外效果评价。

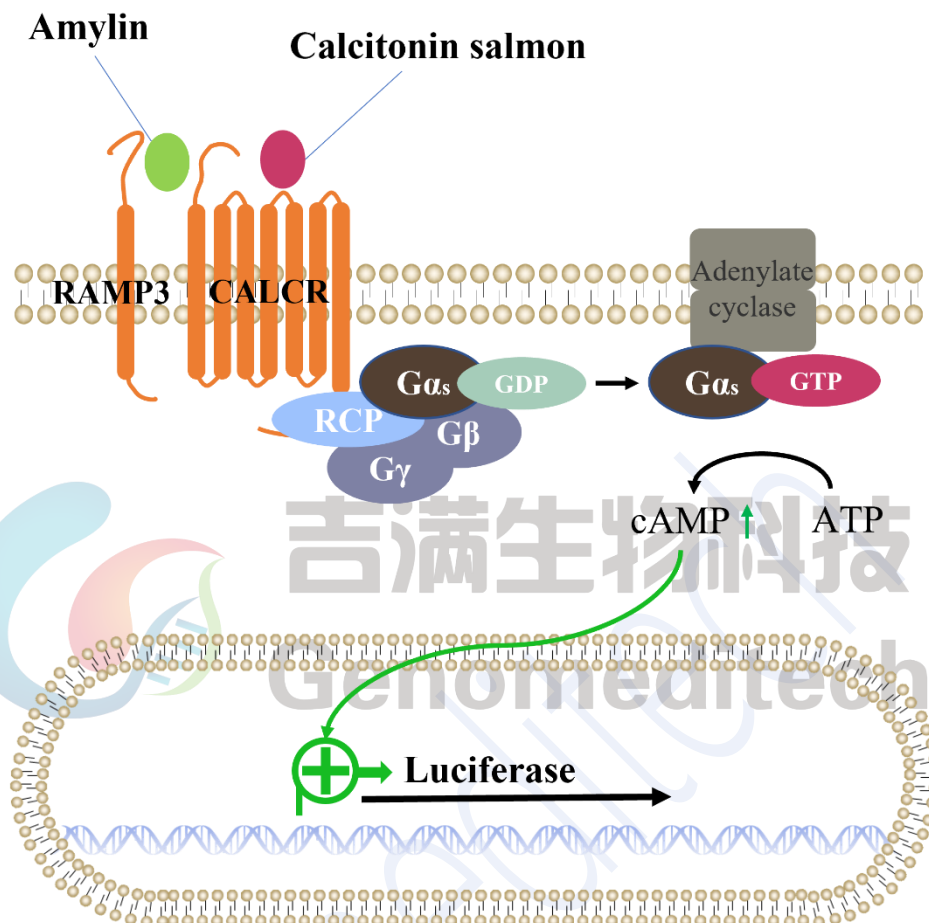


Fig.1 通路示意图

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+10 µg/mL Blasticidin+150 µg/mL Bleomycin+1 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.
DMEM	500 mL	Gibco/C11995500BT
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Bleomycin	5 mg	Genomeditech/GM-040408-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated	96-well	Corning/3912
Microplate		
Amylin, amide, rat	500 µg	Targetmol/TP1232
Calcitonin salmon	1 mg	GLPBIO/GC32851
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

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 5 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 $3-4 \times 10^5$ 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。

- 细胞为非洲绿猴 SV40 转化的肾细胞，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 90%，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 90%，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：

- FBS 血清需 56 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min，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. 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 Rat_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter COS-7 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Amylin, amide, rat（以下简称 Amylin）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 2.5 μM ，4 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.08 分别排布在 B2-B9，B10 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μL 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	
B	Amylin	PBS	2.50 μM	625.00 nM	156.25 nM	39.06 nM	9.77 nM	2.44 nM	610.35 pM	152.59 pM	0	PBS
C		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 1×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行（如 B 行）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Amylin	255.1 μM	/	直接使用储液

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B1 孔中加入 160 μL 的 Assay buffer，B2-B10 加入 120 μL 的 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 1.58 μL Amylin）。

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	1.58 μL Amylin	加入	160 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（如 B2）中吸取 40 μ L 液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 B3），充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 8 个梯度稀释孔（B9）。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出，吸弃上清 100 μ L。
- j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 100 μ L。
- k) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 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。

Rat_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter COS-7 Cell Line	0 μ M	2.50 μ M	152.59 pM
	234138	2061097	255471

3) 验证结果

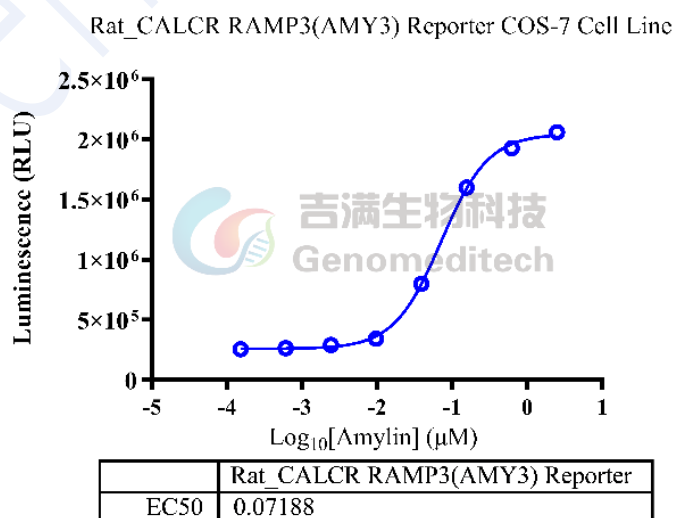


Fig 2. 激活功能验证结果

附录 1 : Calcitonin 验证结果

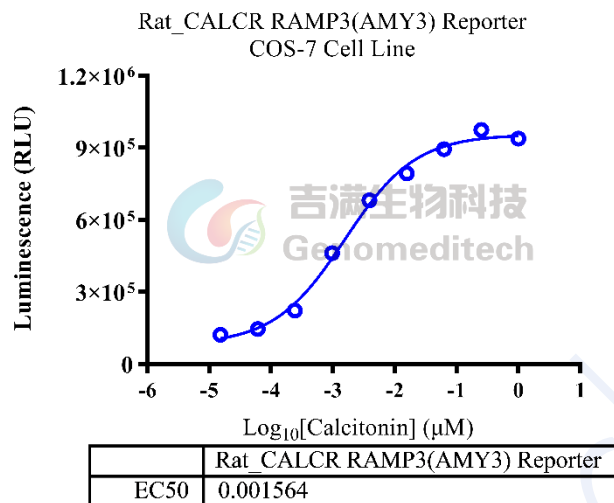


Fig 3. 制备 Calcitonin salmon (GLPBIO/GC32851) 梯度稀释液; 提前 16-24 h 配置 Rat_CALCRR RAMP3(AMY3) Reporter COS-7 Cell Line (Genomeditech/# GM-C36541), 每孔细胞量 1×10^4 个。将过夜培养的细胞吸弃上清, 加入稀释好的 Calcitonin 溶液, 孵育 6 h 后检测 Luciferase 数值。

附录 2 : RT 验证结果

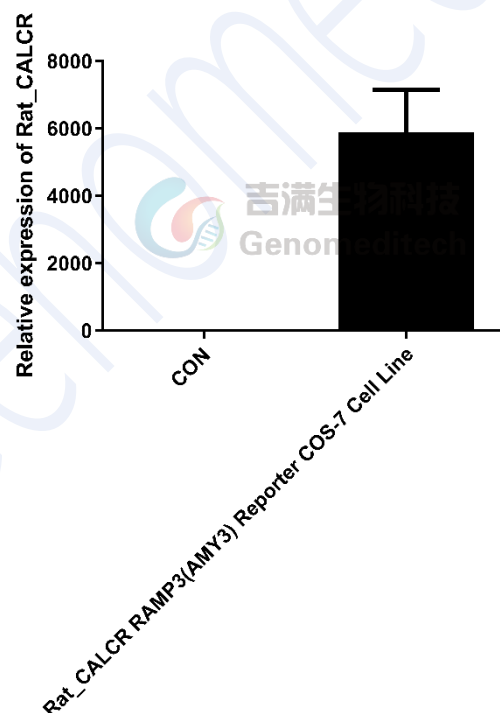


Fig 4. Rat_CALCRR RAMP3(AMY3) Reporter COS-7 Cell Line 使用 RT 验证 Rat CALCRR 的表达

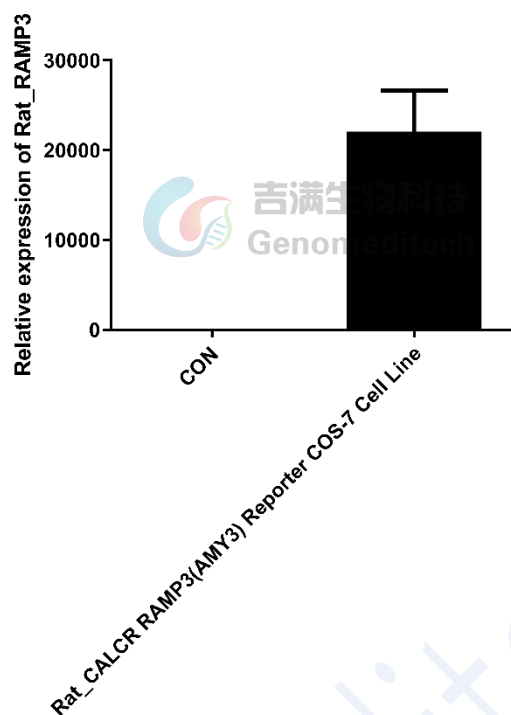


Fig 5. Rat_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter COS-7 Cell Line 使用 RT 验证 Rat RAMP3 的表达

相关产品

GCGR	
H_GCGR Reporter CHO-K1 Cell Line	H_GCGR Reporter HEK-293 Cell Line
H_GCGR Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line	Cynomolgus_GCGR 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	H_GLP1R β -Arrestin Reporter CHO-K1 Cell Line
Cynomolgus_GLP1R GIPR CHO-K1 Cell Line	Cynomolgus_GLP1R HEK-293 Cell Line
H_GLP1R CHO-K1 Cell Line	H_GLP1R GIPR CHO-K1 Cell Line
H_GLP1R HEK-293 Cell Line	Mouse_GLP1R GIPR CHO-K1 Cell Line
Mouse_GLP1R HEK-293 Cell Line	
Anti-GLP1R hIgG1 Antibody(mAb-36986)	Anti-H_GLP1R hIgG1 Antibody(glutazumab)
FGFR1	
H_FGF21 Reporter HEK-293 Cell Line	
Human FGF-21 Protein; His Tag	
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 Cell Line
H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line	Cynomolgus_GIPR CHO-K1 Cell Line
Cynomolgus_GIPR HEK-293 Cell Line	H_GIPR CHO-K1 Cell Line
H_GIPR HEK-293 Cell Line	Mouse_GIPR CHO-K1 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
BRE Reporter 293 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 A Protein; His Tag (CHO)
Human Activin B Protein; His Tag	Human ACVR2A Protein; hFc Tag
Human ACVR2A Protein; hFc Tag (Sotatercept)	Human ACVR2A Protein; His Tag
Human ACVR2B Protein; hFc Tag	Human ACVR2B Protein; His Tag
Human latent GDF-8 Protein; His Tag	Mouse ACVR2A 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
ASGR1	
H_ASGR1 CHO-K1 Cell Line	H_ASGR1 HEK-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。