

产品手册

H_TSHR Reporter CHO-K1 Cell Line

H_TSHR Reporter 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：V2.11.1

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（示例）.....	7
1.	蛋白验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	蛋白验证实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	10
附录 1	流式验证结果：.....	11
相关产品	11
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-C39741	H_TSHR Reporter 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-C39741	H_TSHR Reporter 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

TSHR (Thyroid-Stimulating Hormone Receptor; 促甲状腺激素受体) 是一种重要的跨膜蛋白, 属于 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 家族。主要表达于甲状腺滤泡上皮细胞膜, 通过与促甲状腺激素 (TSH) 结合激活腺苷酸环化酶信号通路, 驱动甲状腺激素 (T3/T4) 的合成与释放。其异常活化或失活可导致多种甲状腺疾病: 过度激活引发 Graves 病 (毒性弥漫性甲状腺肿) 和甲状腺毒症, 表现为代谢亢进; 功能缺陷则导致原发性甲状腺功能减退症, 需依赖左旋甲状腺素 (LT4) 终身替代治疗。此外, TSHR 信号通路还参与脂肪代谢、骨代谢和能量稳态调节, 其非甲状腺特异性作用为肥胖、骨质疏松等代谢性疾病的治疗提供了潜在新方向。

吉满生物 H_TSHR Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞系是基于转录因子信号通路构建的 Luciferase 报告基因细胞系。当 TSH 蛋白或 TSHR 激动剂与受体结合, 激活下游信号通路, 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。因此可用于相关药物的体外评价效果。

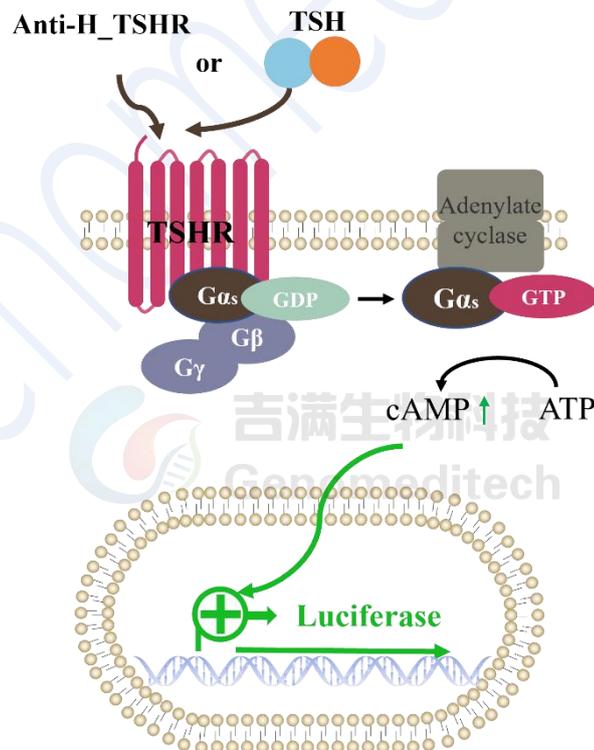


Fig 1.原理示意图

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+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	Cegrogen biotech/A0500-3010
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
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
Recombinant Human TSH	50 µg	Novoprotein/DRA17
Anti-H_TSHR mIgG2a Antibody(KSAb2)	20 µg	Genomeditech/GM-87935AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	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

- 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。
- 通过补充复苏培养基的形式，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（示例）

1. 蛋白验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TSHR Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human TSH（25.9 kDa；以下简称 Human TSH）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ ，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		
B	Human TSH	PBS	20 $\mu\text{g/mL}$	6.67 $\mu\text{g/mL}$	2.22 $\mu\text{g/mL}$	740.74 ng/mL	246.91 ng/mL	82.3 ng/mL	27.43 ng/mL	9.14 ng/mL	3.05 ng/mL	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 10 个孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上市盖，于孵箱中孵育过夜使用。

- 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
Human TSH	1.91 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 孔板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔分别加入 163.27 μL Assay Buffer；B3-B10 孔，分别加入 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 1.73 μL Human TSH），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	1.73 μL Human TSH	加入	163.27 μL	110 μL									
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- f) 从第一个梯度稀释孔 B2 中分别吸取 55 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3 中，充分混匀。
- g) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- h) 将步骤 1 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100 μL 培养基。
- a) 加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100 μL 。
- b) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 16 h。
- c) 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。

H_TSHR Reporter CHO-K1 Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3.05 ng/mL
	176971	3352397	186385

3) 验证结果

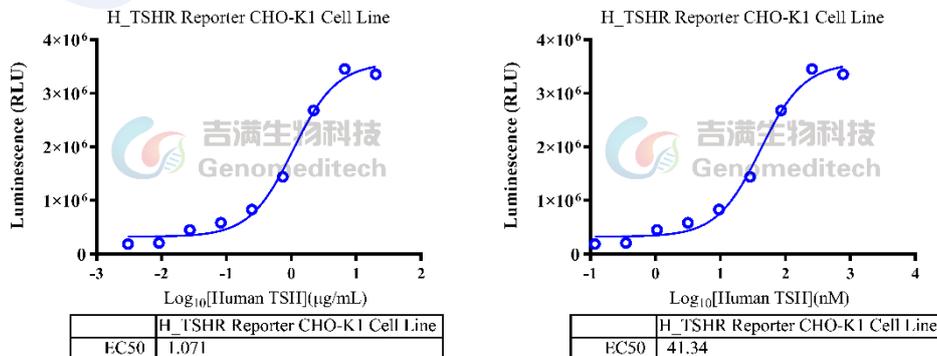


Fig 2. 激活验证结果

（右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. 蛋白验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_TSHR Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Anti-H_TSHR mIgG2a Antibody(KSAb2) (约 150 kDa; 以下简称 Anti-H_TSHR) 作为阳性药物, Conc.01 浓度为 $4 \mu\text{g/mL}$, 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 $100 \mu\text{L}$ 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		
B	Anti-H_TSHR	PBS	4 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	250 ng/mL	62.5 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 pg/mL	0 pg/mL	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 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜使用。

- i) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- j) 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B10)。
- k) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-H_TSHR	0.9656 mg/mL	/	直接使用储液

- l) 96 孔 V 孔板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔分别加入 $146 \mu\text{L}$ Assay Buffer; B3-B10 孔, 分别加入 $110 \mu\text{L}$ Assay Buffer。
- m) 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 $0.61 \mu\text{L}$ Anti-H_TSHR), 混匀。

母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 36.67 μL , 加入次孔										对照孔	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	0.61 μL Anti-H_TSHR	加入	146 μL	110 μL								
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- n) 从第一个梯度稀释孔 B2 中分别吸取 36.67 μL , 加入到第二个梯度稀释孔 B3 中, 充分混匀。
- o) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- p) 将步骤 1 孵育过夜的孔板取出, 每孔吸弃 100 μL 培养基。
- d) 加入之前准备好的梯度稀释液, 每孔 100 μL 。
- e) 盖上班盖, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 16 h。
- f) 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。

H_TSHR Reporter CHO-K1 Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	61.04 pg/mL
	774499	15430768	853498

3) 验证结果

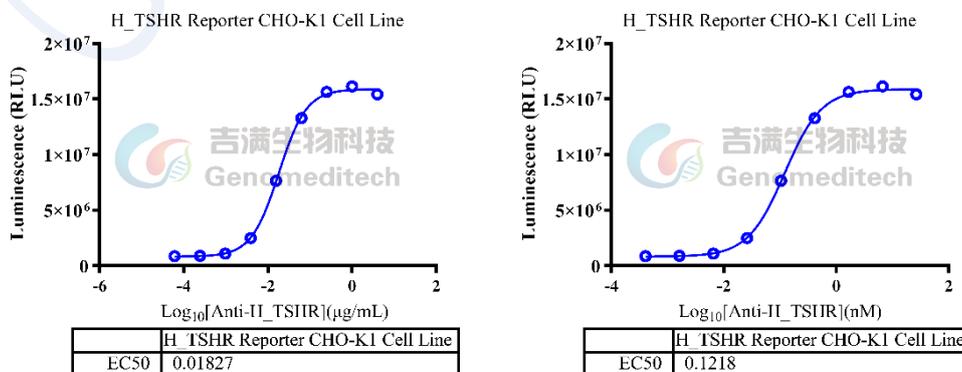


Fig 2. 激活验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录 1 流式验证结果:

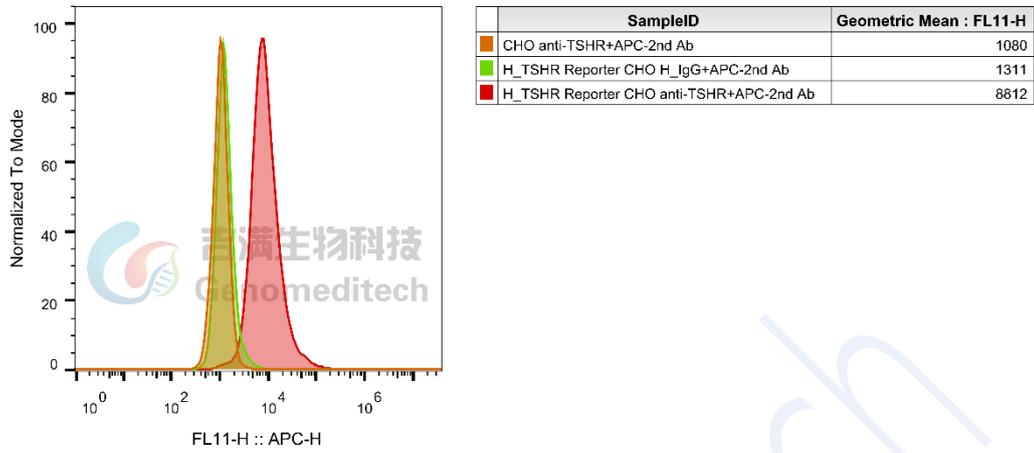


Fig 3.使用 Anti-H_TSHR mIgG2a Antibody(KSAb2) (Genomeditech/ GM-87935AB) 抗体流式验证结果

相关产品

TSHR	
H_TSHR HEK-293 Cell Line	
Anti-H_TSHR mIgG2a Antibody(KSAb2)	

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