

## 产品手册

### H\_MC1R Reporter CHO-K1 Cell Line

### H\_MC1R 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：V2.12.3

## 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. | 激活实验 .....              | 7  |
| 1) | 加样步骤 .....              | 7  |
| 2) | 报告基因检测 .....            | 8  |
| 3) | 验证结果 .....              | 9  |
|    | 使用许可协议： .....           | 10 |

## 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-C39435 | H_MC1R 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-C39435 | H_MC1R 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

MC1R 蛋白是一种由 MC1R 基因编码的跨膜 G 蛋白偶联受体，主要表达于黑色素细胞、角质形成细胞及中枢神经系统神经元中。其核心功能是通过结合配体（如 $\alpha$ -黑素细胞刺激素  $\alpha$ -MSH），激活下游 cAMP 信号通路，从而调控黑色素合成、紫外线防护及炎症反应。此外，MC1R 蛋白还参与调节能量代谢、脂肪分布及神经退行性疾病（如帕金森病），并与炎症性疾病（如银屑病）的发生发展密切相关，近年来成为靶向治疗皮肤癌、肥胖及相关疾病的潜在分子靶点。

吉满生物H\_MC1R Reporter CHO-K1 Cell Line 报告基因细胞系，是基于 MC1R 信号通路构建的一种Luciferase报告基因细胞系。 $\alpha$ -MSH 与其受体 MC1R 结合时，MC1R 与异源三聚体 Gs ( $\alpha\beta\gamma$ ) 结合，诱导腺苷酸环化酶活化，增加细胞质中的 cAMP 水平，cAMP 激活 PKA，使调节基因转录蛋白磷酸化从而激活荧光素酶（Luciferase）的表达。Luciferase读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于MC1R相关药物的体外效果评价。

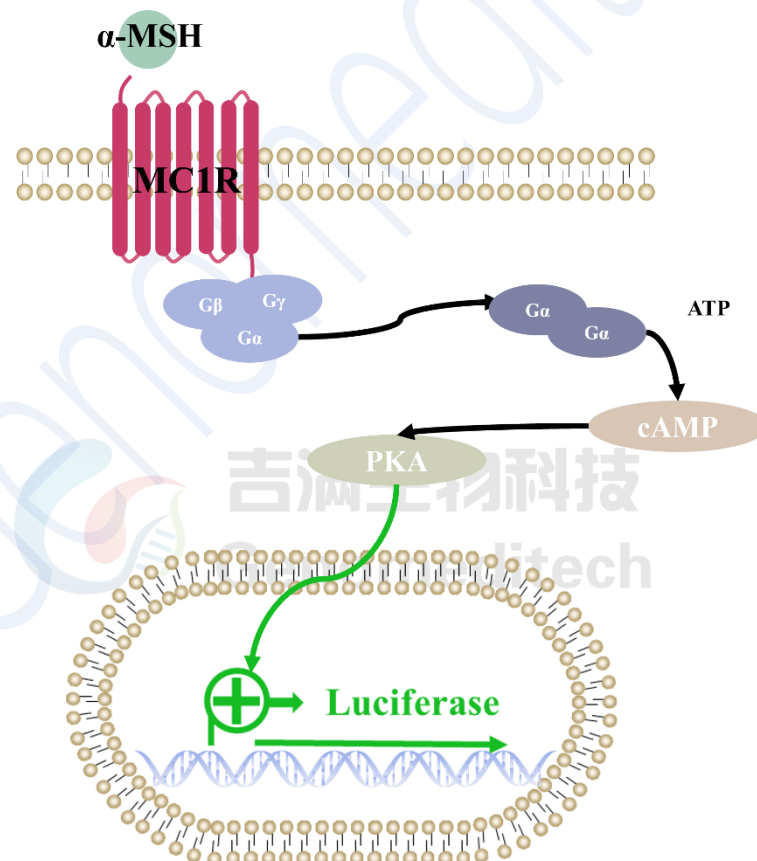


Fig 1.作用原理

## 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:      | F12K +10% FBS+1% P.S                                        |
| 细胞生长培养基:      | F12K+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin+0.4 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        | ExCell/FSP500              |
| Pen/Strep                                         | 100 mL        | Thermo/15140-122           |
| Blasticidin                                       | 10 mg         | Genomeditech/GM-040404-1   |
| Puromycin                                         | 25 mg         | Genomeditech/GM-040401-1   |
| 96 well round cell culture plate                  | Plate         | PakGent/CL-PT096           |
| 96-well White Opaque Plate                        | Plate         | Thermo/236108              |
| 96-well U-bottom Plate                            | Plate         | Saining/1014010            |
| α-MSH                                             | 5 mg          | RHAWN/R032275              |
| Anti-His mIgG2a Antibody                          | /             | Genomeditech/GM-59493AB    |
| 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

- 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。

- 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. 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_MC1R Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为  $1 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用  $\alpha$ -MSH（1664.88 Da）作为阳性药物，Conc.01 浓度终为 600 nM，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  $\mu$ 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        | PBS | PBS |
| B | $\alpha$ -MSH | PBS | 600.00<br>nM | 150.00<br>nM | 37.50<br>nM | 9.38<br>nM | 2.34<br>nM | 585.94<br>pM | 146.48<br>pM | 36.62<br>pM | 9.16<br>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

- 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  $1 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加 100  $\mu$ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu$ L PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。
- 使用无菌 96 孔 U 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                                   |
|---------------|------|--------|----------------------------------------|
| $\alpha$ -MSH | 1 mM | 0.1 mM | 取 2 $\mu$ L 储液+18 $\mu$ L Assay Buffer |

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 160  $\mu$ L 的 Assay buffer，B3-B11 加入 120  $\mu$ L 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 0.97  $\mu$ L  $\alpha$ -MSH）。

| 母液吸取 |                            | 梯度稀释孔，依次从前孔吸取 40 $\mu$ L 加入次孔 |             |             |             |             |             |             |             |             |             | 对照孔         |    |
|------|----------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----|
|      |                            | 1                             | 2           | 3           | 4           | 5           | 6           | 7           | 8           | 9           | 10          | 11          | 12 |
| A    |                            |                               |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |
| B    | 0.97 $\mu$ L $\alpha$ -MSH | 加入                            | 160 $\mu$ L | 120 $\mu$ L | 120 $\mu$ L | 120 $\mu$ L | 120 $\mu$ L | 120 $\mu$ L | 120 $\mu$ L | 120 $\mu$ L | 120 $\mu$ L | 120 $\mu$ L |    |
| C    |                            |                               |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |
| D    |                            |                               |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |
| E    |                            |                               |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |
| F    |                            |                               |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |
| G    |                            |                               |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |
| H    |                            |                               |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |

- g) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 40  $\mu$ 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 9 个梯度稀释孔（B10）。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出，吸弃上清。
- j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 100  $\mu$ L。
- k) 盖上检测板盖，于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16 h。
- l) 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

|                                  |         |           |         |
|----------------------------------|---------|-----------|---------|
| H_MC1R Reporter CHO-K1 Cell Line | 0.00 nM | 600.00 nM | 9.16 pM |
|                                  | 649555  | 8163406   | 816677  |

### 3) 验证结果

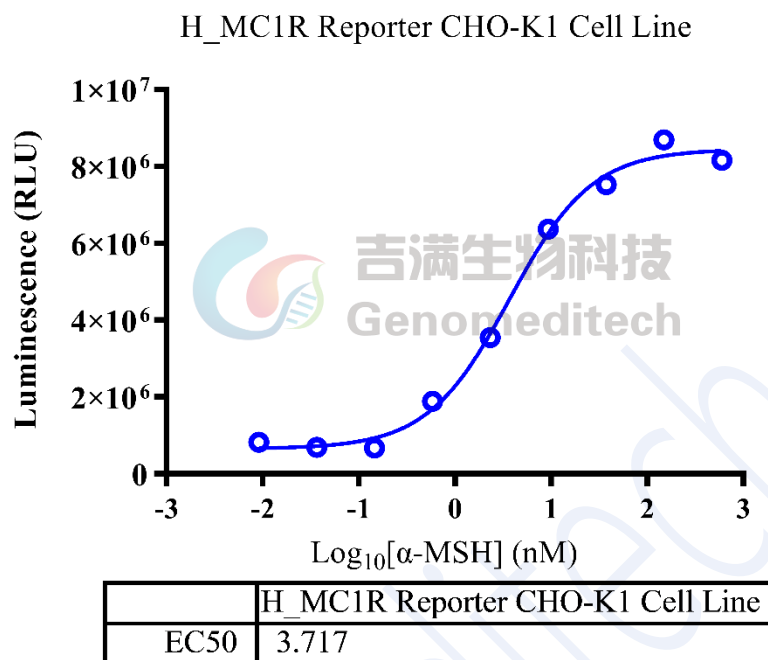


Fig. 2 Response to  $\alpha$ -MSH. The H\_MC1R Reporter CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C39435) at a concentration of 1E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of  $\alpha$ -MSH (RHAWN/R032275) in assay buffer (F12K+1% FBS+1% P.S) for 16 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [12.6]. Data are shown by drug molar concentration.

## 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。

Genomeditech