

## 产品手册

### H\_GIPR Reporter HEK-293 Cell Line

### H\_GIPR 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：V2.12.5

## 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.	激活剂验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	GIP 激活； Anti-H_GIPR (AMG-133)抑制实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	10
3)	验证结果.....	11
附录 1:	功能稳定性验证.....	12
附录 2:	流式稳定性验证.....	12
附录 3:	cAmp 检测.....	13
相关产品.....		14
使用许可协议: .....		15

## 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-C24030	H_GIPR 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-C24030	H_GIPR 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

胃抑制多肽受体（GIPR）是一种在人体中由 GIPR 基因编码的蛋白质，由胃抑制多肽（GIP）激活，是一类 G 蛋白偶联受体家族的成员。胃抑制多肽受体主要存在于胰腺的  $\beta$  细胞中。胃抑制多肽激活的 GIPR 通过与异源三聚体 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，并导致其移位至细胞核。

吉满生物 H\_GIPR Reporter HEK-293 Cell Line 报告基因细胞系，是基于 GIPR 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当胃抑制多肽与其受体 GIPR 结合时，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 GIPR 相关药物的体外效果评价。

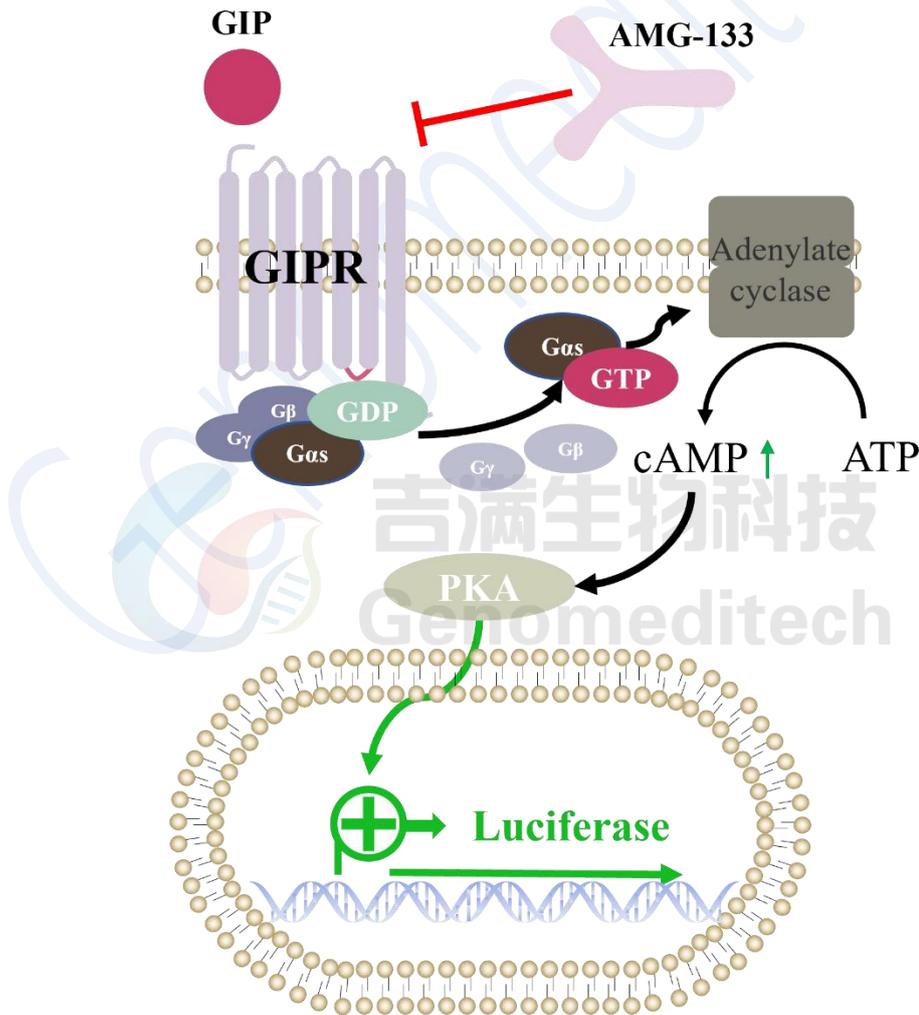


Fig 1.原理示意图

## 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.
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	ExCell/FSP500
DMEM	500 mL	gibco/C11995500BT
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
Cell Culture Dish	10 cm	NEST/704001
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C
Gastric Inhibitory Peptide (GIP), human	0.5 mg	GenScript/RP10795CN
Anti-H_GIPR hIgG1 Antibody(AMG-133)	/	Genomeditech/GM-84915AB

#### 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。**

- 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，当细胞密度大于 80%，即可进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 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 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。
- 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 30-40%）。

#### 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。

## 六、使用方法（示例）

### 1. 激活剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_GIPR Reporter HEK-293 Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 GIP 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 2 nM，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  $\mu$ 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	GIP	PBS	2 nM	666.67 pM	222.22 pM	74.07 pM	24.69 pM	8.23 pM	2.74 pM	914.49 fM	304.83 fM	0	PBS
C		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  $1.5 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加 100  $\mu$ L 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 100  $\mu$ L 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。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
GIP	20 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	使用 2 $\mu$ L 储液+198 $\mu$ 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 163.3  $\mu$ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 110  $\mu$ 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 1.65  $\mu\text{L}$  GIP），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 55 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	加入 1.65 $\mu\text{L}$ GIP	加入	163.3 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$								
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 55  $\mu\text{L}$ ，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) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100  $\mu\text{L}$  培养基。  
j) 加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100  $\mu\text{L}$ 。  
k) 盖上班盖，于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养 16 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。

H_GIPR Reporter HEK-293 Cell Line	0 nM	2 nM	304.83 fM
	286802	9753048	279158

## 3) 验证结果

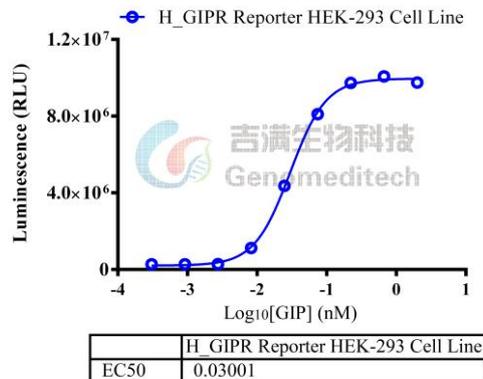


Fig 2.功能验证结果（GIP/PHOENIX/027-02）

## 2. GIP 激活; Anti-H\_GIPR (AMG-133)抑制实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 H\_GIPR Reporter HEK-293 Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  Cells/孔。使用 Anti-H\_GIPR hIgG1 Antibody(AMG-133) (以下简称为 AMG-133;150 kDa)作为阳性药物, Conc.01 终浓度为  $10 \mu\text{M}$ , 5 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  $100 \mu\text{L}$  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	AMG-133	PBS	10 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	400 nM	80 nM	16 nM	3200 pM	640 pM	130 pM	30 pM	0	0
C		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\_GIPR 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  $1.5 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加  $100 \mu\text{L}$  细胞/孔至中间孔。周围的孔加  $100 \mu\text{L}$  PBS。盖上班盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B10)。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
AMG-133	23.50 $\mu\text{M}$	/	直接使用储液
GIP	20 $\mu\text{M}$	0.2 $\mu\text{M}$	使用 2 $\mu\text{L}$ 储液+198 $\mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 10.26  $\mu\text{L}$  Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 55  $\mu\text{L}$  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 58.49  $\mu\text{L}$  AMG-133), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 13.75 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	58.49 $\mu\text{L}$ AMG-133	加入	10.26 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$									
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 13.75  $\mu\text{L}$ ，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，0.5 nM GIP (1.7  $\mu\text{L}$  0.2 $\mu\text{M}$  GIP 母液加入到 685.8  $\mu\text{L}$  Assay Buffer 中，混匀后使用)。
- j) 取出步骤 a 准备好的细胞孔板，吸弃上清 100  $\mu\text{L}$ 。加入步骤 h 的梯度稀释液，每孔 50  $\mu\text{L}$ ，混匀孵育 1 h。
- k) 1 h 后取出步骤 j 孵育好的混合溶液孔板，然后加入步骤 i 的激活剂溶液：每孔 50  $\mu\text{L}$ ，混匀。
- l) 盖上板盖，于 37  $^{\circ}\text{C}$  CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16 h。
- m) 收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_GIPR Reporter HEK-293 Cell Line	0 $\mu\text{M}$ + 0.25 nM GIP	10 $\mu\text{M}$ + 0.25 nM GIP	30 pM + 0.25 nM GIP
	8950404	367645	8903938

### 3) 验证结果

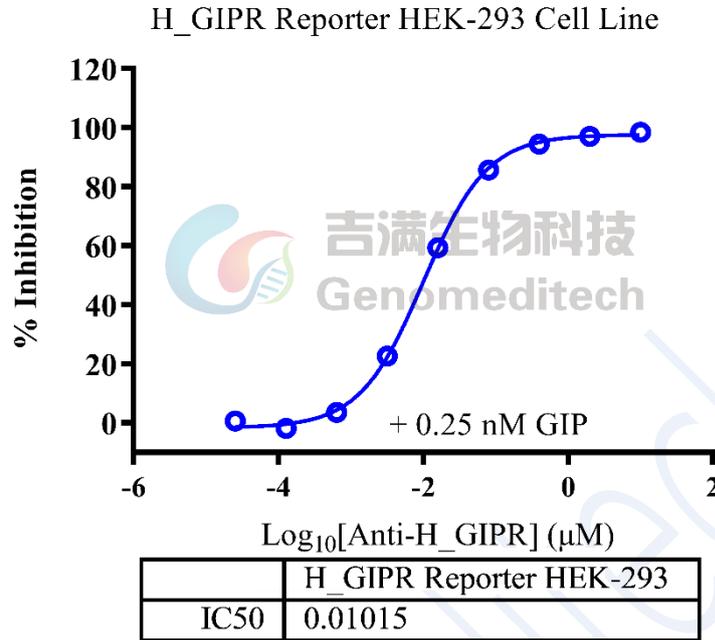


Fig 3. 功能验证结果 (GIP/PHOENIX/027-02)

## 附录 1：功能稳定性验证

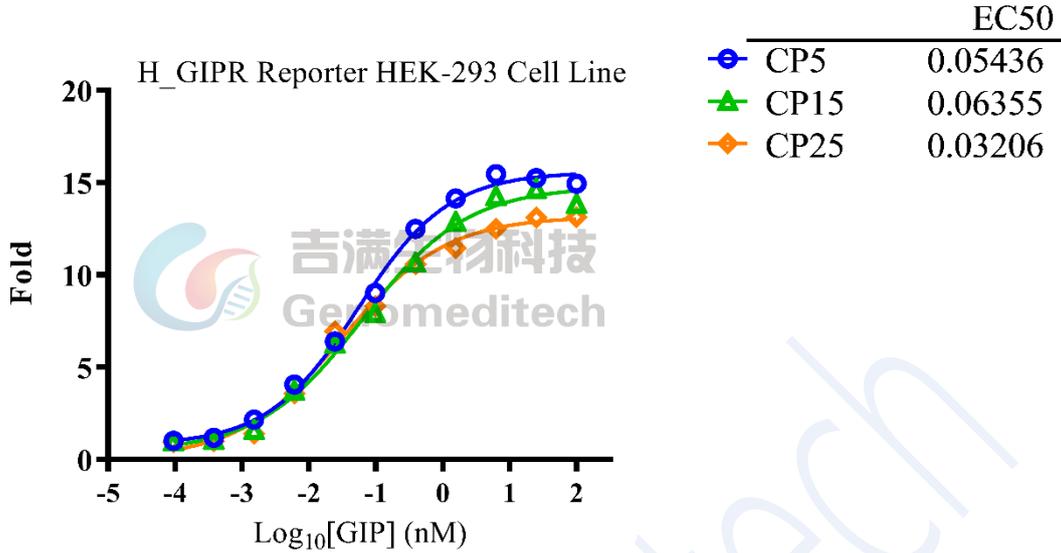


Fig 4. H\_GIPR Reporter HEK-293 Cell Line (Catalog # GM-C24030) 使用 GIP (GenScript/RP10795CN) 稳定性验证结果。制备 GIP(Human)梯度稀释液，首孔 100 nM，4 倍梯度稀释；提前 16-24 h 配置 H\_GIPR Reporter HEK-293 Cell Line，每孔细胞量  $1.5 \times 10^4$  个，铺板过夜。然后加入稀释好的 GIP 药物，孵育 16 h，收样检测 Luciferase 数值，使用 GraphPad 系统进行数据分析，纵坐标转换为倍率。结果显示，不同代次间倍率、EC50 数值稳定。

## 附录 2：流式稳定性验证



Fig 5. 使用 Anti-H\_GIPR hIgG1 Antibody (AMG-133) (Genomeditech/GM-84915AB)流式稳定性验证结果

### 附录 3: cAmp 检测

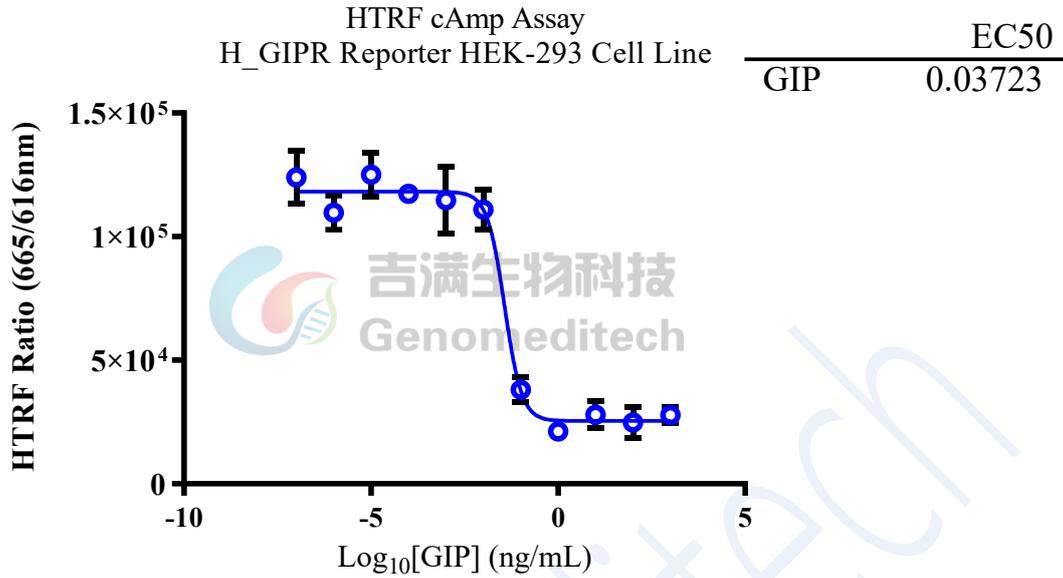


Fig 6. 将 H\_GIPR Reporter HEK-293 Cell Line 细胞以 7500 cells/孔 的密度接种于 白色 384 孔微孔板 (5 μL/孔) 中。随后添加梯度稀释的人 GIP (GenScript/RP10795CN) 溶液, 并在室温下孵育 30 min。然后使用 HTRF cAMP Gs Dynamic Detection Kit (revvity/62AM4PEB) 按照厂商说明书进行检测, 使用 Molecular Devices i3x 多功能读板仪, 以 340 nm 激发光、在 616 nm 和 665 nm 波长下测定发射信号。信号值以 665 nm/616 nm \* 100000 (HTRF Ratio) 表示, 并用于计算 EC50 值。

## 相关产品

GCGR	
H_GCGR Reporter CHO-K1 Cell Line	H_GCGR Reporter 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	Tango-H_GLP1R CHO-K1 Cell Line
Cynomolgus_GLP1R HEK-293 Cell Line	H_GLP1R CHO-K1 Cell Line
H_GLP1R HEK-293 Cell Line	Mouse_GLP1R HEK-293 Cell Line
Anti-GLP1R hIgG1 Antibody(mAb-36986)	Anti-H_GLP1R hIgG1 Antibody(glutazumab)
FGF21:FGFR	
H_FGF21 Reporter HEK-293 Cell Line	
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 DDX35TM Cell Line
Cynomolgus_GIPR HEK-293 Cell Line	H_GIPR CHO-K1 Cell Line
H_GIPR HEK-293 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
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 B Protein; His Tag
Human ACVR2A Protein; hFc Tag	Human ACVR2A Protein; His Tag
Human ACVR2B Protein; hFc Tag	Human ACVR2B Protein; His Tag
Human latent GDF-8 Protein; His Tag	Mouse ACVR2B Protein; His Tag
AMY: CALCRL RAMP	
H_CALCRL RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line	H_CALCRL Reporter CHO-K1 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。

Genomeditech