

## 产品手册

### H\_TACR2(NK2R) Gs Reporter 293 Cell Line

### H\_TACR2(NK2R) Gs Reporter 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：V2.12.1

## 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.	激动剂验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	9
3)	验证结果.....	9
	附录 1 RT 验证结果.....	10
	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-C43570	H_TACR2(NK2R) Gs Reporter 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-C43570	H_TACR2(NK2R) Gs Reporter 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

TACR2 (又称 NK2R) 是神经激肽受体家族的重要成员, 属于 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 超家族, 主要分布于中枢神经系统、呼吸道、胃肠道及免疫细胞等组织。其特异性内源性配体为神经激肽 A (Neurokinin A, NKA)。当配体 NKA 与 TACR2 结合并促使其偶联 Gs 蛋白时, 可激活腺苷酸环化酶 (AC), 催化 ATP 生成第二信使环磷酸腺苷 (cAMP)。细胞内 cAMP 水平升高进而激活蛋白激酶 A (PKA), 通过磷酸化下游靶蛋白, 调控基因表达、细胞代谢及神经兴奋性等生理过程。该 Gs/cAMP/PKA 信号通路的异常激活与多种病理状态相关, 可能参与调节呼吸道平滑肌张力、肠道分泌与运动功能, 以及焦虑、抑郁等相关的中枢神经调质释放。

吉满生物 H\_TACR2(NK2R) Gs Reporter 293 Cell Line 细胞系, 是一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 Neurokinin A、Neurokinin B、Substance P 等结合受体后, 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 TACR2(NK2R) 相关药物的体外效果评价。

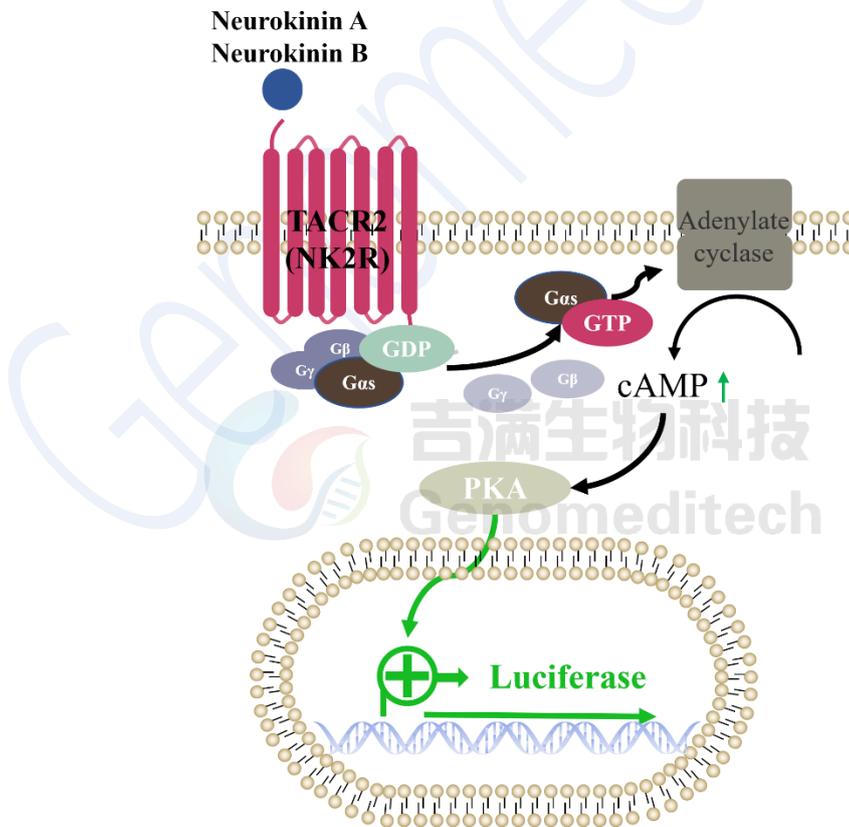


Fig 1. 原理示意图

## 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 $\mu\text{g/mL}$ Blasticidin+0.75 $\mu\text{g/mL}$ 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
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	96-well	Corning/3912
Microplate		
Neurokinin A	/	MCE/HY-P0197
Neurokinin B	/	Aladdin/N118980
EB1002	/	MCE/HY-P10746
Substance P		MCE/HY-P0201
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	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

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°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 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  $5 \times 10^6$  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°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，会有一些比例的死细胞，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 需 56°C 水浴 30 分钟，可热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. 激动剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_TACR2(NK2R) Gs Reporter 293 Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 Neurokinin A (1133.32 Da)、Neurokinin B (1210.43 Da)、EB1002 (1537.83 Da)、Substance P (1347.63 Da) 作为阳性药物，Neurokinin A 的 Conc.01 浓度为 3  $\mu$ M，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照；Neurokinin B 的 Conc.01 浓度为 10  $\mu$ M，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 C2-C10，C11 为 0 浓度对照；EB1002 的 Conc.01 浓度为 10  $\mu$ M，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 D2-D10，D11 为 0 浓度对照；Substance P 的 Conc.01 浓度为 50  $\mu$ M，5 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 E2-E10，E11 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	Neurokinin A	PBS	3.00 $\mu$ M	1.00 $\mu$ M	333.33 nM	111.11 nM	37.04 nM	12.35 nM	4.12 nM	1.37 nM	457.25 pM	0	PBS
C	Neurokinin B	PBS	10.00 $\mu$ M	3.33 $\mu$ M	1.11 $\mu$ M	370.37 nM	123.46 nM	41.15 nM	13.72 nM	4.57 nM	1.52 nM	0	PBS
D	EB1002	PBS	10.00 $\mu$ M	2.50 $\mu$ M	625.00 nM	156.25 nM	39.06 nM	9.77 nM	2.44 nM	610.35 pM	152.59 pM	0	PBS
E	Substance P	PBS	50.00 $\mu$ M	10.00 $\mu$ M	2.00 $\mu$ M	400.00 nM	80.00 nM	16.00 nM	3.20 nM	640.00 pM	128.00 pM	0	PBS
F		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
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/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu$ L PBS。盖上板盖，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。

- c) 每个待测药物，使用一行（如 B2-B11、C2-C11、D2-D11、E2-E11）。
- d) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Neurokinin A	1 mM	/	直接使用储液
Neurokinin B	1 mM	/	直接使用储液
EB1002	1 mM	/	直接使用储液
Substance P	1 mM	/	直接使用储液

- e) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 加入 180  $\mu$ L Assay Buffer，C2 孔加入 180  $\mu$ L Assay Buffer，D2 孔加入 160  $\mu$ L Assay Buffer，E2 孔加入 150  $\mu$ L Assay Buffer，B3-B12、C3-C12、D3-D12、E3-E12 孔，加入 120  $\mu$ 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 0.54  $\mu$ L Neurokinin A，C2 中加入 1.82  $\mu$ L Neurokinin B，D2 中加入 1.62  $\mu$ L EB1002，E2 中加入 7.89  $\mu$ L Substance P，），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔：B 行依次从前孔吸取 60 $\mu$ L，加入次孔；C 行依次从前孔吸取 60 $\mu$ L，加入次孔；D 行依次从前孔吸取 40 $\mu$ L，加入次孔；E 行依次从前孔吸取 30 $\mu$ L，加入次孔										对照孔			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12	
A															
B	0.54 $\mu$ L Neurokinin A 加入	180 $\mu$ 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	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L		
C	1.82 $\mu$ L Neurokinin B 加入	180 $\mu$ 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	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L		
D	1.62 $\mu$ L EB1002 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	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L		
E	7.89 $\mu$ L Substance P 加入	150 $\mu$ 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	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L		
F															
G															
H															

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 60  $\mu$ L，C2 中吸取 60  $\mu$ L，D2 中吸取 40  $\mu$ L，E2 中吸取 30  $\mu$ L；分别加入到第二个梯度稀释孔 B3、C3、D3、E3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10、C10、D10、E10）。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。

- j) 分别加入梯度稀释好的药物，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) 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_TACR2(NK2R) Gs Reporter 293 Cell Line + Neurokinin A	0 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	457.25 pM
	385251	44468458	588481
H_TACR2(NK2R) Gs Reporter 293 Cell Line + Neurokinin B	0 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	1.52 nM
	456815	26297024	486777
H_TACR2(NK2R) Gs Reporter 293 Cell Line + EB1002	0 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	152.59 pM
	420721	21680922	376874
H_TACR2(NK2R) Gs Reporter 293 Cell Line + Substance P	0 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	128.00 pM
	311822	9456991	336966

## 3) 验证结果

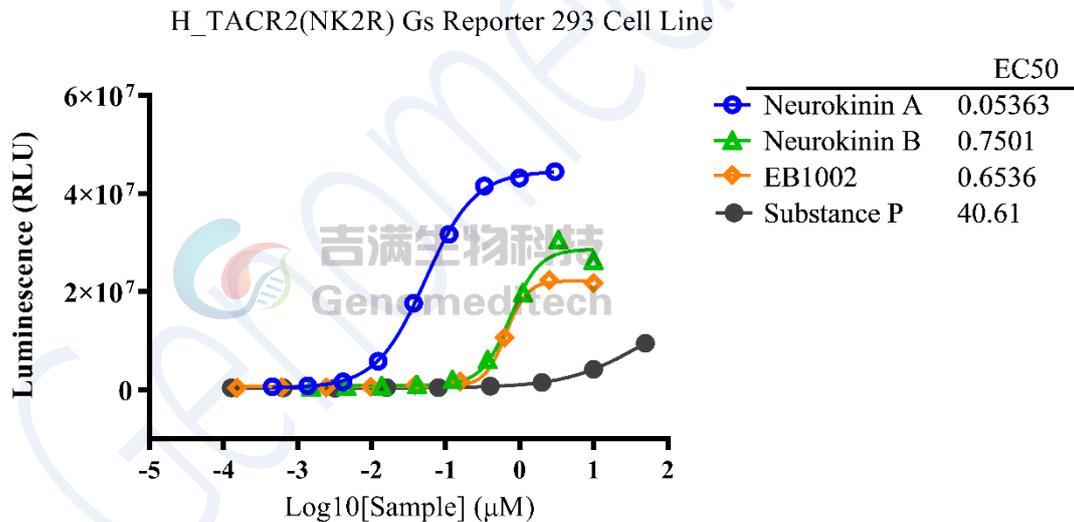


Fig 2. 激活验证结果

## 附录 1 RT 验证结果

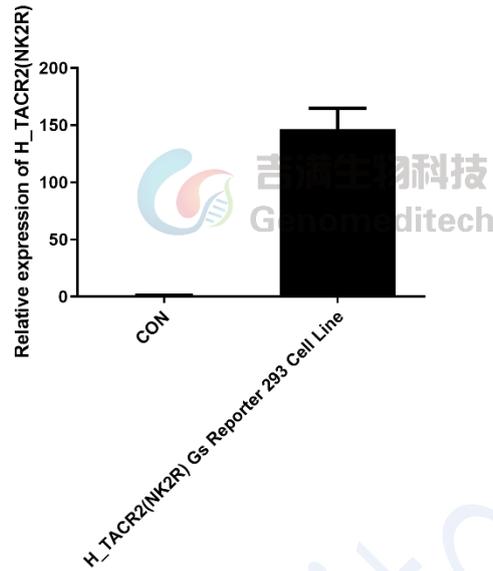


Fig 3.RT 验证结果

### 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。