

产品手册

H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 Cell Line

H_CALCRL RAMP1 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：V2.9.240524

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.....	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.....	10
2.	抑制实验.....	11
1)	加样步骤.....	11
2)	报告基因检测.....	12
3)	验证结果.....	13
附录 1:	流式验证.....	14
附录 2:	稳定性验证.....	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-C19979	H_CALCRL RAMP1 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-C19979	H_CALCRL RAMP1 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

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)。其中,人的 α -CGRP, β -CGRP蛋白质之间相差3个氨基酸。

降钙素基因相关肽家族的受体分为两种亚型:结合CT的降钙素受体(CALCR、CTR)和降钙素受体样受体(calcitonin receptor-like receptor, CRLR、CLR、CALCRL)。其中,降钙素基因相关肽(CGRP)受体由降钙素受体样受体、受体活性修饰蛋白(RAMP1)和CGRP受体成分蛋白(CRCP)三部分组成。RAMP1是降钙素样受体运输到质膜和受体与CGRP激动剂偶联所必需的。CRCP参与了CGRP受体和G蛋白之间的联系。配体结合后,复合物与G蛋白相互作用,G α 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。

临床前证据表明,在偏头痛期间,三叉神经节中激活的感觉神经元从脑膜内的投射神经末梢释放CGRP。释放的CGRP结合并激活CGRP受体,引起血管舒张和血浆外渗。因此,在偏头痛的治疗领域中,CGRP拮抗剂逐渐崭露头角。

吉满生物H_CALCRL RAMP1 Reporter 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CGRP与CALCRL/RAMP1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CGRP相关药物的体外效果评价。

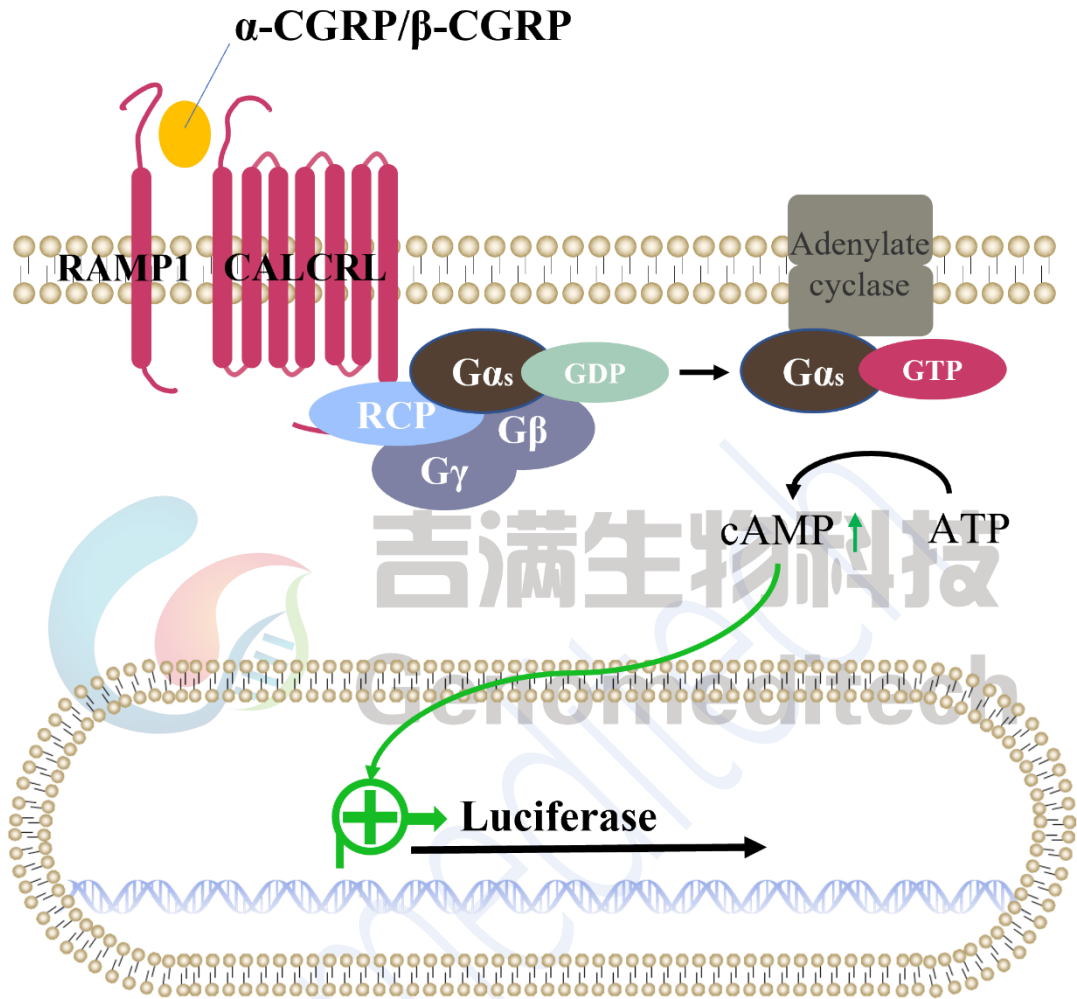


Fig 1. CALCA(CGRP) 通路示意图

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+4 µg/mL Blasticidin+400 µg/mL G418+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
G418	1 g	Genomeditech/ GM-040402-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
DMEM	500 mL	gibco/C11995500BT
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		
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C
CGRP (Human)	200 µg	phoenixpeptide/015-02
CGRP II (Human)	200 µg	phoenixpeptide/015-07
Rimegepant	2 mg	MedChemExpress/HY-15498
Anti-CALCRL RAMP1 hIgG2 Antibody(Erenumab)	/	Genomeditech/GM-51996AB

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 × 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 × 10⁵ 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 × 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 × 10⁶ 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

注:细胞复苏后的 1 至 2 代,使用复苏培养基,待细胞状态稳定后开始细胞维持和繁殖,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 × 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

1. 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 CGRP (Human) (以下简称 α -CGRP; 3789.35 Da)，CGRP II (Human) (以下简称 β -CGRP; 3790.39 Da) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 100 ng/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 μ 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	α -CGRP	PBS	100 ng/mL	33.33 ng/mL	11.11 ng/mL	3.7 ng/mL	1.23 ng/mL	411.52 pg/mL	137.17 pg/mL	45.72 pg/mL	15.24 pg/mL	0	PBS
C	β -CGRP	PBS	100 ng/mL	33.33 ng/mL	11.11 ng/mL	3.7 ng/mL	1.23 ng/mL	411.52 pg/mL	137.17 pg/mL	45.72 pg/mL	15.24 pg/mL	0	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
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 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖板上盖，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
α -CGRP	1 mg/mL	0.01 mg/mL	取 2 μ L 储液+198 μ L Assay Buffer
β -CGRP	1 mg/mL	0.01 mg/mL	取 2 μ L 储液+198 μ L Assay Buffer

- e) 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。如 B2、C2 孔中加入 163.35 μL 的 Assay buffer, B3-B11、C3-C11 加入 110 μL 的 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 μL α -CGRP; C2 中加入 1.65 μL β -CGRP)。

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	1.65 μL α -CGRP	加入	163.35 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	
C	1.65 μL β -CGRP	加入	163.35 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 (如 B2、C2) 中吸取 55 μL 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 B3、C3), 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10、C10)。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出, 每孔吸弃 90 μL 培养基。
- j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 100 μL 。
- k) 盖上检测板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 7 h。
- l) 使用 GMOne-Step 报告基因检测试剂盒, 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 Cell Line + α -CGRP	0 ng/mL	100 ng/mL	15.24 pg/mL
	204715	2453974	373720
H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 Cell Line + β -CGRP	0 ng/mL	100 ng/mL	15.24 pg/mL
	167852	1929424	192862

3) 验证结果

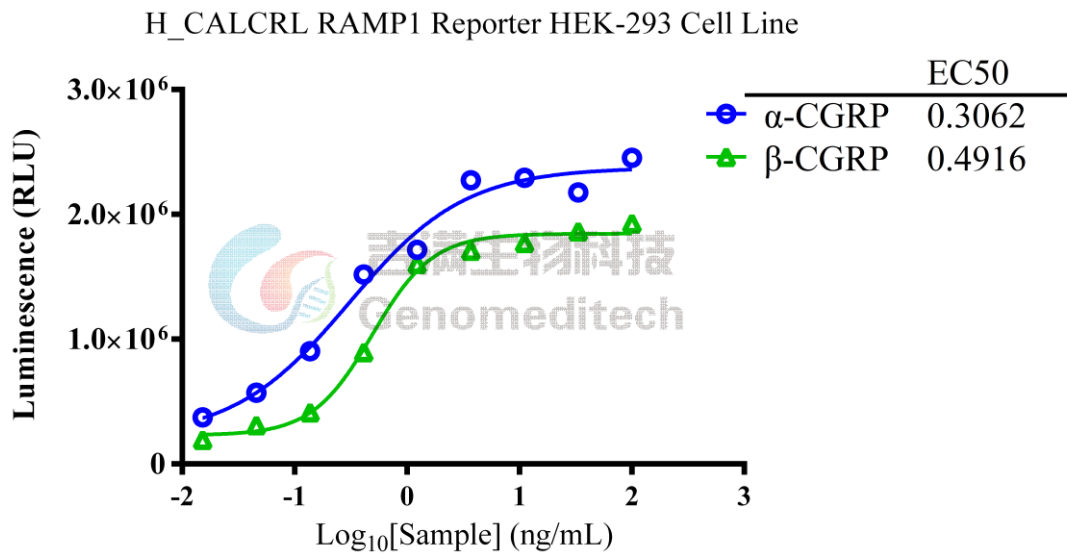


Fig 2. 激活功能验证结果

2. 抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Rimegepant（分子量：534.56）作为抑制药物， β -CGRP 作为激活药物（激活终浓度为 4 ng/mL），Conc.01 浓度为 100 μ M，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.9 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μ 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	Rimegepant PBS	100 μ M	25 μ M	6.25 μ M	1.56 μ M	390.63 nM	97.66 nM	24.41 nM	6.1 nM	1.53 nM	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 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ L 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
Rimegepant	20 mM	/	直接使用储液
β -CGRP	1 mg/mL	0.01 mg/mL	取 2 μ L 储液+198 μ L Assay Buffer

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 72.6 μ L 的 Assay buffer，B3-B10 加入 55 μ L 的 Assay Buffer。
- 吸取 0.73 μ L 待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.33 μL ，加入次孔										对照孔
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
A												
B	0.73 μL Rimegepant	加入	72.6 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	0
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔（如 B2 孔）中吸取 18.33 μL 液体，加入到第二个稀释孔中（如 B3），充分混匀。
- h) 以此类推，直至 B10 孔。B11 为不加药物的对照。
- i) 取出步骤 a 铺板过夜的细胞孔板，每孔吸弃 90 μL 培养基。
- j) 将步骤 h 的 Rimegepant，每孔取 50 μL 依次加入步骤 i 的细胞孔板中，放入培养箱孵育 1 h。
- k) 配置激活药物 $\beta\text{-CGRP}$ （激活浓度 $\times 2$ ）：取 1 μL 母液加入 1249 μL Assay Buffer 混匀。
- l) 取出步骤 j 的细胞孔板，每孔中加入 50 μL 步骤 k 配置好的激活药物，盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱继续孵育 7 h。
- m) 使用 GMOne-Step 报告基因检测试剂盒，收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	1.53 ng/mL
	1272269	204680	1302319

3) 验证结果

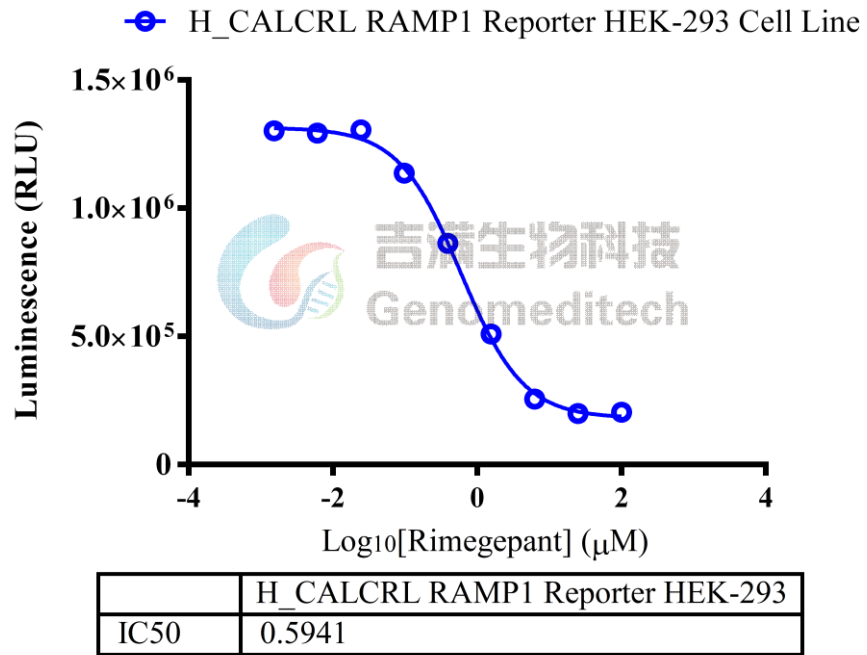


Fig 3.功能验证结果

附录 1: 流式验证

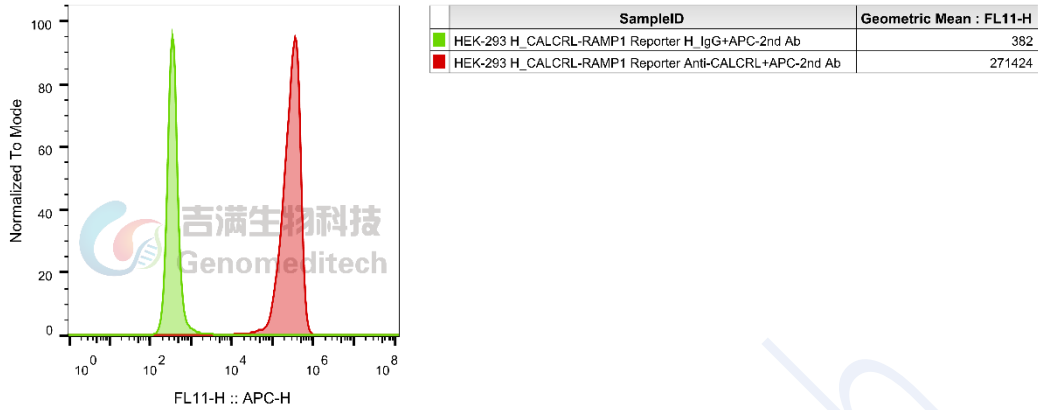


Fig 4. H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 Cell Line (Genomeditech/GM-C19979) 使用 Anti-CALCRL RAMP1 hIgG2 Antibody(Erenumab) (Genomeditech/GM-51996AB) 抗体流式验证结果

附录 2: 稳定性验证

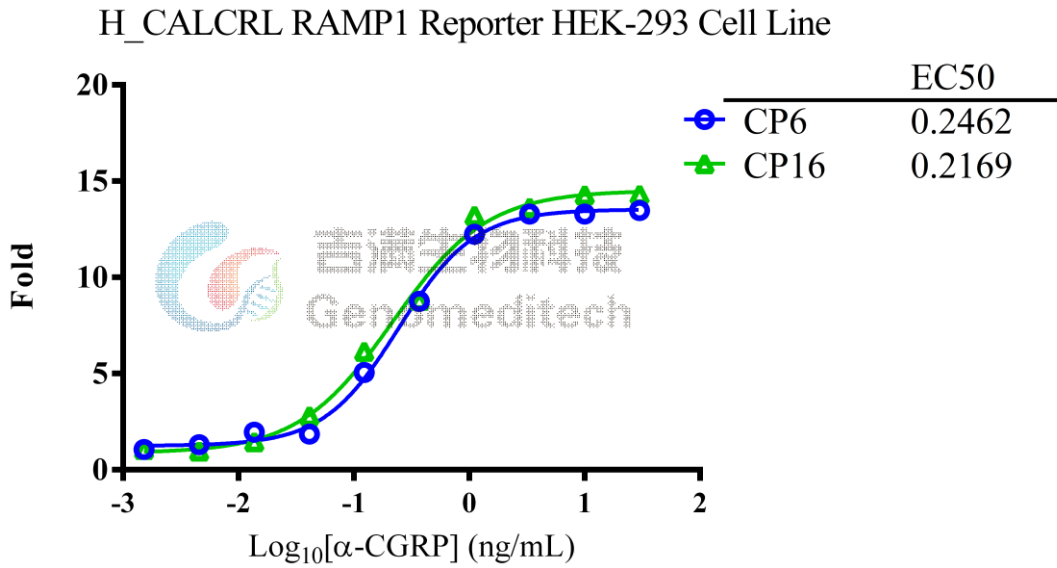


Fig 5. H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 Cell Line (Genomeditech/GM-C19979) 使用 α -CGRP 稳定性验证结果

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