

## 产品手册

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

### H\_FSHR 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：V2.9.2

## 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
附录 1:	流式验证结果.....	9
附录 2:	稳定性结果.....	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-C25571	H_FSHR 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-C25571	H_FSHR 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

卵泡刺激素受体(FSHR)是一种多重跨膜受体,与卵泡刺激素(FSH)相互作用,在前列腺、卵巢、甲状腺、神经内分泌腺、垂体瘤细胞和软组织肉瘤中均有表达,是A类G蛋白偶联受体(GPCR)的高度保守家族的成员。卵泡刺激素(FSH)是由垂体前叶促性腺激素细胞合成的,通过特异性受体(FSHR)发挥作用。在女性中,FSHR在颗粒细胞中表达,它调节Graafian卵泡的成熟,颗粒细胞增殖和雌激素的产生。在男性中,FSHR在睾丸Sertoli细胞中表达,它调节其正常精子发生和生殖细胞存活所需的代谢功能。

吉满生物 H\_FSHR Reporter CHO-K1 Cell Line 报告基因细胞系,是基于cAMP-PKA信号通路构建的一种Luciferase报告基因细胞系。当FSH与其受体结合时,亚基互相解离。G $\alpha$ s蛋白偶联,激活腺苷环化酶,促使cAMP在细胞内含量升高并增加PKA的含量,激活信号通路,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FSHR相关药物的体外效果评价。

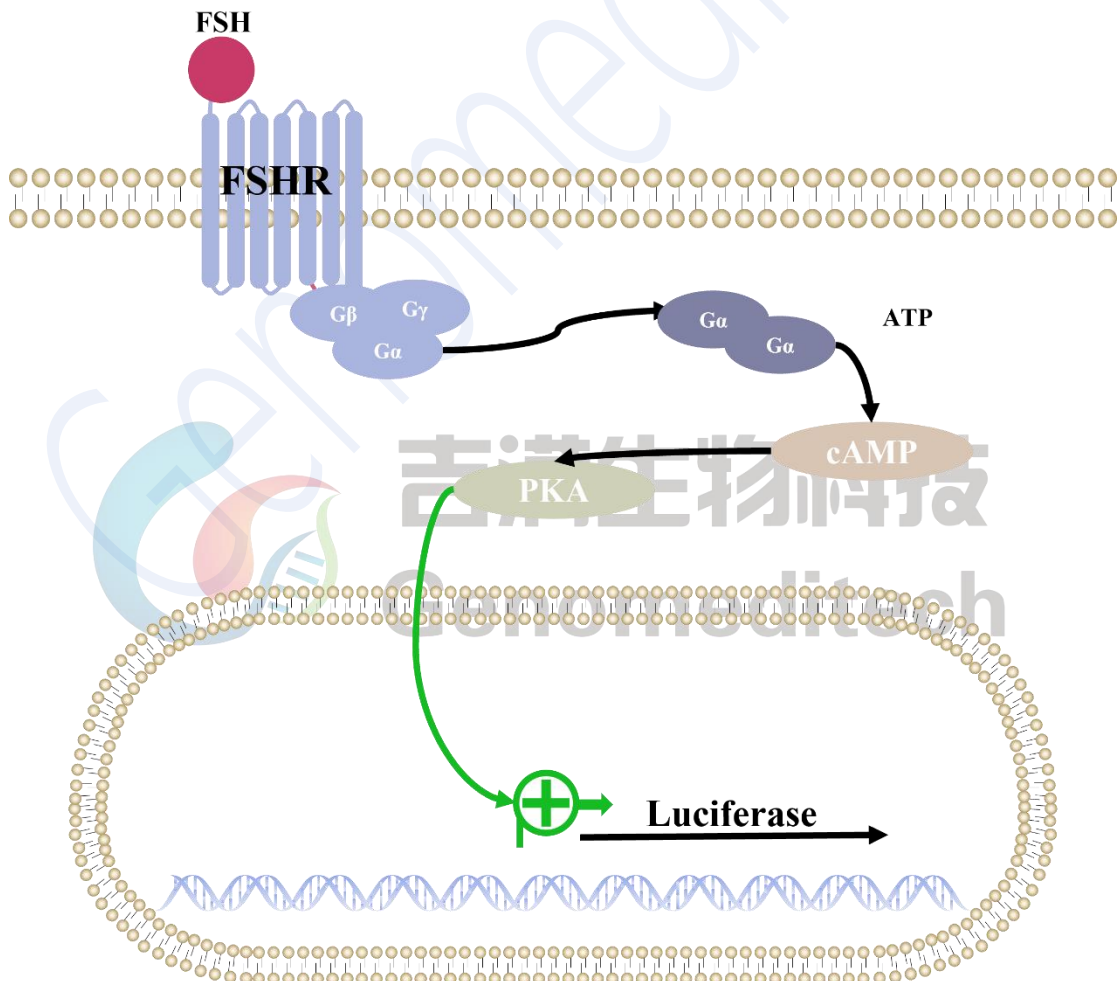


Fig 1.FSHR 原理图

## 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin+4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin
细胞冻存培养基:	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.
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	Cegrogen biotech/A0500-3010
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
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
Recombinant Human FSH (C-Flag,C-6His)	/	NOVOPROTEIN/CM28
Anti-FSHR hIgG1 Antibody(9H11)	/	Genomeditech/GM-50111AB

#### 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。**

## 六、使用方法

### 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\_FSHR Reporter CHO-K1 Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  Cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human FSH (25 kDa) (以下简称为 Human FSH) 作为阳性药物, Conc.01 浓度为 100 ng/mL, 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.10 分别排布在 B2-B11, B12 为 0 浓度对照。周围为 100  $\mu$ 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	Human FSH	PBS	100 ng/mL	25 ng/mL	6.25 ng/mL	1.56 ng/mL	390.63 pg/mL	97.66 pg/mL	24.41 pg/mL	6.1 pg/mL	1.53 pg/mL	381.47 fg/mL	0
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  $1.5 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加 100  $\mu$ L 细胞/孔至中间 12 个孔。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。
- 每个待测药物, 使用一行 (如 B2-B11)。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human FSH	0.1 mg/mL	0.01 mg/mL	取 2 $\mu$ L 储液+18 $\mu$ L Assay Buffer

- 96 孔 V 中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 145.2  $\mu$ L Assay Buffer, B3-B12 孔, 加入 110  $\mu$ 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 1.47  $\mu$ L Human FSH), 混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 36.7 $\mu\text{L}$ ，加入次孔											对照组
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.47 $\mu\text{L}$ Human FSH	加入	145.2 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$

- g) 从第 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 36.7  $\mu\text{L}$ ，加入到第 2 个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 10 个梯度稀释孔 (B11)。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 90  $\mu\text{L}$  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 6 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_FSHR Reporter CHO-K1 Cell Line	PBS Control	100 ng/mL	381.47 fg/mL
	523351	23893727	511704

## 3) 验证结果

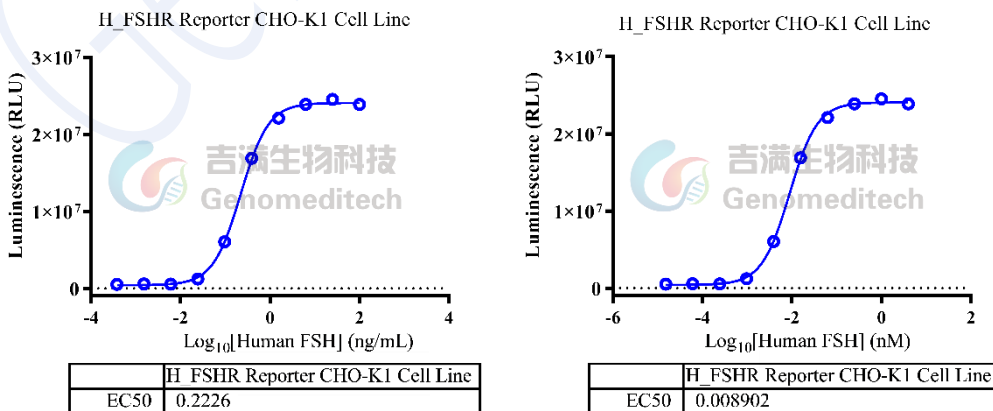


Fig 2.Human FSH 激活验证结果

(右图对药物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

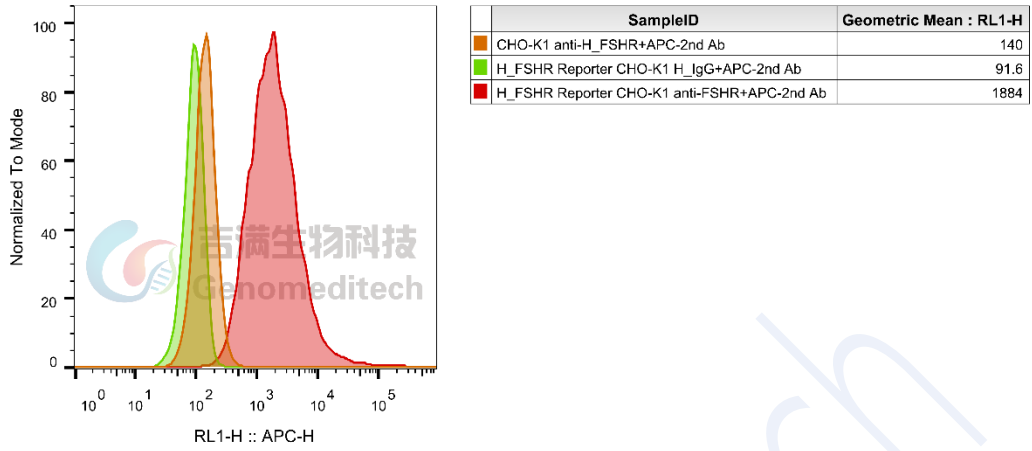


Fig 3.使用 Anti-H\_FSHR hIgG1 Antibody (Catalog # GM-50111AB) 检测结果

## 附录 2：稳定性结果

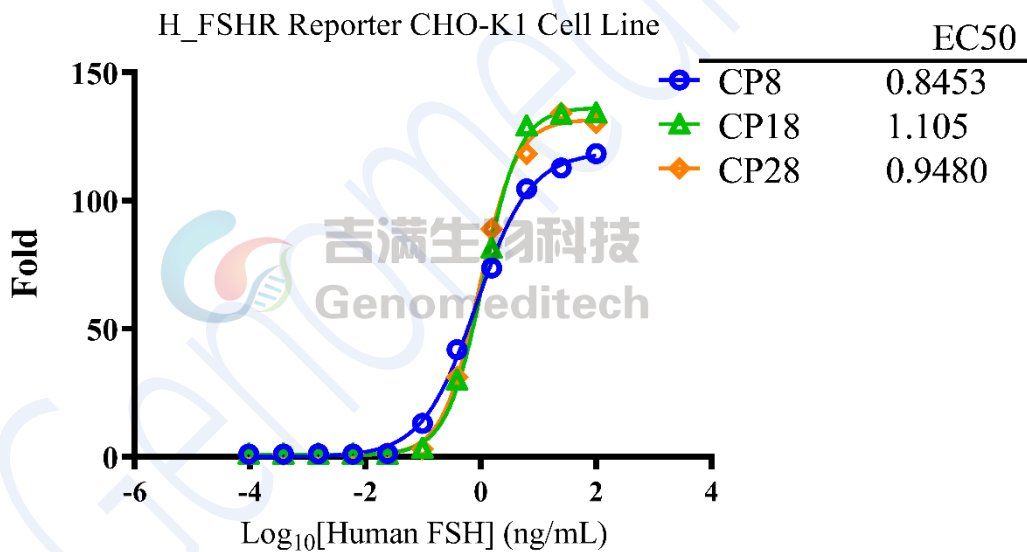


Fig 4. H\_FSHR Reporter CHO-K1 Cell Line (Genomeditech/GM-C25571) 的 P8、P18、P28 代次细胞使用 Recombinant Human FSH 验证结果

## 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