

GCGR/CRE-Luc/HEK293

CBP71345

操作说明书



4008-750-250

目录

1. 背景信息	1
2. 产品介绍	1
3. 细胞基本信息	2
4. 主要仪器试剂耗材	3
5. 细胞培养	3
5.1 细胞复苏	3
5.2 细胞传代	3
5.3 细胞冻存	4
6. 细胞实验流程	4
6.1 GCGR Stimulation Assay	4
7. 数据展示	5
8. 相关产品	5

1. 背景信息

胰高血糖素受体 (Glucagon receptor, GCGR) 是一种主要存在于肝细胞上的 G 蛋白偶联受体, 该受体与胰高血糖素激素结合, 可促进肝细胞分解糖原, 使血糖上升。在正常生理条件下, 高血糖时 α 细胞的胰高血糖素分泌受胰岛素等的抑制, 当血糖水平下降时, β 细胞分泌减少, 消除了对 α 细胞的抑制作用, 胰高血糖素分泌增加。现有研究表明, 在 1 型糖尿病 (T1DM) 和 2 型糖尿病 (T2DM) 中, 血浆胰高血糖素水平都过高, 胰高血糖素分泌不受控, 导致血糖稳态失效, 以及胰岛素分泌相对或绝对减少, 两者共同导致高血糖状态。胰高血糖素在正常生理状态下还可治疗低血糖症, 因此胰高血糖素受体药物是治疗糖尿病、肥胖和低血糖症的重要靶点。GCGR 蛋白属于 B 型 G 蛋白偶联受体, 胰高血糖素既可以激活肝细胞中的 GCGR-Gs 信号复合物, Gs 蛋白会与腺苷酸环化酶相互作用, 进而诱导第二信使环磷酸腺苷 (cAMP) 的产生和下游信号通路激活, 也可以激活 GCGR-Gq 信号复合物, 活化磷脂酶 C (PLC) 导致细胞内 Ca^{2+} 增加和蛋白激酶 C (PKC) 激活, 两者都能促进糖原分解和糖异生, 使血糖上升。

2. 产品介绍

科佰生物分别开发了 GCGR/CRE-Luc/HEK293 报告基因细胞, 在由调控因子调控并表达报告基因的重组细胞上, 稳定表达人 GCGR。见图 1 流式验证 GCGR 表达。

	Population Name	Mean , FL1-A
	GCGR / CRE-LUC / HEK293+anti-GCGR	5.25E4
	HEK293+anti-GCGR	671

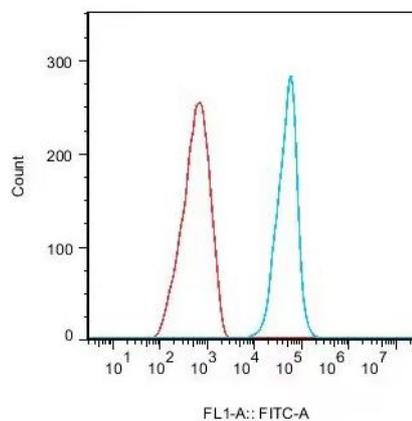


图 1: GCGR/CRE-Luc/HEK293 细胞表达人 GCGR

报告基因细胞模型可以很好的反映分子作用机制，同时具备更小的变异性和更好的可操作性，已被中检院及药企广泛应用于多肽，抗体等各类生物药活性的检定，对于药物研发、质量控制、批次放行都有重要意义。

GCGR/CRE-Luc/HEK293 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 GCGR 的信号转导过程，原理见图 2 所示。

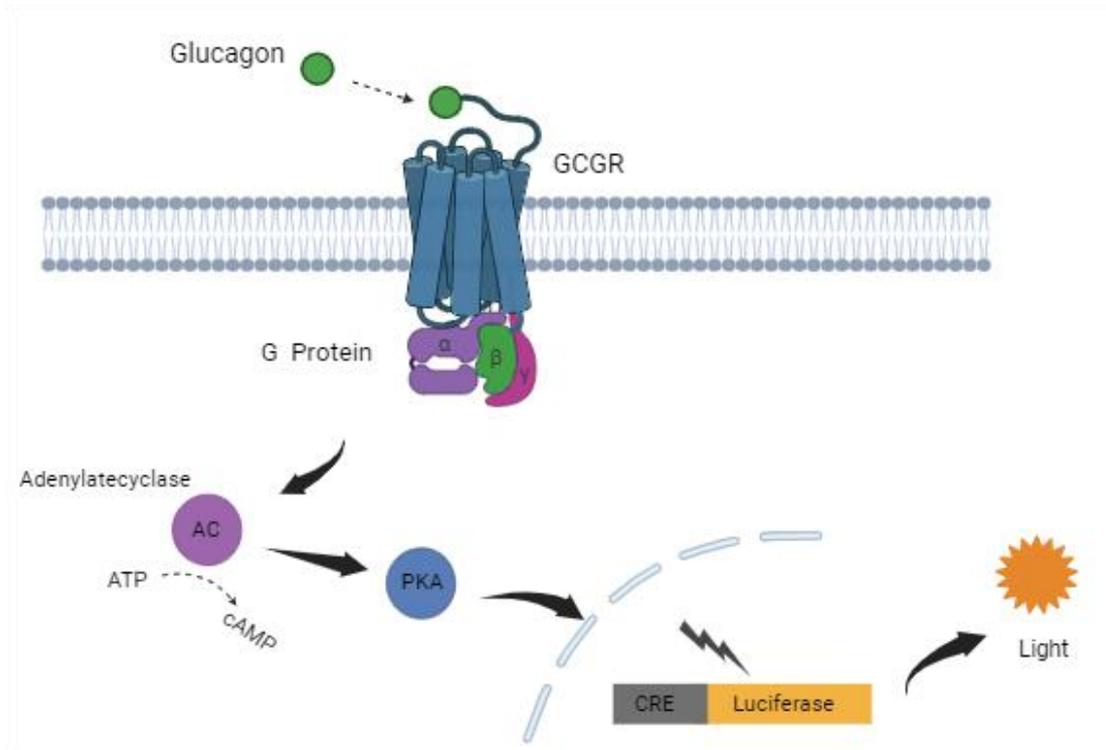


图 2: GCGR/CRE-Luc/HEK293 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

传代培养基: DMEM +10%FBS+2ug/ml puromycin+200ug/ml hygromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 贴壁

支原体检测: 阴性

稳定性: 32 代 (室内测试结果, 不表示超过 32 代以上不稳定)

保存条件: 液氮保存

应用: 细胞水平 GCGR 信号传导的激活剂的活性检测, 可用于高通量筛选或 QC 放行

4. 主要仪器试剂耗材

名称	品牌	货号
GCGR/CRE-Luc/HEK293 完全培养基	Cobioer	CBP71345M
GCGR/CRE-Luc/HEK293	Cobioer	CBP71345
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
Glucagon (1-29), bovine, human	MCE	HY-P0082
Ultra Luciferase Detection Kit	Cobioer	CBPH0001
Corning BioCoat Poly-D-Lysine Multiwell Plates 96-well	Corning	Cat.No.:Corning™356651
Synergy H1 多功能酶标仪	Biotek	/

5. 细胞培养

5.1 细胞复苏

- 1) 在 37°C 水浴中快速融化细胞约 60 秒。一旦细胞解冻（可能比 60 秒稍快或稍慢），快速将冻存管中的细胞吸入装有 10 ml 预热 GCGR/CRE-Luc/HEK293 完全培养基的 15ml 离心管中。
- 2) 1000 转、5 分钟离心细胞，除去培养基并将细胞重悬于 5 ml 预热的完全培养基中。
- 3) 加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中。
- 4) 复苏 24-36 小时左右换液或传代，将未贴壁的死细胞去掉。

5.2 细胞传代

- 1) 当细胞密度符合传代要求时，PBS 清洗细胞，加入 1ml 胰酶，消化细胞传代。当 80%以上细胞培养瓶轻轻晃动能脱落时，加培养基终止消化，吹打成单细胞，吸入 15ml 离心管，1000 转离心 5 分钟。
- 2) 离心后弃上清，加入新培养基吹打重悬细胞成单细胞，加入新的培养瓶中继续培养。

5.3 细胞冻存

每个 T75 或 10cm 培养皿的细胞消化离心后弃上清。加 2ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO), 吹打均匀, 加入 2 个细胞冻存管。立即放入细胞冻存盒(Nalgene 5100-0001), 加异丙醇到刻度线, 放-80°C 冰箱。24 小时后将冻存管转到液氮中长期保存。

6. 细胞实验流程

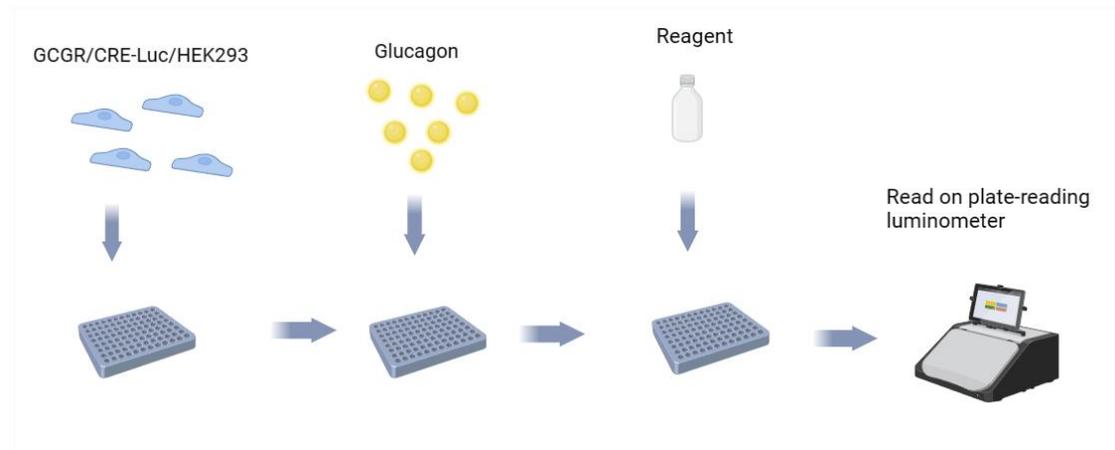


图 3: GCGR Bioassay 流程示意图

6.1 GCGR Stimulation Assay

- 1) 消化对数生长的 GCGR/CRE-Luc/HEK293, 将消化下来的细胞重悬于 DMEM+10%FBS 培养基中, 细胞密度调整为 $3 \times 10^5/\text{ml}$
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 PDL coating 96 孔细胞培养板中, 100ul/孔细胞悬液, 37 度培养箱过夜培养。
- 3) 用 DMEM+10%FBS 培养基对样品进行梯度稀释, 加入梯度稀释的 10^* 浓度样品 (11.1 ul/孔) 至接种好细胞的 96 孔板中, Glucagon 从 1000 nM (96 孔板内 1^* 最终浓度为 100 nM) 作为起始浓度, 以 4 倍稀释级向下稀释 11 个浓度梯度, 并设置 0 浓度阴性对照孔, 每个梯度对应的浓度均设置 2 个复孔, 继续于 37 度细胞培养箱中培养 5.5 至 6 小时。
- 4) 将 96 孔板从培养箱中取出, 加入 100ul/孔 Ultra Luciferase Detection Kit 检测试剂后并放置 3 分钟, 再放入酶标仪中读取数值。
- 5) 根据每个梯度浓度孔所对应的数值, 利用 Prism Graphpad5.0 软件拟合样品对细胞激活

的梯度曲线，并且计算样品的 EC50 以及 R2 值，(EC50 定义为细胞激活曲线最大值一半对应的样品浓度)，软件中曲线拟合公式如下：

6) $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope})})$

7. 数据展示

GCGR/CRE Luc Reporter - HEK293 Recombinant Cell Line (C21)

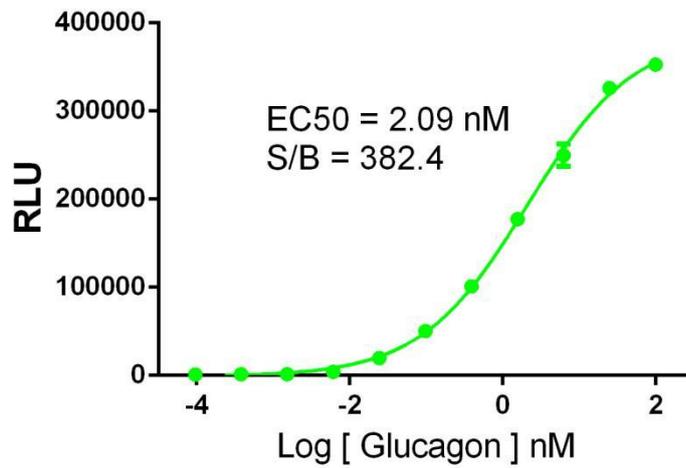


图 4: GCGR/CRE-Luc/HEK293 Recombinant Cell Line 验证结果

8. 相关产品

N/A