

GLP1R/CRE-Luc/HEK293

CBP71117

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	2
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	3
6. 细胞实验流程	3
6.1 GLP1R Stimulation Assay	4
7. 数据展示	5
8. 相关产品	5

1. 背景信息

GLP-1 受体 (GLP-1 Receptor, GLP-1R) 属于 G 蛋白偶联受体, 是 GLP-1 的特异性受体。人的 GLP-1R 基因位于第 6 号染色体上, 编码 463 个氨基酸。当与 GLP-1 结合后, GLP-1R 在胰岛 β 细胞中偶联 $G_{\alpha s}$ 蛋白, 激活腺苷环化酶, 促使 cAMP 在细胞内含量升高, 引起钙离子内流, 胰岛素原基因转录增加, 刺激血糖依赖性胰岛素的分泌。除此之外, GLP-1R 还可以通过激活 PI3K、MAPK 和 Ras/MAPK 信号通路来促进胰岛 β 细胞的增殖和分化。GLP-1R 能够通过调控 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 和蛋白复活因子 Bcl-2、Bcl-XL 等来抑制细胞凋亡。它表达于胰腺、中枢神经系统、心血管、胃肠道、肺、肾脏、甲状腺、皮肤、淋巴细胞、间充质干细胞等。在胰腺组织, 人胰岛 β 细胞正常高表达 GLP-1R, GLP-1 与其结合可促进胰岛素的合成与分泌, 同时也刺激 β 细胞增殖, 抑制其凋亡。

2. 产品介绍

科佰生物开发了 GLP1R/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 GLP1R。

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抗体药物生物活性的检定, 对于药物研发、质量控制、批次放行都有重要意义。

GLP1R/CRE-Luc/HEK293 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 GLP1R 的信号转导过程, 原理见图 1 所示。

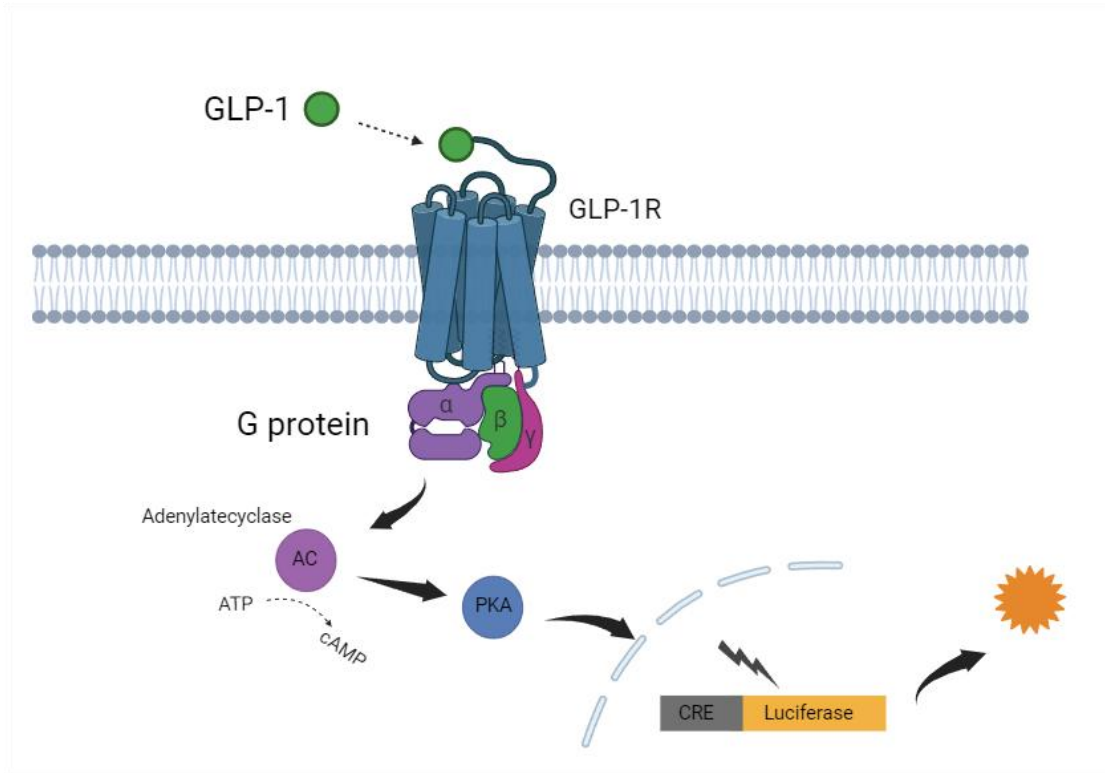


图 1: GLP1R/CRE-Luc/HEK293 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

传代培养基: DMEM+10%FBS+400ug/ml G418

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 GLP1R 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
GLP1R/CRE-LUC HEK293 完全培养基	Cobioer	CBP71117M
GLP1R/CRE-LUC HEK293	Cobioer	CBP71117
Glucagon-like peptide 1 (1-37), human TFA	MCE	HY-P1145A

细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
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 GLP1R/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

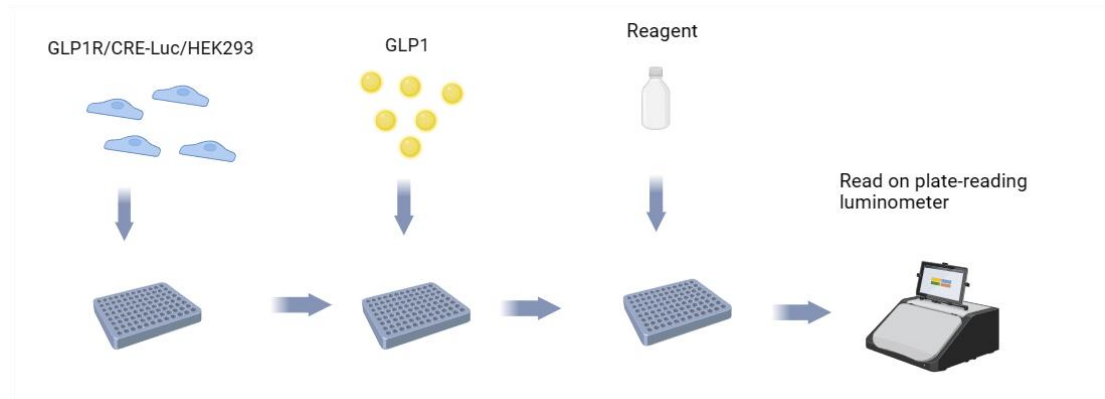


图 2: GLP1R Bioassay 流程示意图

6.1 GLP1R Stimulation Assay

- 1) 消化对数生长的 GLP1R/CRE-LUC HEK293, 将消化下来的细胞重悬于 MEM+10%FBS+NEAA+NaP 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 MEM+10%FBS+NEAA+NaP 培养基对 Glucagon-like peptide 1 (1-37), human TFA 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, 试验样品从 1000 nM (96 孔板内 1^* 最终浓度为 100 nM) 作为起始浓度, 以 10 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 至 6 小时。(注意: 样品浓度及梯度设置跟样品本身的特性及客户的实验需求高度相关, 客户应根据自身的实际情况优化设置, 我们不做具体推荐, 本梯度稀释方案仅适用我们本次验证实验涉及样本)
- 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 Graphpad 5.0 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:

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

7. 数据展示

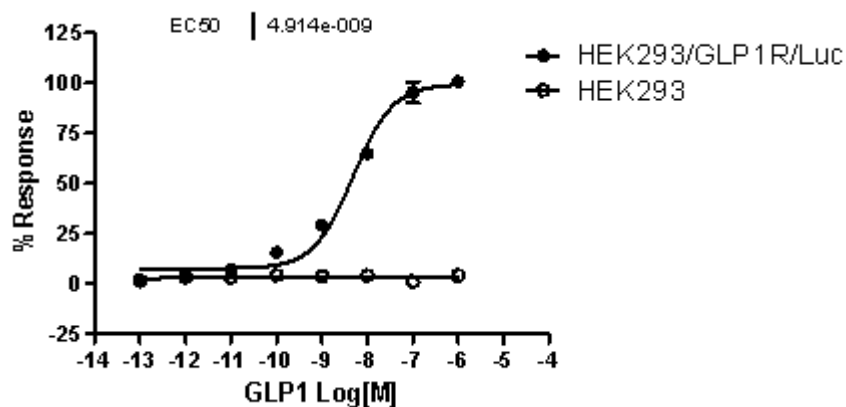


图 3: GLP-1 (7-37)-induced concentration-dependent stimulation of intracellular luciferase

in HEK293/GLP1R/Luc and HEK293 cells 验证结果

8. 相关产品

名称	货号
GLP1R/CHO	CBP71424
CYNO GLP1R/CHO	CBP71425
GLP1R/CRE-Luc/HEK293	CBP71117
GLP1R/CRE-Luc/BHK	CBP71405
GCGR/CRE-Luc/HEK293	CBP71345
GCGR/ β -Arrestin/CHO	CBP71422
GIPR/CRE-Luc/HEK293	CBP71346
GIPR/ β -Arrestin/CHO	CBP71421
KLB/SRE-Luc/HEK293	CBP74209