



产品使用说明书

Rhinogen[®] GLP-1R Reporter Bioassay

货号：RA-CK06



目 录

目 录	1
试剂包装与保藏条件	2
试剂包装	2
保藏条件	2
产品综述	3
背景	3
概述	3
特性	4
操作方法	5
用户自备实验材料	5
试剂	5
耗材及仪器	5
试剂配制	5
GLP-1R 报告基因测活细胞培养	6
培养须知	6
细胞复苏	6
细胞传代	6
细胞冻存	7
GLP-1R 报告基因测活细胞检测	8
操作简介	8
试剂准备	8
培养板检测孔布局设计	10
接种 GLP-1R 报告基因测活细胞	10
加入待检样品	11
加入荧光素酶分析试剂检测光信号	11
数据分析	11
相关产品	12
联系我们	13
参考文献	13

试剂包装与保藏条件

试剂包装 Rhinogen[®] GLP-1R Reporter Bioassay 包装规格如下:

组分	规格	货号
GLP-1R 报告基因测活细胞 (3×10^6 cells/ml)	1 × 1ml	RA-CK06

保藏条件 收到细胞后, 请立即将 GLP-1R 报告基因测活细胞冻存管转移至-140°C 以下的保存条件长期保存。若将细胞暂时保存在-80°C 冰箱, 保存时间请勿超过 2 周。

产品综述

背景

胰高血糖素样肽-1 受体 (Glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R) 是胰岛 β 细胞表面表达的一种 G 蛋白偶联受体。激活的 GLP-1R 通过对腺苷酸环化酶通路的刺激, 触发 cAMP 的生成, 通过 cAMP 反应元件 (cAMP response element, CRE) 激活下游基因表达, 从而促进胰岛素的合成及释放 (图 1)。GLP-1R 是 II 型糖尿病治疗性药物开发的关键靶点之一。目前用于针对 GLP-1R 药物 (包括胰高血糖素样肽-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) 类似物) 的活性测定方法主要有血糖测定实验、胰岛素分泌实验和 cAMP 测定实验。血糖测定实验和淀粉酶释放实验需做动物实验, 敏感性差, 线性关系不好, 仅能作为半定量实验; 而后面 2 种方法均需要昂贵的试剂盒和烦琐的 ELISA 检测步骤^[1]。

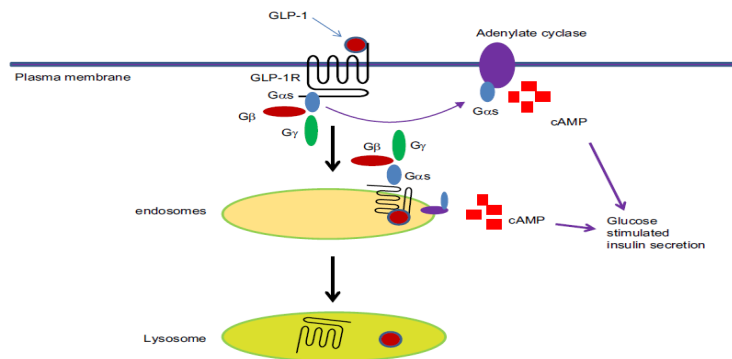


图 1. GLP-1R 信号通路^[2]

概述

Rhinogen[®] GLP-1R Reporter Bioassay 是一种生物发光报告基因检测方法, 其作用机理 (图 2) 基于 GLP-1R 反应的主要信号通路 cAMP/PKA 信号途径, 可用于糖尿病治疗性药物的高通量筛选。本系统采用工程改造的中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cells, CHO cells) 作为测活细胞, 该细胞株稳定表达 GLP-1R 以及由 CRE 反应元件驱动表达的萤火虫荧光素酶。在该细胞中, GLP-1R 的激活触发 cAMP 的产生, cAMP 则激活荧光素酶基因的表达, 而荧光素酶的活性通过生物发光进行定量。

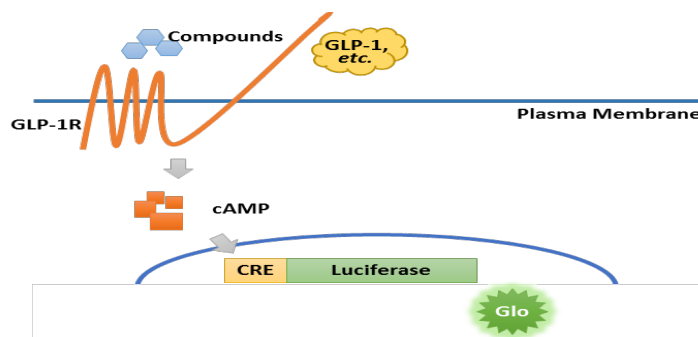


图 2. Rhinogen[®] GLP-1R Reporter Bioassay 原理图

特性

Rhinogen® GLP-1R 报告基因检测系统提供的 GLP-1R 药物生物学活性检测方法操作具有操作简便、变异性低、灵敏度高等特点。

原理明确：基于 GLP-1R 反应的主要信号通路 cAMP/PKA 信号途径

通量高：可在 96 孔、384 孔培养板中进行 GLP-1R 激动剂或者拮抗剂的高通量筛选、GLP-1 类似物筛选、药物高通量检测

快速易用：检测过程简单，检测试剂易用

信噪比高：信号/背景的比率高

Rhinogen® GLP-1R 报告基因检测系统的各项特性使得其可作为针对 GLP-1R 药物筛选及检测的有效手段。同时，该法可作为针对 GLP-1R 药物的生物学活性常规检测方法及批签发检测指标。

操作方法

用户自备实验材料

试剂	✓	DMEM/F12 培养基, 无酚红 (Rhinogen, Cat.# RA-BM12)
	✓	FBS
	✓	G418 (Rhinogen, Cat.# RA-AD02)
	✓	潮霉素 B (Hygromycin B) (Rhinogen, Cat.# RA-AD03)
	✓	0.25% Trypsin-EDTA (1×)
	✓	DMSO
	✓	PBS
	✓	台盼蓝溶液
	✓	荧光素酶分析试剂 (推荐使用 Bio-Turbo® One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒, Rhinobio, Cat. RA-GL03)
	耗材及仪器	✓
✓		96 孔稀释板
✓		冻存管
✓		单道或多道加样枪
✓		无菌 15ml 和 50ml 离心管
✓		无菌加样槽
✓		二氧化碳培养箱 (37°C、5% CO ₂)
✓		电热恒温水浴锅 (37°C)
✓		96 孔板化学发光检测仪器 (酶标仪)
试剂配制		✓
	✓	GLP-1R 检测缓冲液: 96% DMEM/F12 培养基 (无酚红), 4% FBS
	✓	细胞冻存培养基: 80% DMEM/F12 培养基, 10% FBS, 10% DMSO

GLP-1R 报告基因测活细胞培养

- 培养须知**
- ✓ 本产品含 1 支冻存的 GLP-1R 报告基因测活细胞，细胞密度为 3×10^6 cells/ml，冻存体积为 1ml，冻存培养基为 80% DMEM/F12 培养基，10% FBS，10% DMSO。
 - ✓ 请使用第 5 页方法进行 GLP-1R 报告基因测活细胞的复苏。
 - ✓ 避免剧烈的温度变化：收到干冰运输的冻存细胞后，如非立刻使用，则尽快将细胞转移至液氮罐中，复苏前，保证细胞已在液氮中保存 3-4 天。
 - ✓ 对于细胞的操作需要温和，避免剧烈的摇晃或吹打细胞。
 - ✓ 在开始检测实验前，请确保细胞已经进行冻存保种。保种时，请注意细胞代次，尽量以低代次细胞建库使用。
 - ✓ 冻存的细胞需要保存在 -140°C 以下环境直至使用。
 - ✓ 在进行细胞复苏及传代过程中，请使用预热培养基。

- 细胞复苏**
1. 将装有细胞的冻存管浸于 37°C 水浴，轻柔晃动 1-2min 快速融化细胞。
 2. 在超净工作台以 70%酒精消毒冻存管外周。
 3. 打开冻存管，轻柔的将细胞转移至装有 5ml 细胞生长培养基的无菌离心管中。
 4. 室温下 $125 \times g$ 离心 5min（更高速度离心会影响细胞活力），吸去上清，用 5ml 在 37°C 预热的细胞生长培养基重悬细胞，转入 T25 培养瓶中。
 5. 放入 37°C 、5% CO_2 培养箱培养。细胞代次记作第 1 代 (P1)。
重要：培养基请置于 37°C 、5% CO_2 培养箱至少 15min 使其 pH 平衡至中性后，再用于细胞的培养。在细胞复苏过程中，过度碱性的培养基会对细胞造成伤害。
注：细胞传代过程中，请严格记录细胞代次，每传代 1 次作为 1 个代次。
 6. 复苏 12h 内，观察细胞状态，判断是否需要更换培养基。
注：细胞复苏后需 1 周左右恢复期，细胞倍增率稳定后即可用于检测或冻存。传代时细胞活力一般在 90%以上。

- 细胞传代**
1. 显微镜下观察，当细胞铺板率达到 80-100%时，进行传代，每 2-4 天进行传代；
 2. 培养箱中取出培养瓶，弃去上清，然后加入 10ml 的 PBS，轻轻冲洗细胞，并去除 PBS；
 3. 根据培养瓶表面积加入 1~5ml 0.25% Trypsin-EDTA 到细胞培养瓶中（T25 培养瓶推荐使用 1~2ml，T75 培养瓶推荐使用 2~3ml，T175 培养瓶推荐使用 3~5ml），使其覆盖细胞；
 4. 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 1-3min；
 5. 轻轻拍打培养瓶，使细胞单层脱落，可观察到细胞开始滑落；
 6. 用 10ml 移液管向培养瓶中加入约 3 倍体积 0.25% Trypsin-EDTA 的细胞生长培养基，终止胰酶消化，轻柔吹打重悬细胞直至看不到细胞团聚物，并转移到 50ml 的离心管中，旋紧盖子；
 7. 将离心管置于离心机中，室温下 $125 \times g$ 离心 5min；
 8. 弃去上清，并加入适量体积的细胞生长培养基重悬细胞；
 9. 细胞计数并按照接种密度为 $1-2 \times 10^5$ cells/mL 进行传代；
 10. 选择 T25、T75 或 T175 细胞培养瓶，于 37°C 、5% CO_2 培养箱中继续培养至满足实验需求。

细胞冻存

1. 确定细胞密度及活力。
 2. 转移细胞悬液至 50ml 离心管，室温 $125\times g$ 离心 5min 收集细胞。
 3. 以适当体积的预冷细胞冻存培养基重悬细胞，使细胞密度达到 3×10^6 cells/ml。
 4. 每管 1ml 细胞悬液分装于冻存管中。
 5. 将冻存管置于适当的容器中 -80°C 冰箱过夜缓慢降温。
 6. 将冻存管转移至 -140°C 冰箱或者液氮中保存。
-

GLP-1R 报告基因测活细胞检测

- 操作简介**
- ✓ 以举例的方法来说明如何操作 GLP-1R 报告基因测活细胞进行检测。
 - ✓ 下面将在 96 孔板中检测 2 个待检样品，每个样品均为 9 个浓度稀释点，每浓度 3 复孔。
 - ✓ 针对不同样品，检测条件可调整优化，主要为接种细胞数目、样品浓度范围及梯度、诱导时间。
 - ✓ 样品浓度范围及梯度调整可参考本说明书第 7 页“梯度稀释待检样品”部分内容
 - ✓ 诱导时间可在 2-24h 调整。
 - ✓ 加样顺序为 GLP-1R 测活细胞株→待测样品→荧光底物试剂（图 3）。
 - ✓ 建议针对您的检测系统进行优化以获得最佳数值。

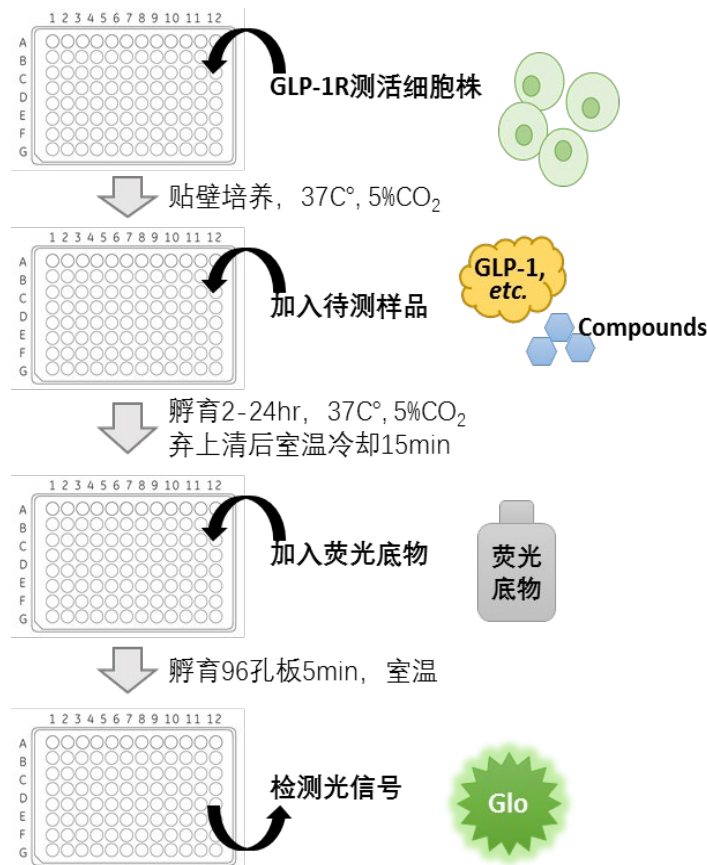


图 3. Rhinogen® GLP-1R Reporter Bioassay 检测流程图

试剂准备

1. 荧光素酶分析试剂

按照试剂盒说明书进行。如果使用推荐的 Bio-Turbo® One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒，则按照以下流程进行：

- 1) 实验当天提前 4-6h 将荧光素酶反应缓冲液及荧光素酶反应底物取出，解冻并平衡至室温。
- 2) 用移液枪取出少量荧光素酶反应缓冲液至装有荧光素酶反应底物的棕色西林瓶中，反复吹吸几次以溶解底物干粉。将溶解后的底物溶液转回至荧光素酶反应缓冲液的棕色瓶中，重复上述步骤多次，确保底物完全转移至缓冲液中，轻柔颠倒混合直至完全溶解，室温（22-25℃）避光保存，待用。

3) 根据实验需要, 取适量体积 Bio-Turbo® One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂与 DMEM/F12 无酚红培养基 1:1 混合, 现配现用。

2. 检测缓冲液

检测当天将适量 GLP-1R 检测缓冲液提前预热至 37°C。一般 2 块 96 孔板的检测, 预热 35-50ml 检测缓冲液已足够使用。

3. 梯度稀释待检样品

若无相关数据参考, 可选用 5 μ g/ml 作为起始浓度, 2 倍比稀释数个梯度后进行检测, 根据实验结果再调整样品工作浓度范围。

实验当日上午, 进行待检样品稀释:

1) 依次将一定体积的待检样品采用适量的 DMEM/F12 培养基 (无酚红) 在 1.5ml 离心管中稀释至 5 μ g/ml (记为 dilu1)。

2) 后续稀释过程按照稀释表格 (表 1) 在 1.5ml 离心管中进行逐级稀释。稀释好的样品可按照图 4 排布, 150 μ l/孔, 加至 96 孔板中。

注: 96 孔板中稀释样品的排布根据检测时孔板布局变化。

表 1. 待检样品稀释梯度表

稀释代号	稀释步骤	抗体浓度 (ng/ml)
dilu1	根据样品浓度进行稀释	5000
dilu2	500 μ l dilu1 + 500 μ l GLP-1R 检测缓冲液	2500
dilu3	500 μ l dilu2 + 500 μ l GLP-1R 检测缓冲液	1250
dilu4	500 μ l dilu3 + 500 μ l GLP-1R 检测缓冲液	625
dilu5	500 μ l dilu4 + 500 μ l GLP-1R 检测缓冲液	312.5
dilu6	500 μ l dilu5 + 500 μ l GLP-1R 检测缓冲液	156.255
dilu7	500 μ l dilu6 + 500 μ l GLP-1R 检测缓冲液	78.125
dilu8	500 μ l dilu7 + 500 μ l GLP-1R 检测缓冲液	39.0625
dilu9	500 μ l dilu8 + 500 μ l GLP-1R 检测缓冲液	19.53125

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
待检样品 1	B dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
C	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
D	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
待检样品 2	E dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
F	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
G	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9			
H												

图 4. 96 孔板中稀释样品排布图

培养板检测孔布局设计

检测板的排布有 2 种形式供您选择，一种为图 5 所示的常规形式，另一种为图 6 所示的随机排布形式。其中图 5 排布形式方便操作；图 6 排布形式可降低位置效应带来的孔间差异。

孔板在 37°C、5% CO₂ 培养箱中放置时，建议在孔板上下叠加辅助板，以避免与金属托盘直接接触，减少孔间差异。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
待检样品 1	B	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9	NTC	
	C	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
	D	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
待检样品 2	E	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9	BG	
	F	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
	G	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
	H											

图 5. 检测板排布（常规）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
待检样品 1	B	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9	NTC	
	C	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
	D	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
待检样品 2	E	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9	BG	
	F	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
	G	dilu1	dilu2	dilu3	dilu4	dilu5	dilu6	dilu7	dilu8	dilu9		
	H											

图 6. 检测板排布（随机）

注：NTC，Negative control，阴性对照；BG，Background，背景；黄色标记孔和蓝色标记孔为不同待检样品检测孔。

接种 GLP-1R 报告基因测活细胞

1. 细胞准备：参照细胞传代（本说明书第6页“细胞传代”）操作步骤，终止消化后离心弃去上清，用10ml GLP-1R检测缓冲液轻柔吹打5~8次重悬制成单细胞悬液；
2. 细胞计数：取细胞悬浮液600μl，用细胞计数仪计数。根据实验需求，若细胞活率≥90%，活细胞密度满足要求则进行细胞接种；若不满足细胞活率和密度要求则继续传代培养或重新复苏细胞；
3. 根据计数结果，用预热的GLP-1R检测缓冲液将细胞密度调整为 $5 \pm 0.5 \times 10^5$ cells/ml；
4. 取96孔白板进行接种。用多通道移液器向96孔白板B-G行的2-11列中每孔

加入100 μ l的细胞悬液（图5所示NTC及黄色、蓝色标记孔，每孔的细胞个数为50000，BG标记孔不接种细胞）。100 μ l GLP-1R检测缓冲液加入孔板内的背景孔（BG）中。96孔白板的其余空白孔每孔加入280 μ l的无菌水，盖上96孔板盖；

5. 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂培养箱中培养，孵育18 \pm 2h。

注意：接种时，枪尖贴壁加液，轻柔加入，减少对 GLP-1R 测活细胞株的损伤。

加入待检样品

将各稀释梯度待检样品加至已接种 GLP-1R 测活细胞株的孔板中，每孔 100 μ l，每个测量点 3 复孔。以 100 μ l DMEM/F12 培养基（无酚红）代替待检样品，加至阴性对照孔（NTC）及背景孔（BG）中。将完成加样的 96 孔板置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 4h。

加入荧光素酶分析试剂检测光信号

1. 将检测板从培养箱中取出，每孔弃去全部上清后，放置于室温（22-25 $^{\circ}$ C）中，平衡至少 15min。
2. 用排枪将配制好的底物试剂（Bio-Turbo[®] One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂与 DMEM/F12 无酚红培养基 1:1 混合），加至所有检测孔中（含 NTC 及 BG 孔），100 μ l/孔，避免产生气泡。

注：底物试剂必须平衡至室温后再加入。

3. 室温孵育 2-5min。
4. 将孔板放入 96 孔板化学发光检测仪器中检测光信号。

数据分析

1. 计算平均背景值。
2. 计算诱导倍数（Fold of induction, FI）=（诱导孔数值-背景值）/（阴性对照孔数值-背景值）

注：计算诱导倍数时，如果样本数值高于背景值 100 倍以上，则不必减去背景值。

3. 以具有拟合曲线功能的软件制作图形数据，采用四参数方程进行拟合分析，计算样品的 EC₅₀ 数值。数据纵坐标为光信号值或诱导倍数，横坐标为样品浓度的对数值（Log₁₀）。

相关产品

产品名称	货号
ADCC Reporter Bioassay, Core Kit	RA-CK01
ADCC Reporter Bioassay, Complete (Raji)	RA-CK02
ADCC Reporter Bioassay, Complete (WIL2-S)	RA-CK03
ADCC Reporter Bioassay, Complete (BT474)	RA-CK04
ADCC Reporter Bioassay, Complete (A431)	RA-CK05
潮霉素 B (Hygromycin B) 50mg/ml, 1ml	RA-AD03
博来霉素 (Zeocin) 100mg/ml, 1ml	RA-AD05

联系我们

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- ✓ 电 话: [0512-87663137](tel:0512-87663137)
 - ✓ 技术支持: techserv@rhinobio.com
-

参考文献

1. 于雷, 范文红, 王兰, 周长明, 王军志, 饶春明. 报告基因法检测促胰岛素分泌肽融合蛋白生物学活性. 药物分析杂志Chin J Pharm Anal2016, 36(3): 426-431
 2. Ramya S. Kuna et al., Glucagon-like peptide-1 receptor-mediated endosomal cAMP generation promotes glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013, 305: E161-E170.
-

RHINO BIO



上海瑞诺生物科技有限公司
苏州瑞特佰生物科技有限公司
网 址: www.rhinobio.com
电 话: 0512-87663137
邮 箱: techserv@rhinobio.com



公众号



联系客服

