

产品手册

H_ACVR2B Reporter DDX35™ Cell Line

H_ACVR2B Reporter DDX35™细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.1

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、	传代稳定性.....	5
1.	功能验证结果.....	5
2.	流式验证结果.....	7
五、	材料准备.....	8
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	8
2.	试剂耗材准备.....	8
六、	细胞复苏、传代、冻存.....	9
1.	细胞复苏.....	9
2.	细胞传代（以 10 cm 皿为例）.....	9
3.	细胞冻存.....	9
七、	使用方法（示例）.....	10
1.	激活实验.....	10
1)	加样步骤.....	10
2)	报告基因检测.....	11
3)	验证结果.....	11
2.	抑制实验.....	12
1)	加样步骤.....	12
2)	报告基因检测.....	13
3)	验证结果.....	14
附录：	测序结果.....	14
相关产品.....		15
使用许可协议：.....		16

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-C39211	H_ACVR2B Reporter DDX35™ Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C39211	H_ACVR2B Reporter DDX35™ 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

激活素 II 型受体(ActRII)包括 ActRIIA (ACVR2A)和 ActRIIB(ACVR2B)两种不同受体, 它们属于转化生长因子 β (TGF- β) 受体家族的成员, 是包括活化素 A(Activin A)和活化素 B(Activin B)及 BMP7、BMP9、BMP10、GDF1、GDF8(myostatin)、 GDF11 和 Nodal 在内的其他 TGF- β 家族成员的 II 型号受体。ALK4 和 ALK7 分别是活化素 A 和活化素 B 的主要 I 型 TGF- β 受体家族成员。Bimagrumab 是一种人源单克隆抗体, 可阻断激活素 II 型受体 (ActRII), 从而对骨骼肌生长进行调节。

吉满生物 H_ACVR2B Reporter DDX35™ Cell Line 是基于 ACVR2A Knockout 细胞构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。将 ACVR2A 基因敲除, 因此 Activin A 等蛋白只能结合 ACVR2B 激活下游信号通路。通过加入特定的拮抗型抗体, 阻断由此激活的下游信号通路, 随后, 通过测定荧光信号确定荧光素酶 (Luciferase) 的表达, 间接评估拮抗剂对信号通路的影响程度。该细胞系经多轮单克隆筛选, 兼具高稳定性、高灵敏度与高信噪比, 适用于批量建库、药物放行检测及标准化实验流程。

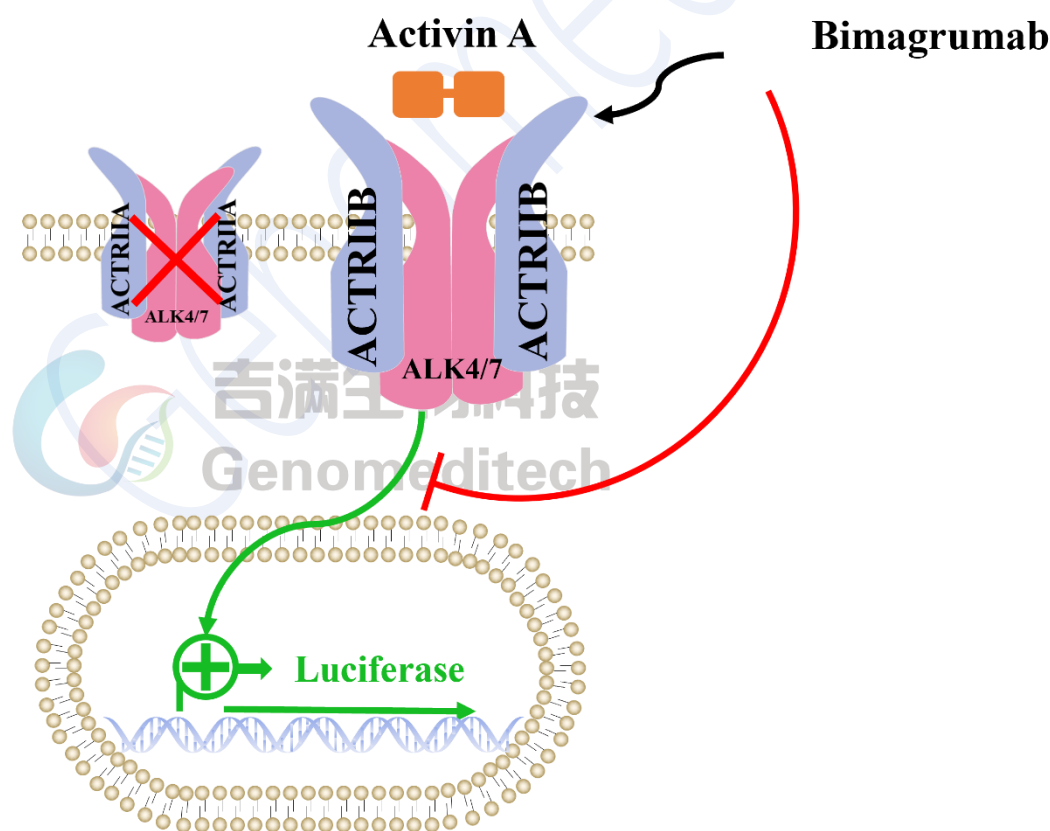


Fig 1. 信号通路图

四、 传代稳定性

1. 功能验证结果

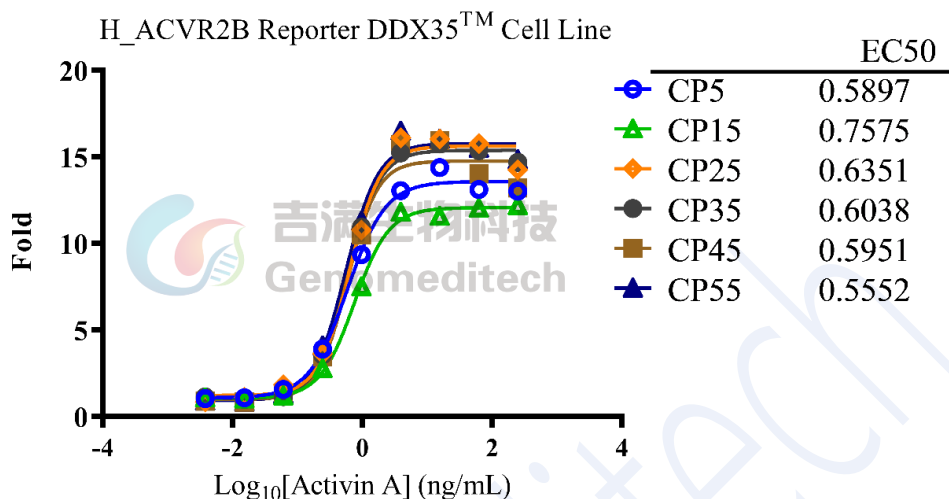


Fig 2. 制备 Human Activin A Protein; His Tag (Genomeditech/# GM-87616RP) 梯度稀释液; 提前 16-24 h 配置 H_ACVR2B Reporter DDX35TM Cell Line (Genomeditech/# GM-C39211), 每孔细胞量 1.5×10^4 个。将过夜培养的细胞吸弃上清, 加入稀释好的 Human Activin A Protein, 孵育 6 h 后检测 Luciferase 数值, 使用 GraphPad 系统进行数据分析, 纵坐标转换为倍率。结果显示, 不同代次间倍率、EC50 数值稳定。

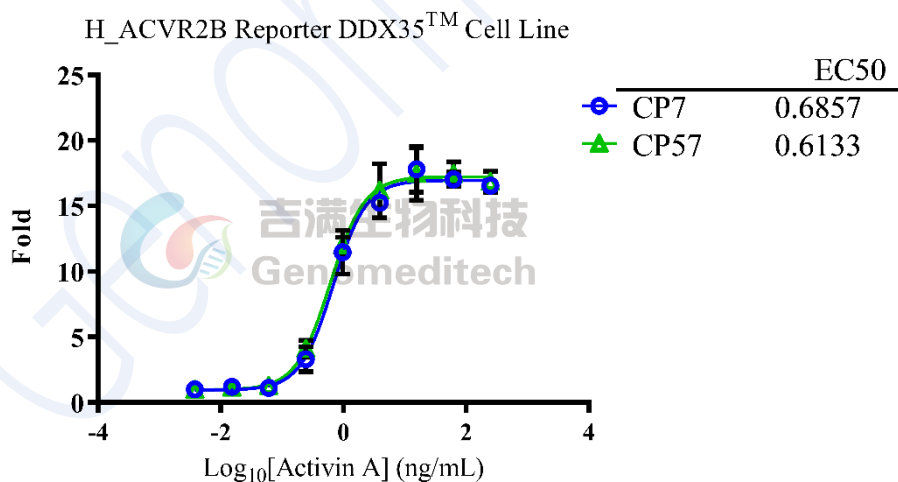


Fig 3. 制备 Human Activin A Protein; His Tag (Genomeditech/# GM-87616RP) 梯度稀释液; 提前 16-24 h 配置 H_ACVR2B Reporter DDX35TM Cell Line (Genomeditech/# GM-C39211), 每孔细胞量 1.5×10^4 个。将过夜培养的细胞吸弃上清, 加入稀释好的 Human Activin A Protein, 3 复孔, 孵育 6 h 后检测 Luciferase 数值, 使用 GraphPad 系统进行数据分析, 纵坐标转换为倍率。结果显示, P7 代与 P57 代倍率、EC50 数值稳定。

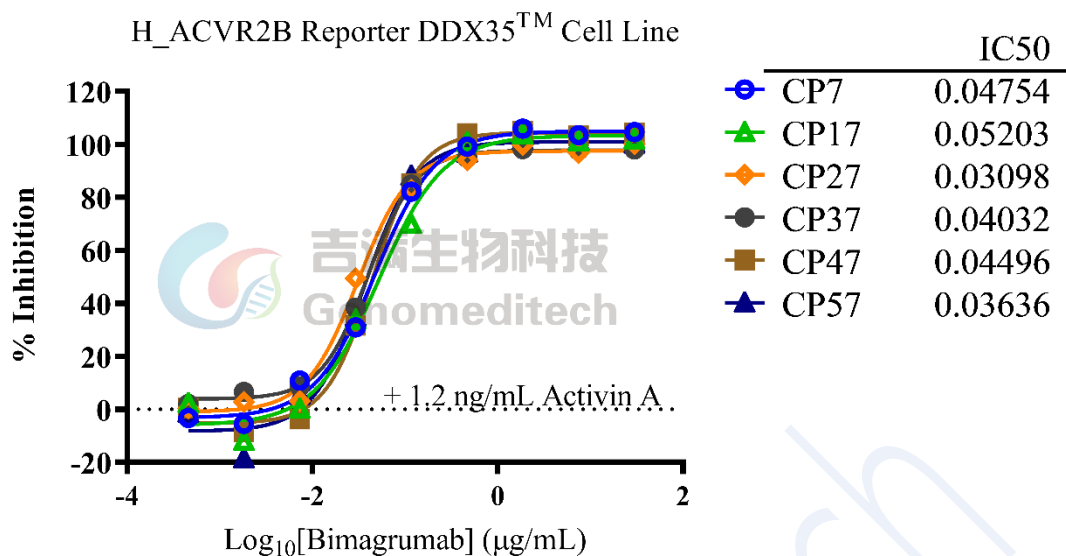


Fig 4. 制备 Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Bimagrumb) (Genomeditech/# GM-51148AB) 梯度稀释液; 提前 16-24 h 配置 H_ACVR2B Reporter DDX35TM Cell Line (Genomeditech/# GM-C39211), 每孔细胞量 1.5×10^4 个。将过夜培养的细胞吸弃上清, 先加入稀释好的 Bimagrumb 溶液 50 μ L 孵育 1h, 然后在加入稀释好的 Human Activin A Protein 溶液 50 μ L, 继续孵育 6 h 后检测 Luciferase 数值, 使用 GraphPad 系统进行数据分析, 纵坐标转换为倍率。结果显示, 不同代次间倍率、EC50 数值稳定。

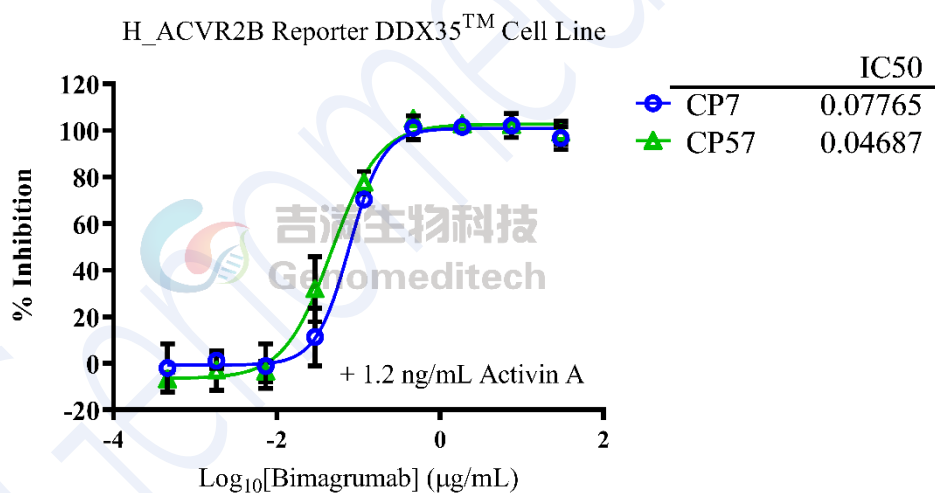


Fig 5. 制备 Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Bimagrumb) (Genomeditech/# GM-51148AB) 梯度稀释液; 提前 16-24 h 配置 H_ACVR2B Reporter DDX35TM Cell Line (Genomeditech/# GM-C39211), 每孔细胞量 1.5×10^4 个。将过夜培养的细胞吸弃上清, 先加入稀释好的 Bimagrumb 溶液 50 μ L 孵育 1h, 然后在加入稀释好的 Human Activin A Protein 溶液 50 μ L, 3 复孔, 继续孵育 6 h 后检测 Luciferase 数值, 使用 GraphPad 系统进行数据分析, 纵坐标转换为倍率。结果显示, P4 代与 P54 代倍率、EC50 数值稳定。

2. 流式验证结果

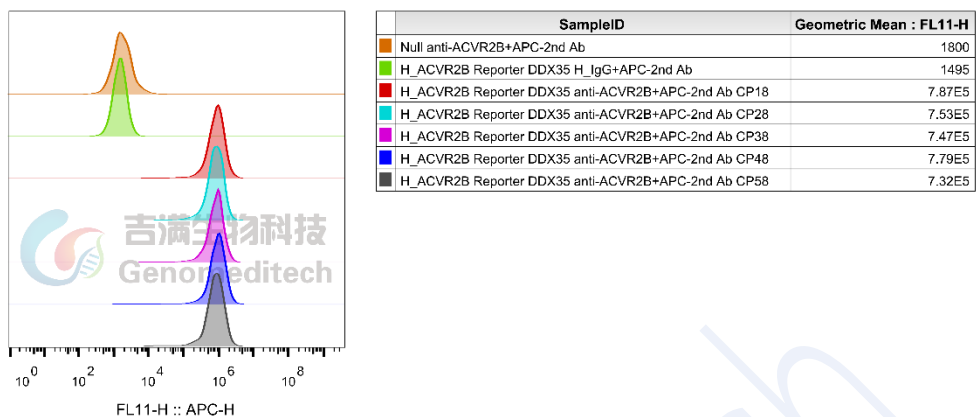


Fig 6.使用 Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Fab-17G05) (Genomeditech/GM-82350AB)流式稳定性验证结果

五、 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+125 µg/mL Hygromycin
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.
DMEM	500 mL	gibco/C11995500BT
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Hygromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040403-1
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 Microplate	96-well	Corning/3912
Human Activin A Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-87616RP
Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Bimagrumab)	/	Genomeditech/GM-51148AB
Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Fab-17G05)	25 Tests	Genomeditech/GM-82350AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

六、 细胞复苏、传代、冻存

1. 细胞复苏

注：为确保最高存活率，应在收到冻存细胞后立即解冻并复苏培养。如果在收到细胞后需要继续储存，将其置于液氮罐中，严禁储存在-70℃，因为在-70℃下储存会导致活性丧失。

- 37℃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℃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 5 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。
- 通过补充复苏培养基的形式，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 5×10^6 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℃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。

- 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，当细胞密度达到 80%，需要进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 天传代。注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- 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℃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， $176 \times g$ 室温离心 3 min。

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。
- 注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- FBS 需 56℃加热 30 分钟，可灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

七、 使用方法（示例）

1. 激活实验

操作步骤可根据示例调整优化, 对于本次实验, 推荐 H_ACVR2B Reporter DDX35™ Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Human Activin A Protein; His Tag (45 kDa; 以下简称 Activin A) 作为阳性药物, Conc.01 浓度为 250 ng/mL, 4 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	Activin A	250.00 ng/mL	62.50 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 pg/mL	15.26 pg/mL	3.81 pg/mL	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。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测抗体, 使用一行 (如 B2-B10)。
- 母液准备

药物名称	储液	母液	配置方法
Activin A	1.2 mg/mL	0.012 mg/mL	取 2 μ L 储液+198 μ L Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 160 μ L Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 120 μ L 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 3.4 μL Activin A），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 40 μL ，加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3.4 μL Activin A	加入	160 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	

- g) 从第一个稀释孔 B2 中吸取 40 μL ，加入到第二个稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10）。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。
- j) 加入梯度稀释好的药物，100 μL 每孔。
- k) 盖上班盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 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_ACVR2B Reporter	0 $\mu\text{g/mL}$	250.00 ng/mL	3.81 pg/mL
DDX35 TM Cell Line	53158	641564	49484

3) 验证结果

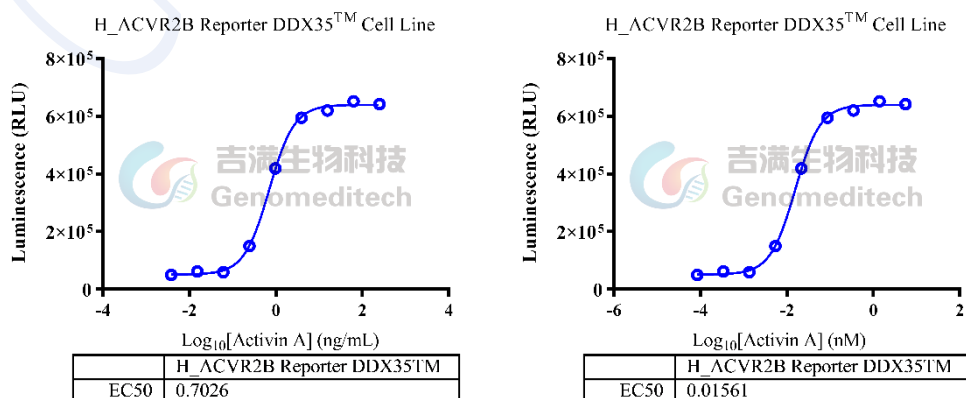


Fig 7.验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. 抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_ACVR2B Reporter DDX35™ Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。使用 Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Bimagrumab) (以下简称为 Bimagrumab;150 kDa)作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围为 100 μL 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	
B	Bimagrumab	PBS	30 μg/mL	7.5 μg/mL	1.88 μg/mL	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.3 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 pg/mL	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 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Bimagrumab	4.022 mg/mL	/	直接使用储液
Activin A	1.2 mg/mL	0.012 mg/mL	取 2 μL 储液+198 μL Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 80 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 60 μL 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 1.21 μL Bimagrumab），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 20 μ L, 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.21 μ L Bimagrumab	加入	80 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	60 μ L	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 20 μ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 混匀。
- h) 以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10)。
- i) 配置 2 $\times$ 激活剂: 2.4 ng/mL Activin A (0.13 μ L 0.012 mg/mL Activin A 母液加入到 652 μ L Assay Buffer 中, 混匀后使用)。
- j) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出, 吸弃上清。然后加入梯度稀释的抗体溶液, 每孔加入 50 μ L 混匀, 盖上盖板放入培养箱孵育 1 h。
- k) 1 h 后取出步骤 j 孵育好的混合溶液孔板, 然后每孔各加入 50 μ L 的 Activin A 蛋白溶液。盖上盖板, 继续孵育 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_ACVR2B Reporter DDX35™ Cell Line	0 μ g/mL	30 μ g/mL	457.76 pg/mL
	362268	70375	371257

3) 验证结果

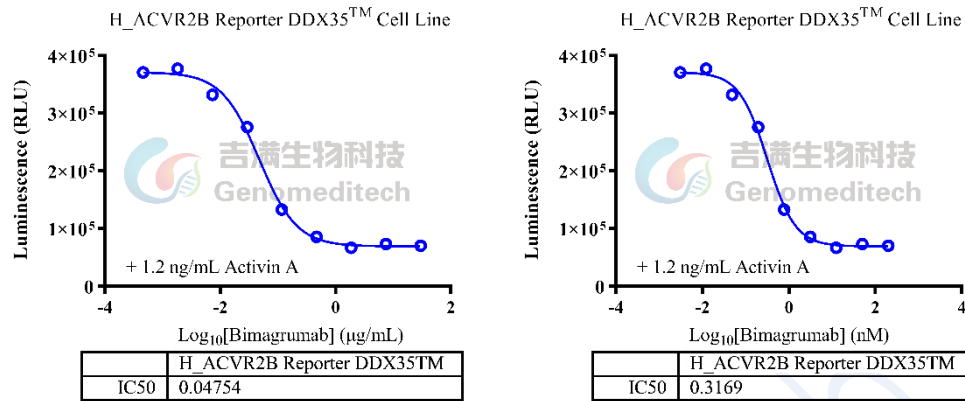


Fig 8. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

附录：测序结果



Fig 9. Sanger 测序结果显示，母细胞中 ACVR2A 敲除成功

相关产品

GCGR	
H_GCGR Reporter CHO-K1 Cell Line	H_GCGR Reporter HEK-293 Cell Line
H_GCGR Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line	Cynomolgus_GCGR HEK-293 Cell Line
H_GCGR CHO-K1 Cell Line	H_GCGR HEK-293 Cell Line
Mouse_GCGR HEK-293 Cell Line	
Anti-H_GCGR hIgG2 Antibody(volagidemab)	
GLP1R	
H_GLP1R Reporter CHO-K1 Cell Line	H_GLP1R Reporter HEK-293 Cell Line
H_GLP1R Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line	H_GLP1R β -Arrestin Reporter CHO-K1 Cell Line
Cynomolgus_GLP1R GIPR CHO-K1 Cell Line	Cynomolgus_GLP1R HEK-293 Cell Line
H_GLP1R CHO-K1 Cell Line	H_GLP1R GIPR CHO-K1 Cell Line
H_GLP1R HEK-293 Cell Line	Mouse_GLP1R GIPR CHO-K1 Cell Line
Mouse_GLP1R HEK-293 Cell Line	
Anti-GLP1R hIgG1 Antibody(mAb-36986)	Anti-H_GLP1R hIgG1 Antibody(glutazumab)
FGFR1	
H_FGF21 Reporter HEK-293 Cell Line	
Human FGF-21 Protein; His Tag	
CALCA(CGRP):CALCRL RAMP	
H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 Cell Line	H_CALCRL RAMP1 Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line
Cynomolgus_CALCRL RAMP1 HEK-293 Cell Line	H_CALCRL RAMP1 CHO-K1 Cell Line
H_CALCRL RAMP1 HEK-293 Cell Line	
Anti-CALCRL RAMP1 hIgG2 Antibody(Erenumab)	
GIPR	
H_GIPR Reporter CHO-K1 Cell Line	H_GIPR Reporter HEK-293 Cell Line
H_GIPR Reporter HEK-293 DDX35TM Cell Line	Cynomolgus_GIPR CHO-K1 Cell Line
Cynomolgus_GIPR HEK-293 Cell Line	H_GIPR CHO-K1 Cell Line
H_GIPR HEK-293 Cell Line	Mouse_GIPR CHO-K1 Cell Line
Mouse_GIPR HEK-293 Cell Line	
Anti-H_GIPR hIgG1 Antibody(AMG-133)	
ACVR2A:ACTRIIB:Active A	
ACVR2A KO HEK-293 Cell Line	Activin A Reporter Cell Line
BRE Reporter 293 Cell Line	H_ACVR2A Reporter Cell Line
H_ACVR2B Reporter Cell Line	ACVR2B KO HEK-293 Cell Line
H_ACVR2A HEK-293(ACVR2B KO) Cell Line	H_ACVR2B CHO-K1 Cell Line
H_ACVR2B HEK-293(ACVR2A KO) Cell Line	
Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Bimagrumab)	Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Fab-17G05)
Anti-ACVR2B mIgG2a Antibody(Bimagrumab)	Anti-H_ACVR2B hIgG1 Reference Antibody(Bimbio)
Biotinylated Human ACVR2A Protein; His-Avi Tag	Biotinylated Human ACVR2B Protein; His-Avi Tag

Biotinylated Mouse ACVR2A Protein; His-Avi Tag	Biotinylated Mouse ACVR2B Protein; His-Avi Tag
Human Activin A Protein; His Tag	Human Activin A Protein; His Tag (CHO)
Human Activin B Protein; His Tag	Human ACVR2A Protein; hFc Tag
Human ACVR2A Protein; hFc Tag (Sotatercept)	Human ACVR2A Protein; His Tag
Human ACVR2B Protein; hFc Tag	Human ACVR2B Protein; His Tag
Human latent GDF-8 Protein; His Tag	Mouse ACVR2A Protein; His Tag
Mouse ACVR2B Protein; His Tag	
AMY:CALCR RAMP	
H_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter CHO-K1 Cell Line	H_CALCR RAMP3(AMY3) β -Arrestin Reporter CHO-K1 Cell Line
H_CALCR Reporter CHO-K1 Cell Line	H_CALCR β -Arrestin Reporter CHO-K1 Cell Line
Rat_CALCR RAMP3(AMY3) Reporter COS-7 Cell Line	Rat_CALCR Reporter COS-7 Cell Line
THRB	
H_THR β Reporter HEK-293 Cell Line	
MC4R	
H_MC4R Reporter HEK-293 Cell Line	
ASGR1	
H_ASGR1 CHO-K1 Cell Line	H_ASGR1 HEK-293 Cell Line
Anti-ASGR1 hIgG1 Antibody(4A2.001)	
Cynomolgus ASGR1 Protein; His Tag	Human ASGR1 Protein; His Tag

使用许可协议：

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策：

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。