

产品手册



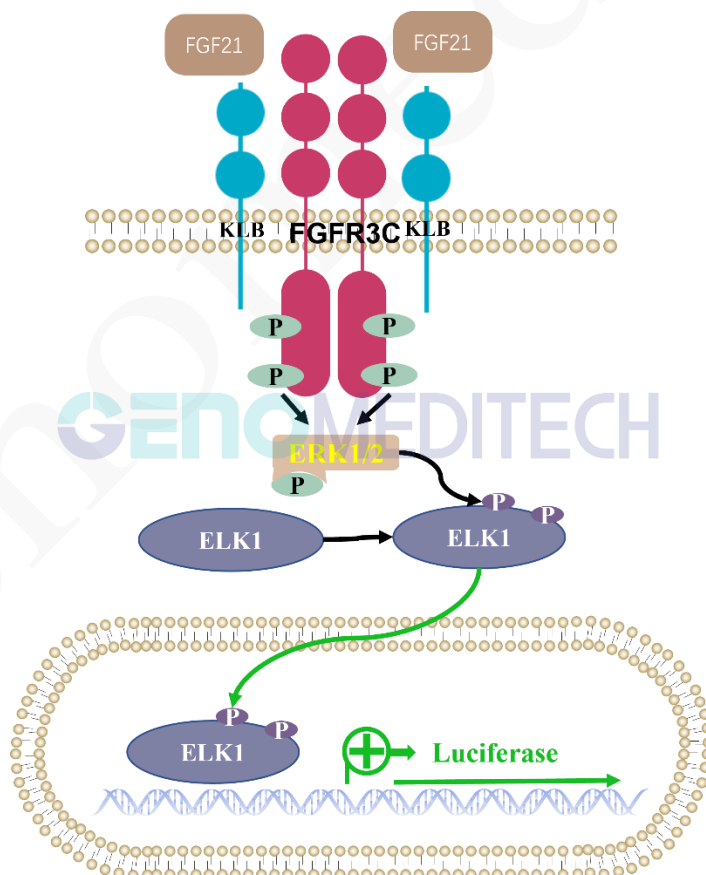
H_FGFR3c KLB Reporter 293 Cell Line

货号: GM-C47356

版本号: 4.0.26.930

成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3) 属受体酪氨酸激酶, 其胞外 IgIII 结构域存在 IIIb/IIIc 剪接变体。FGFR3c (间质型) 保留第 9 外显子、缺失第 8 外显子, 表达于中枢神经系统、骨骼与肾肺等组织, 是软骨内成骨的关键负调控因子: 经 FRS2 α -GRB2-SOS 激活 RAS-RAF-MEK-ERK1/2、PI3K-AKT-mTORC1、STAT1/p21、PLC γ 等通路, 抑制软骨细胞增殖与分化, 并被 CNP-NPR-B-cGMP-PKG2 轴拮抗。FGFR3 功能获得性突变导致软骨发育不全 (p.Gly380Arg, 约 98%)、致死性骨发育不良等; 在肿瘤中则为促癌基因, 见于约 70% 的低级别非肌层浸润性膀胱癌 (S249C、R248C、Y375C 及 FGFR3-TACC3 融合) 与约 13-20% 的 t(4;14) 多发性骨髓瘤。

吉满生物 H_FGFR3c KLB Reporter 293 Cell Line 细胞系, 是一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 FGF-21 结合受体后, 激活下游信号通路, 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 FGFR3c 相关药物的体外效果评价。



规格参数

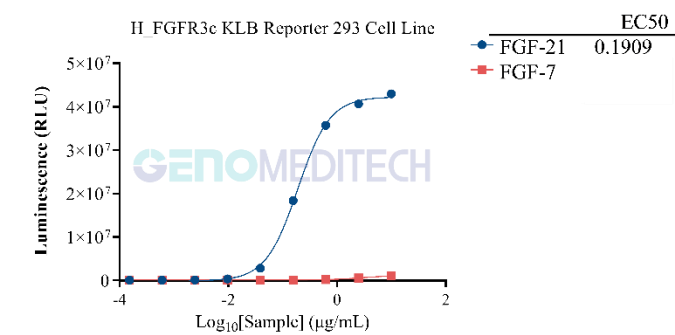
数量	5E6 Cells per vial, 1 mL
产品形式	1 支冻存细胞
储运条件	干冰运输, -196°C 以下长期储存
复苏培养基	DMEM+10% FBS+1% P.S
生长培养基	DMEM+10% FBS+1% P.S+0.75 µg/mL Puromycin+4 µg/mL Blasticidin+175 µg/mL Hygromycin+400 µg/mL G418
培养备注	无
细胞冻存液	90% FBS+10% DMSO
生长特性	贴壁
培养条件	37°C, 5% CO ₂
支原体检测	该细胞系已通过支原体检测, 结果为阴性。
生物安全等级	Biosafety Level 2
备注	建议尽早扩增该细胞, 并冻存至少 10 支, 以便后续使用。

实验材料与仪器

名称	Manufacturer/Catalogue No.
DMEM	Gibco/C11995500BT
Fetal Bovine Serum	ExCell/FSP500
Pen/Strep	Thermo/15140-122
Blasticidin	Genomeditech/ GM-040404
G418	Genomeditech/ GM-040402
Hygromycin	Genomeditech/ GM-040403
Puromycin	Genomeditech/ GM-040401
96-well U-bottom Plate	Saining/1014010
96-well White Opaque Plate	Thermo/236108
96 well round cell culture plate	PakGent/CL-PT096
Human FGF-21 Protein; His Tag	Genomeditech/ GM-87962RP
Recombinant Human KGF/FGF-7 Protein (His Tag), HPLC-verified	sinobiological/10210-H07E
Anti-FGFR3 hIgG1 Reference Antibody(Vofabio)	Genomeditech/GM-88323MAB
RG7992 (anti-Klotho Beta)	Aladdin/Ab177889
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	Genomeditech/ GM-040513
NovoCyte Flow Cytometer	Agilent/NovoCyte 2060R
Countess 3 Automated Cell Counter	ThermoFisher/A49891

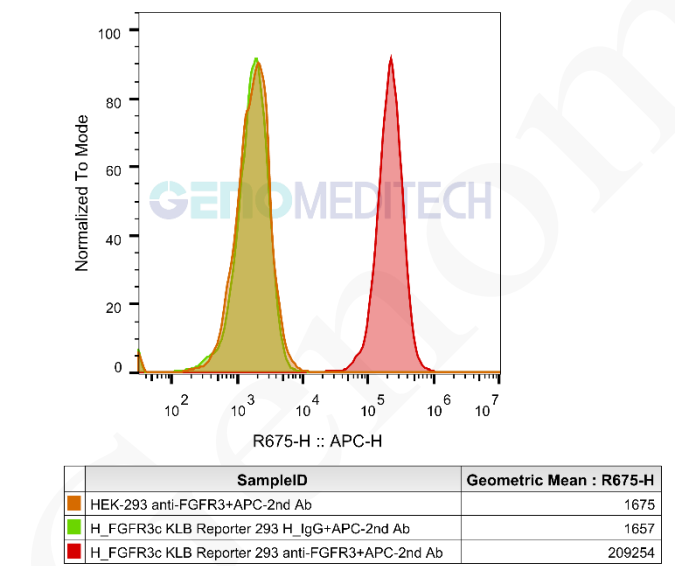
验证结果

信号通路

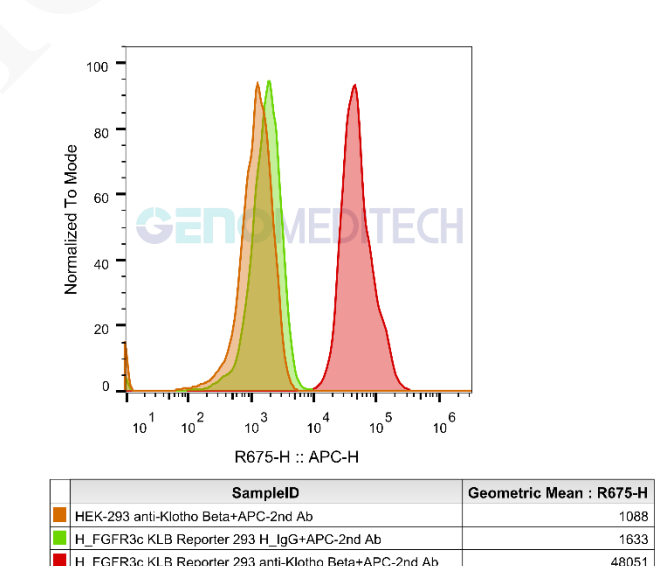


FGF-21 和 FGF-7 激活验证。H_FGFR3c KLB Reporter 293 细胞系 (GM-C47356) 按 1.5E4 细胞/孔接种于 96 孔板, 加入梯度稀释的 Human FGF-21 (GM-87962RP) 和 FGF-7(sinobiological/10210-H07E), 于 assay buffer (DMEM+1% FBS+1% P.S) 中孵育 16 小时后, 采用 Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech) 检测萤火虫荧光素酶活性, 最大诱导倍数分别约为 [773.0]和[18.5], 数据以药物质量浓度表示。[\[protocol\]](#)

表达



FGFR3 流式表达验证。采用流式细胞术, 用 Anti-FGFR3 hIgG1 Reference Antibody(Vofabio) (GM-88323MAB) 检测 H_FGFR3c KLB Reporter 293 细胞系 (GM-C47356) 的 FGFR3 表达。



Klotho Beta 流式表达验证。采用流式细胞术, 用 RG7992 (anti-Klotho Beta) (Aladdin/Ab177889) 检测 H_FGFR3c KLB Reporter 293 细胞系 (GM-C47356) 的 Klotho Beta 表达。

细胞复苏

复苏培养基: DMEM+10% FBS+1% P.S

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°C,因为在-70°C下储存会导致活性丧失。

- 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 $\geq 3E6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式,调整活细胞密度到 $2-3E5$ cells/mL,根据细胞悬液总体积,将细胞接种到合适的培养皿中。

细胞冻存

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

- 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 $5E6$ 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。

细胞传代

生长培养基: DMEM+10% FBS+1% P.S+0.75 μ g/mL Puromycin+4 μ g/mL Blasticidin+175 μ g/mL Hygromycin+400 μ g/mL G418

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。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°C 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。

细胞传代比例为 1:3-1:4, 2-3 天传代。

培养备注

- 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。

实验方案

激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_FGFR3c KLB Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Human FGF-21 Protein (20.2 kDa; 以下简称 Human FGF-21)、Recombinant Human KGF/FGF-7 Protein (His Tag) (21 kDa; 以下简称 Human FGF-7) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10、C2-C10，B11、C11 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μL PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

		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 FGF-21	PBS	10 $\mu\text{g/mL}$	2.5 $\mu\text{g/mL}$	625 ng/mL	156.25 ng/mL	39.06 ng/mL	9.77 ng/mL	2.44 ng/mL	610.35 pg/mL	152.59 pg/mL	0	PBS
C	Human FGF-7	PBS	10 $\mu\text{g/mL}$	2.5 $\mu\text{g/mL}$	625 ng/mL	156.25 ng/mL	39.06 ng/mL	9.77 ng/mL	2.44 ng/mL	610.35 pg/mL	152.59 pg/mL	0	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
E													
F													
G													
H													

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。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B11、C2-C11）。
- 母液配置。

药物名称	储液	母液	配置方法
Human FGF-21	2 mg/mL	0.2 mg/mL	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer
Human FGF-7	0.25 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，B2、C2 孔分别加入 160 μL Assay Buffer，B3-B12、C3-C12 孔，各加入 120 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 8.42 μL Human FGF-21，C2 中加入 6.67 μL Human FGF-7），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 40 μL 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	8.42 μL Human FGF-21	加入	160 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	
C	6.67 μL Human FGF-7	加入	160 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	
D													
E													
F													
G													
H													

- 从第一个梯度稀释孔 B2、C2 中分别吸取 40 μL ；加入到第二个梯度稀释孔 B3、C3，充分混匀。
- 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10、C10）。

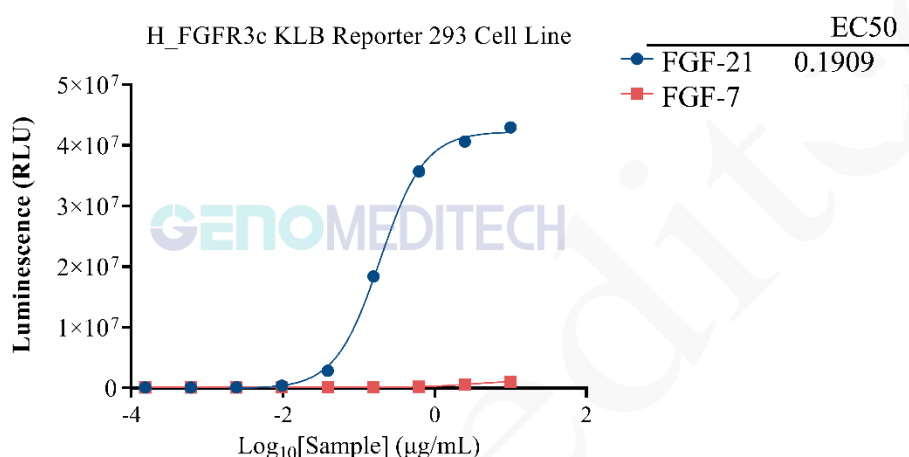
- h) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。
- i) 分别加入梯度稀释好的药物，每孔 100 μL 。
- j) 盖上车盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 16 h。
- k) 使用报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_FGFR3c KLB Reporter 293 Cell Line+ Human FGF-21	0 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	152.59 pg/mL
	55571	42953539	49921
H_FGFR3c KLB Reporter 293 Cell Line+ Human FGF-7	0 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	152.59 pg/mL
	53980	998406	54404

验证结果



相关产品

FGFR3	
H_FGFR3C CHO-K1 Cell Line (Low Expression)	H_FGFR3C HEK-293 Cell Line
Anti-FGFR3 hIgG1 Reference Antibody(Vofabio)	

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。