Genomeditech (Shanghai) Co.,Ltd.
Order: 021-68455258/50432826/50432825
Toll-free: 400 627 9288
Email: service@genomeditech.com

产品手册

H_GDF15 Reporter 293 Cell Line

H_GDF15 Reporter 293 细胞系

For research use only!
本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.3

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、 材料准备.....5
1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....5
2. 试剂耗材准备.....5
五、 细胞复苏、传代、冻存.....6
1. 细胞复苏.....6
2. 细胞传代（以 10 cm 皿为例）.....6
3. 细胞冻存.....6
六、 使用方法.....7
1. 激活实验.....7
1) 加样步骤.....7
2) 报告基因检测.....8
3) 验证结果.....8
2. 抗体抑制实验.....9
1) 加样步骤.....9
2) 报告基因检测.....10
3) 验证结果.....11
附录 1：稳定性验证结果.....12
附录 2：流式验证结果.....12
附录 3：RT 验证结果.....13
相关产品.....13
使用许可协议：.....14

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-C06718	H_GDF15 Reporter 293 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C06718	H_GDF15 Reporter 293 Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196℃

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

生长分化因子 15 (GDF15)是转化生长因子(TGF)-b 家族的远端成员，是一种以 25 kDa 二聚体形式循环的分泌蛋白。它是一种属于转化生长因子 β 超家族的蛋白质。在正常情况下，GDF-15 在大多数器官中低表达，肝、肾、心和肺等器官损伤时表达上调。

神经胶质细胞系衍生的神经营养因子（glial-cell line-derived neurotrophic factor，GDNF）家族的 GFRAL 为 GDF15 的唯一受体。 GDF15 以高亲和力结合 GFRAL，但不与 GDNF 受体家族的其他成员结合，而 GFRAL 也仅结合 GDF15 而不结合任何其他 GDNF 相关配体。GFRAL 在结合 GDF15 后与辅助受体 RET 结合形成复合物，能够观察到 GDNF 家族典型的细胞信号，并与 RET、AKT、ERK 和 PLC-γ1 的磷酸化相关。

吉满生物 H_GDF15 Reporter 293 Cell Line 报告基因细胞系，是基于 RET-ERK 信号通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 GDF15 与其受体 GFRAL 结合后继续与辅助受体 RET 结合形成复合物，使 RET 磷酸化。进一步使 ERK 磷酸化，激活 ELK1。ELK1 入核激活荧光素酶（Luciferase）的表达。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此可用于 GDF15 相关药物的体外效果评价。

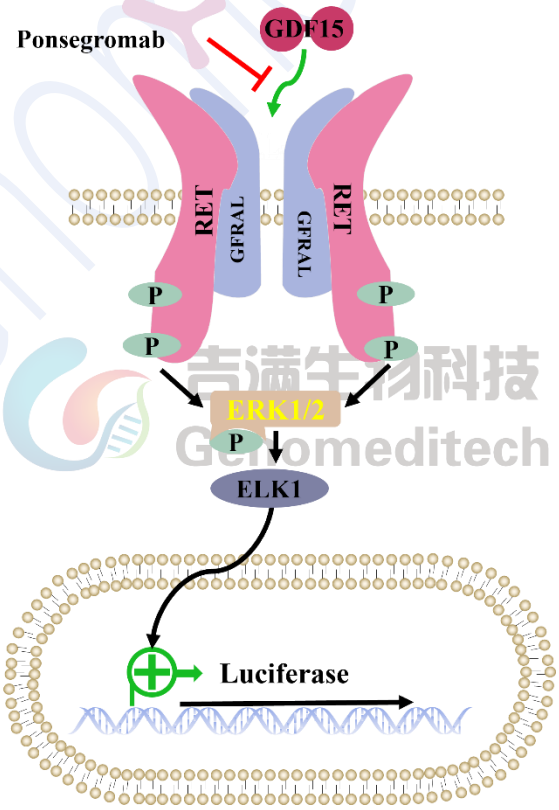


Fig 1. 原理示意图

四、 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+1.5 μg/mL Blasticidin+400 μg/mL G418+125 μg/mL Hygromycin+0.75 μg/mL Puromycin
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.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
DMEM	500 mL	Gibco/C11995500BT
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 GDF15 Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-87627RP
Anti-GDF15 hIgG1 Reference Antibody(Ponsbio)	/	Genomeditech/GM-87500MAB
Anti-H_GFRAL hIgG4 Antibody(QUEL-0301)		Genomeditech/GM-71276AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	/	Genomeditech/GM-040513

重要仪器

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

五、 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°C，因为在-70°C下储存会导致活性丧失。

a) 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。

b) 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）。

c) 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 × g，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。

d) 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≥ 3 × 10^6 cells/mL。

e) 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 2-3 × 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

a) 使用 176 × g，3 min 离心收集细胞。

b) 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。

c) 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。

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。

a) 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。

b) 将皿或培养瓶中的培养液弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。

c) 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。

d) 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 × g 室温离心 3 min。

注意事项：

a) **细胞刚复苏，死细胞较多，属于正常现象，经调整（约 1 周左右）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。**

b) **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。**

c) **FBS 血清需 56°C 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。**

六、 使用方法

1. 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_GDF15 Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5 × 10^4 cells/孔。本次实验使用 Human GDF15 Protein; His Tag（13 kDa; 以下简称为 H_GDF15）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 4 μg/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 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	H_GDF15	PBS	4 μg/mL	1 μg/mL	250 ng/mL	62.5 ng/mL	15.63 ng/mL	3.91 ng/mL	976.56 pg/mL	244.14 pg/mL	61.04 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

a) 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。

b) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。

c) 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。

d) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
H_GDF15	0.4 mg/mL	/	直接使用储液

e) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 145.2 μL Assay Buffer，B2-B11 孔，加入 110 μL 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 1.47 μL H_GDF15），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 36.67 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.47 μL H_GDF15	加入	145.2 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 36.67 μL，加入到第二个梯度稀释孔 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，每孔吸弃 100 μL 上清。

j) 加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100 μL。

k) 盖上板盖，于 37 ℃ CO_2 培养箱中培养 16 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_GDF15 Reporter 293 Cell Line	0 μg/mL	4 μg/mL	61.04 pg/mL
	395	5529	386

3) 验证结果

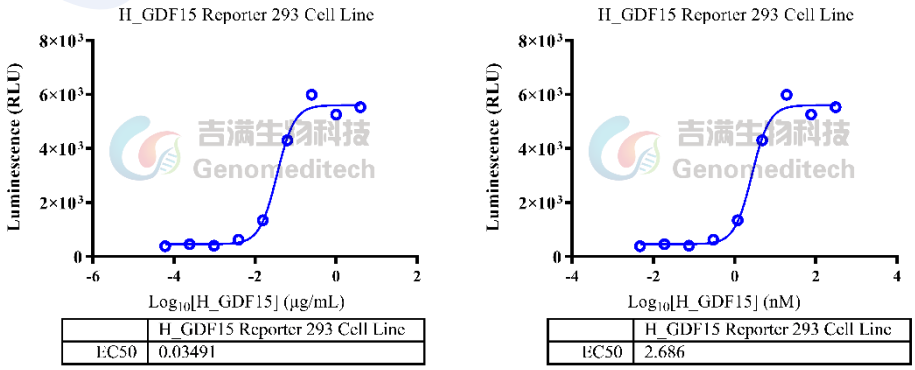


Fig 2. 激活验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. 抗体抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_GDF15 Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5 × 10^4 Cells/孔。使用 Anti-GDF15 hIgG1 Reference Antibody(Ponsbio) (以下简称为 Ponsegromab; 约 150 kDa)作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 30 μg/mL，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.10 分别排布在 B2-B11，B12 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	PBS
B	Ponsegromab	PBS	30 μg/mL	10 μg/mL	3.33 μg/mL	1.11 μg/mL	370.37 ng/mL	123.46 ng/mL	41.15 ng/mL	13.72 ng/mL	4.57 ng/mL	1.52 ng/mL	0
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

a) 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。

b) 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备抗体稀释。

c) 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B11）。

d) 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Ponsegromab	4 mg/mL	/	直接使用储液
H_GDF15	0.4 mg/mL	0.04 mg/mL	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer

e) 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 90 μL Assay Buffer，B3-B12 孔，加入 60 μL 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 1.37 μL Ponsegromab），混匀。

	母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 30 μL，加入次孔										对照孔
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.37 μL Ponsegromab	加入	90 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL
C													
D													
E													
F													
G													
H													

g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 30 μL，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。

h) 以此类推，直至第 10 个梯度稀释孔（B11）。

i) 配置 2× 激活剂，80 ng/mL H_GDF15 （3.6 μL 0.04 mg/mL H_GDF15 母液加入到 1800 μL Assay Buffer 中，混匀后使用）。

j) 将配置好的激活剂加入梯度稀释的抗体中，每孔加入 60 μL 混匀，盖上盖板放入培养箱孵育 1 h。

k) 1 h 后取出步骤 a 的细胞孔板，吸弃上清。

l) 然后加入步骤 j 孵育好的混合溶液，每孔 100 μL。

m) 盖上盖板，继续孵育 16 h。

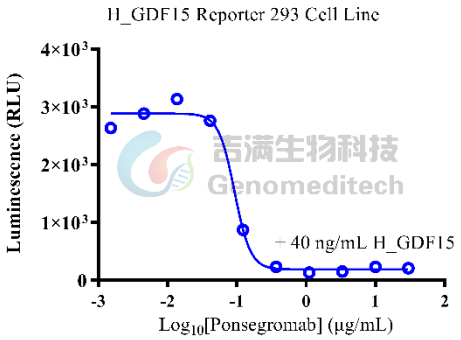
n) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

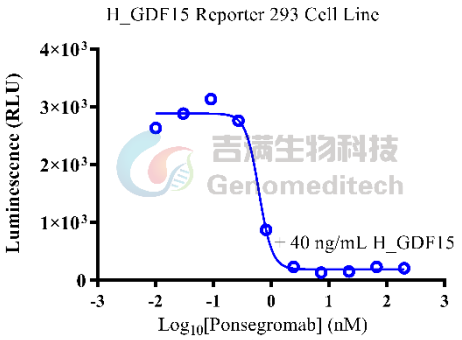
参考报告基因检测说明书。

H_GDF15 Reporter 293 Cell Line	0 μg/mL	30 μg/mL	1.52 ng/mL
	1921	205	2633

3) 验证结果



	H_GDF15 Reporter 293 Cell Line
IC50	0.09281



	H_GDF15 Reporter 293 Cell Line
IC50	0.6187

Fig 3. 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 1：稳定性验证结果

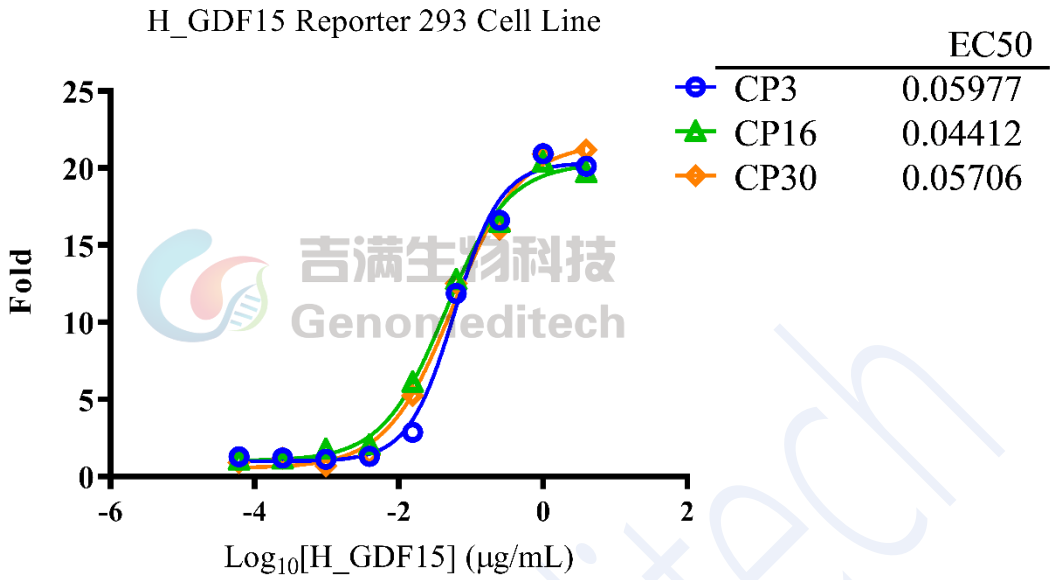
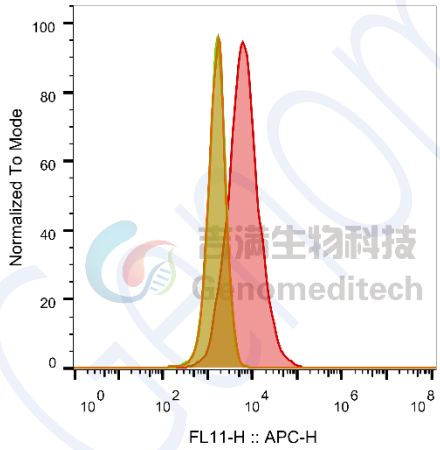


Fig 4. 稳定性验证结果

附录 2：流式验证结果



	SampleID	Geometric Mean : FL11-H
	293 anti-GFRAL+APC-2nd Ab	1583
	H_GDF15 Reporter 293 H_IgG+APC-2nd Ab	1573
	H_GDF15 Reporter 293 anti-GFRAL+APC-2nd Ab	6362

Fig 5. 使用 Anti-H_GFRAL hIgG4 Antibody(QUEL-0301) (Genomeditech/GM-71276AB)验证结果

附录 3：RT 验证结果

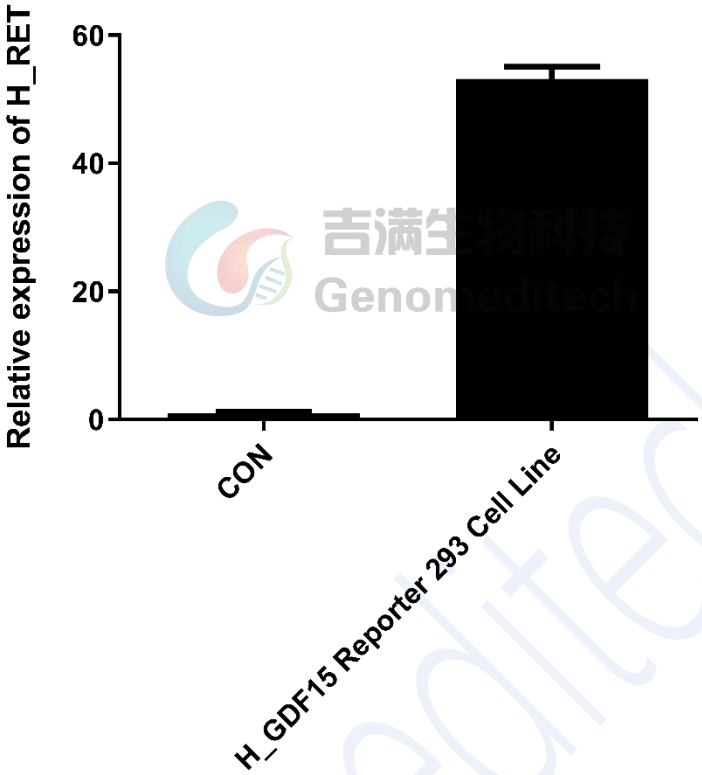


Fig 6. RT 验证结果

相关产品

GDF15 GFRAL	
H_GDF15 Reporter 293 DDX35TM Cell Line	Mouse_GDF15 Reporter 293 Cell Line
Membrane Bound H_GDF15 CHO-K1 Cell Line	
Anti-GDF15 hIgG1 Reference Antibody(Ponsbio)	
Anti-H_GDF15 hIgG4 Antibody(CTL-002)	Anti-H_GFRAL hIgG4 Antibody(QUEL-0301)
Biotinylated Human GFRAL Protein; His-Avi Tag	Human GDF15 Protein; His Tag
Human pro-GDF15 Protein; His Tag	Human GFRAL 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。

Genomeditech