

产品手册

BRE Reporter 293 Cell Line

BRE 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：V2.12.4

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（示例）	7
1.	激动剂激活实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
3)	验证结果	8
1.	BMP-2 激活，Bimagrumab 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:	GDF-2、Activin A、GDF-8 验证结果	12
附录 3:	BMP4、BMP10、TGF- β 验证结果	13
附录 4:	流式验证结果	13
相关产品		14
使用许可协议:		15

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-C37665	BRE 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-C37665	BRE Reporter 293 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

骨形态发生蛋白（Bone Morphogenetic Proteins, BMPs）是转化生长因子 β （TGF- β ）超家族的重要成员，最初因其在骨和软骨形成中的作用而被发现。BMP 信号通路在多种生物学过程中发挥关键作用，包括胚胎发育、细胞分化、增殖、凋亡以及组织再生和修复。

吉满生物的 BRE Reporter 293 Cell Line 是一种 Luciferase 报告基因细胞系，当 BMP-2、BMP-9(GDF-2)、BMP-4、BMP-10 等配体结合受体后，激活下游信号通路，随后通过测定荧光信号确定荧光素酶的表达，间接评估配体对信号通路的影响程度。Luciferase 读值即代表信号通路的激活效果，因此该细胞系广泛应用于 BMP 配体、受体激动剂或抑制剂的筛选，以及信号通路调控机制的研究。

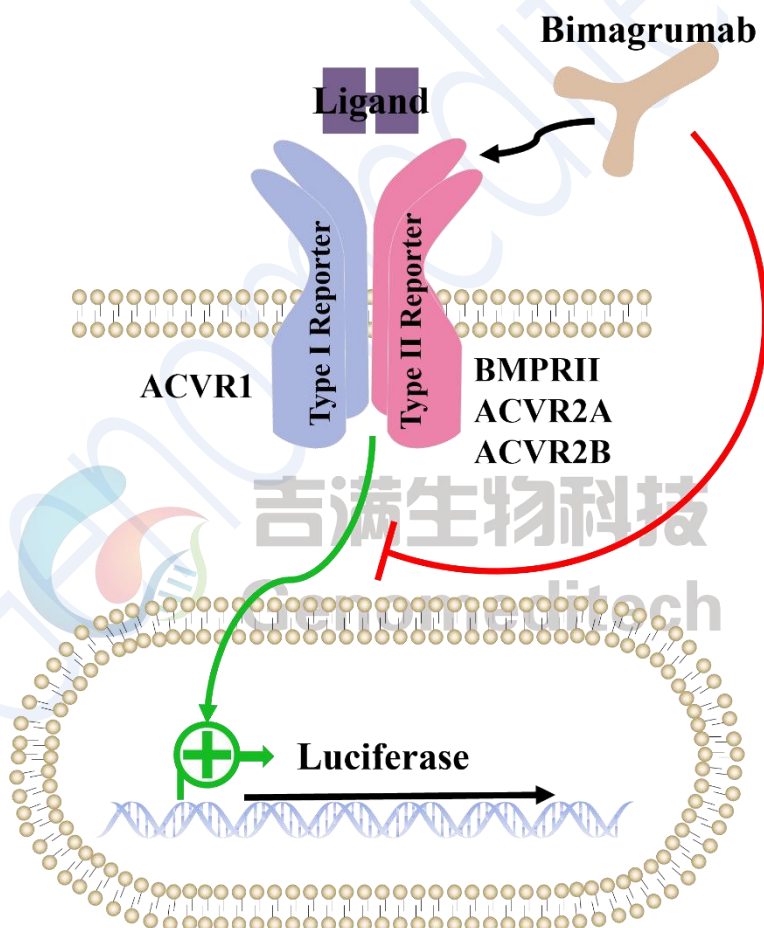


Fig 1.原理示意图

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+4 µg/mL Blasticidin
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.
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
DMEM	500 mL	Gibco/C11995500BT
96 well round cell culture plate	Plate	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	Plate	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	Plate	Saining/1014010
Recombinant Human, Mouse, Rat, Rhesus, Canine BMP-2 Protein	20 µg	Sino Biological/10426-HNAE
Human GDF-2 Protein, Tag Free	50 µg	ACRO/GD2-H5211
Human Activin A Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-87616RP
Human latent GDF-8 Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-87733RP
Recombinant Human BMP4 Protein	25 µg	Sinobiological/10609-HNAE2
Recombinant Human BMP-10 Protein	25 µg	R&D/2926-BP-025/CF
Recombinant Human TGF-beta 1	10 µg	Novoprotein/CA59
Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Bimagrumab)	/	Genomeditech/GM-51148AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	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

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℃，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。
- 弃上清，细胞沉淀用生长培养基重悬，根据传代前细胞密度分盘（根据培养皿面积和细胞密度计算，传代后细胞密度为 30-40%）。

注意事项：

- 细胞刚复苏，会有一定比例的死细胞，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℃水浴 30 分钟，可热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（示例）

1. 激动剂激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 BRE Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。本次实验使用 Recombinant BMP-2 Protein (以下简称为：BMP-2; 13 kDa) 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ ，3 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	Human BMP-2	PBS	2 μg/mL	666.67 ng/mL	222.22 ng/mL	74.07 ng/mL	24.69 ng/mL	8.23 ng/mL	2.74 ng/mL	914.49 pg/mL	304.83 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 U 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
BMP-2	0.25 mg/mL	/	直接使用储液

- 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 163.68 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 110 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 1.32 μL BMP-2），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 55 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.32 μL BMP-2	加入	163.68 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 1 个梯度稀释孔 B2 中吸取 55 μ L, 加入到第 2 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 μ L 培养基。
- j) 加入之前准备好的梯度稀释液, 每孔 100 μ L。
- k) 盖上班盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- l) 收样, 转至 96 孔白底板上机, 检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

BRE Reporter 293 Cell Line	0 μ g/mL	2 μ g/mL	304.83 pg/mL
	96986	861965	97209

3) 验证结果

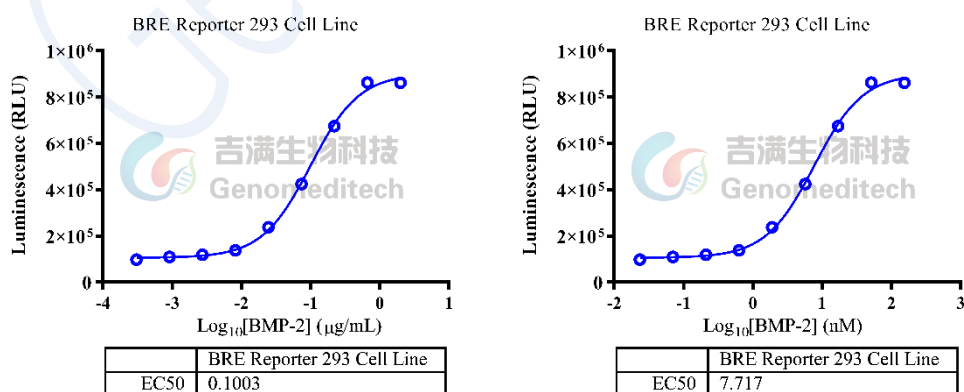


Fig 2. Response to Recombinant Human, Mouse, Rat, Rhesus, Canine BMP-2 Protein. BRE Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C37665) at a concentration of 1.5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Recombinant BMP-2 Protein (Sino Biological/10426-HNAE) in assay buffer (DMEM+1% FBS+1%

P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech).

1. BMP-2 激活，Bimagrumab 抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 BRE Reporter 293 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 100 $\mu\text{g/mL}$ ，5 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	PBS
B	Bimagrumab	PBS	100 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	800 ng/mL	160 ng/mL	32 ng/mL	6.4 ng/mL	1.28 ng/mL	256 pg/mL	0	PBS
C		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 U 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	1.298 mg/mL	/	直接使用储液
BMP-2	0.25 mg	/	直接使用储液

- 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 58.16 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 55 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 10.59 μL Bimagrumab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 13.75 μL，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	10.59 μL Bimagrumab	加入	58.16 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 13.75 μL ，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：540 ng/mL BMP-2（1.5 μL 0.25 mg/mL BMP-2 母液加入到 693 μL 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 μL 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 μL 的 BMP-2 蛋白溶液。盖上盖板，继续孵育 6 h。
- l) 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

BRE Reporter 293 Cell Line	270 ng/mL BMP-2 + 0 $\mu\text{g/mL}$ Bimagrumab	270 ng/mL BMP-2 + 100 $\mu\text{g/mL}$ Bimagrumab	270 ng/mL BMP-2 + 256 pg/mL Bimagrumab
	965418	327349	898600

3) 验证结果

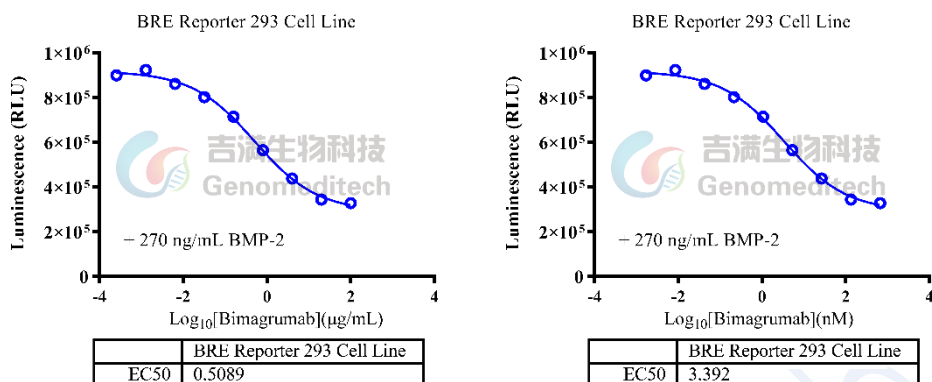


Fig 3. response to Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Bimagrumb). Serial dilutions of the Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Bimagrumb) (Cat. GM-51148AB) was incubated with 1.5E4 cells/well of the BRE Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C37665) in a 96-well plate for 1 hour in assay buffer (DMEM + 1% FBS + 1% P.S). Subsequently, the BMP-2 Protein (Sino Biological/10426-HNAE) at a concentration of 27 ng/well was added, and the coculture proceeded for an additional 6 hours. Firefly luciferase activity is then measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech).

附录 1：稳定性验证结果

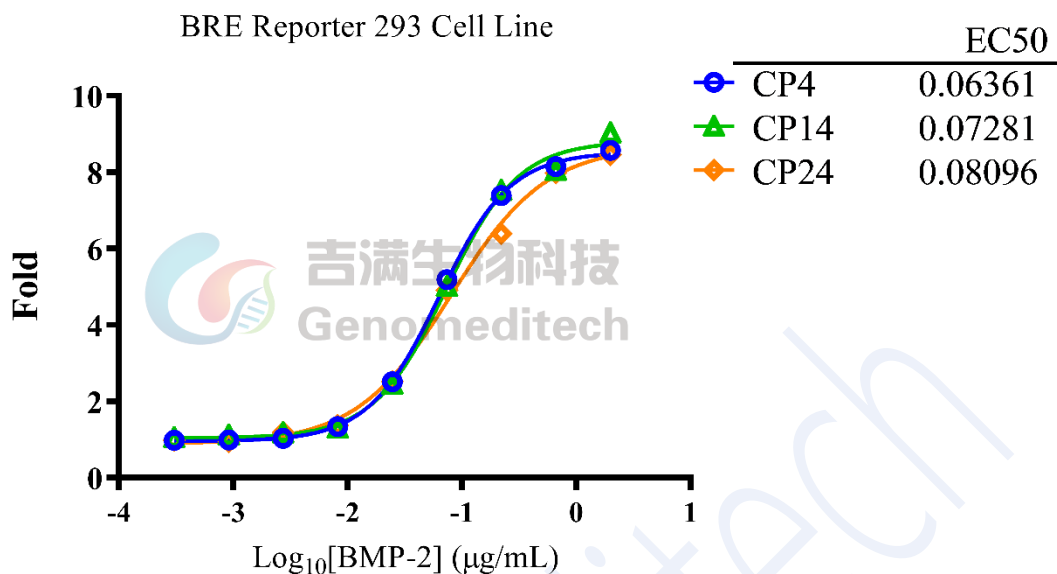


Fig 4. The passage stability of response to Recombinant BMP-2 Protein. The passage 4, 14, and 24 of BRE Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C37665) at a concentration of 1.5E4 cells/well (96-well format) were stimulated with serial dilutions of Recombinant BMP-2 Protein (Sino Biological/10426-HNAE) in assay buffer (DMEM+1% FBS+1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech).

附录 2：GDF-2、Activin A、GDF-8 验证结果

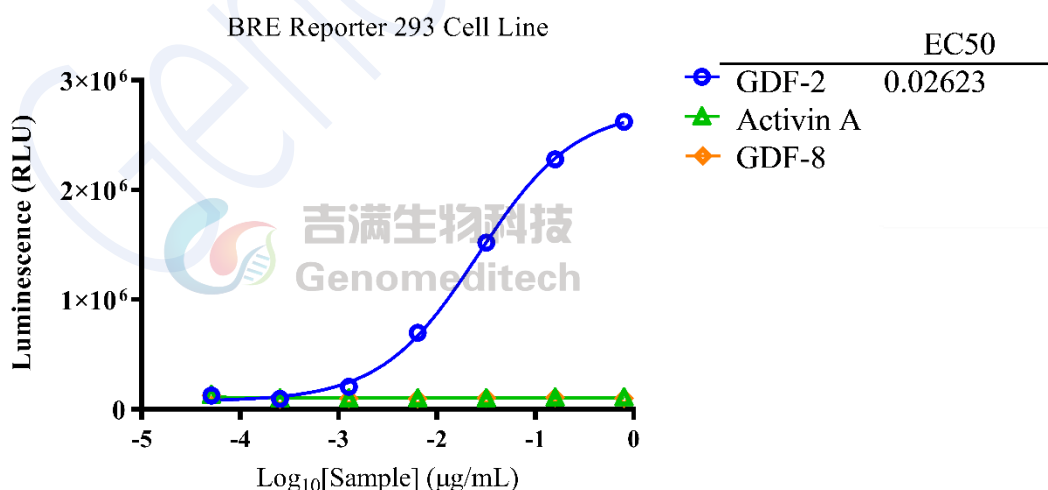


Fig 5. Response to ligand protein. The BRE Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C37665) at a concentration of 1.5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Human GDF-2 Protein (ACRO/GD2-H5211), Human Activin A Protein (Cat. GM-87616RP) and Human latent GDF-8 Protein (Cat. GM-87733RP) in assay

buffer (DMEM+1% FBS+1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech).

附录 3：BMP4、BMP10、TGF-β 验证结果

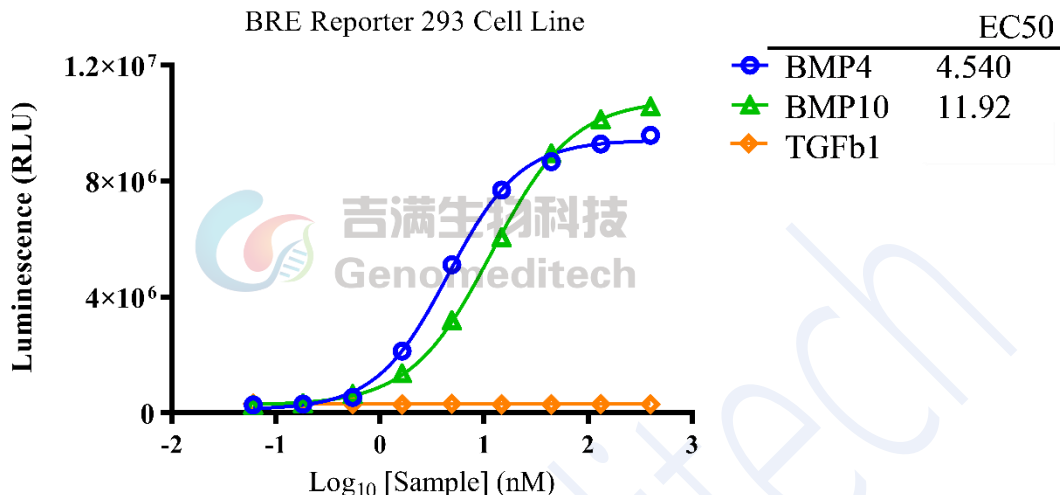


Fig 6. Response to ligand protein. The BRE Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C37665) at a concentration of 1.5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Recombinant Human BMP4 Protein (sinobiological/10609-HNAE2), Recombinant Human BMP-10 Protein(R&D/2926-BP-025/CF) and Recombinant Human TGF-β1 (MCE/CA59) in assay buffer (DMEM+1% FBS+1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). Data are shown by drug molar concentration.

附录 4：流式验证结果

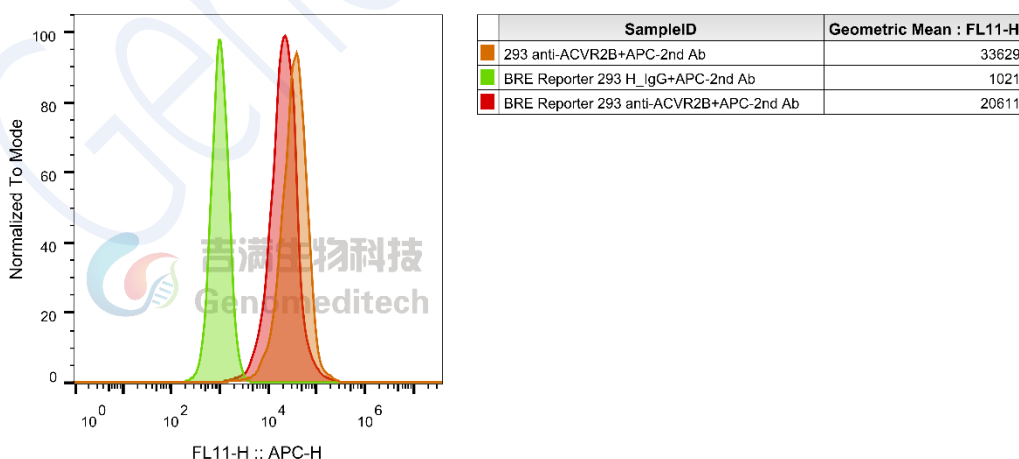


Fig 8. BRE Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C37665) was determined by flow cytometry using Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody (Bimagrumab) (Cat. GM-51148AB).

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	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	Tango-H_GLP1R CHO-K1 Cell Line
Cynomolgus_GLP1R HEK-293 Cell Line	H_GLP1R CHO-K1 Cell Line
H_GLP1R HEK-293 Cell Line	Mouse_GLP1R HEK-293 Cell Line
Anti-GLP1R hIgG1 Antibody(mAb-36986)	Anti-H_GLP1R hIgG1 Antibody(glutazumab)
FGF21:FGFR	
H_FGF21 Reporter HEK-293 Cell Line	
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)	
GIP: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 HEK-293 Cell Line
H_GIPR CHO-K1 Cell Line	H_GIPR HEK-293 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
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 B Protein; His Tag
Human ACVR2A Protein; hFc Tag	Human ACVR2A Protein; His Tag
Human ACVR2B Protein; hFc Tag	Human ACVR2B Protein; His Tag
Human latent GDF-8 Protein; His Tag	Mouse ACVR2B Protein; His Tag
AMY: CALCR RAMP	

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。