

产品手册

H_FGFR2b Reporter 293 Cell Line

H_FGFR2b 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：V2.12.1

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、	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.	激动剂验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
2.	Block 抗体抑制实验.....	9
1)	加样步骤.....	9
2)	报告基因检测.....	11
3)	验证结果.....	11
附录 1	流式验证结果.....	12
相关产品	12
使用许可协议:	13

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-C41521	H_FGFR2b 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-C41521	H_FGFR2b 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

FGFR2b (成纤维细胞生长因子受体 2b) 是成纤维细胞生长因子受体家族 (FGFR) 的重要成员, 由 FGFR2 基因通过选择性剪接产生的上皮特异性异构体, 其胞外结构域包含三个免疫球蛋白样结构域 (D1-D3), 特异性结合 FGF7、FGF10 等配体, 通过激活下游 RAS-MAPK、PI3K-AKT/mTOR 及 STAT3 等信号通路调控细胞增殖、分化、迁移及血管生成。该受体主要在上皮细胞中表达, 与间质来源的 FGFR2c (IIIc 剪接变体) 形成旁分泌信号轴, 参与胚胎发育、器官形成及组织修复等生理过程。病理状态下, FGFR2b 的异常激活 (如基因扩增、突变或配体过表达) 可驱动肿瘤发生发展, 约 30%-38% 的胃癌、乳腺癌、胆管癌等上皮源性肿瘤存在 FGFR2b 过表达, 且与侵袭性表型、淋巴结转移及不良预后显著相关。

吉满生物 H_FGFR2b Reporter 293 Cell Line 细胞系, 是一种 Luciferase 报告基因细胞系。当 FGF10、KGF (FGF7) 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 FGFR2b 相关药物的体外效果评价。

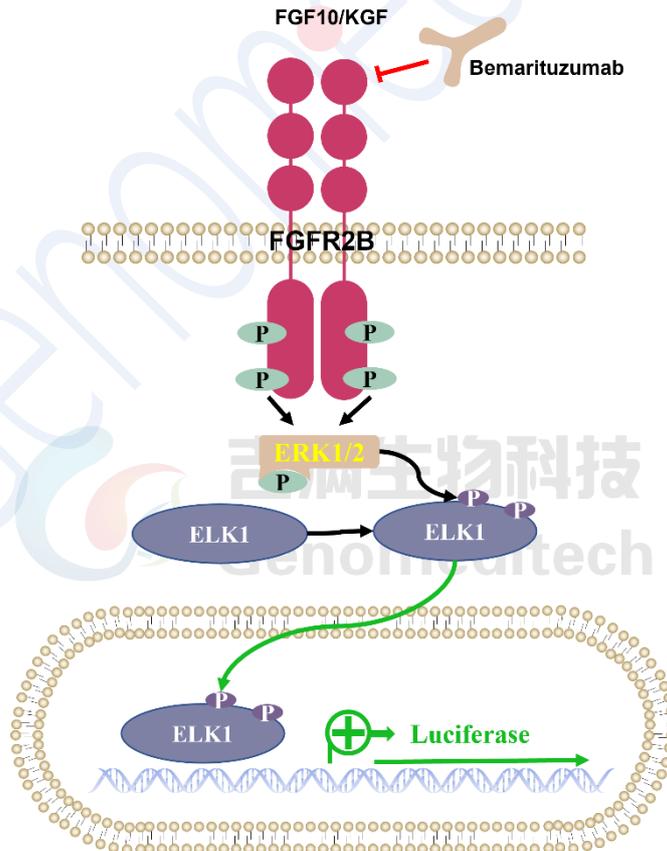


Fig 1. 原理示意图

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+4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin+125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hygromycin+0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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.
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	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
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	96-well	Corning/3912
Microplate		
Human FGF10 Protein	/	kactus/FGF-HE010
Recombinant Human KGF	10 μg	Novoprotein/CM88
Anti-FGFR2 hIgG1 Referece Antibody (Bemabio)	/	Genomeditech/GM-88057MAB
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°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 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°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。

- 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°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。
- 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，会有一些比例的死细胞，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°C 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

1. 激动剂验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_FGFR2b Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Human FGF10 Protein (19.3 kDa; 以下简称 Human FGF10)、Recombinant Human KGF (20 KDa; 以下简称 Human KGF) 作为阳性药物，Human FGF10 的 Conc.01 浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照；Human KGF 的 Conc.01 浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 C2-C10，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 FGF10	PBS	15.00 $\mu\text{g/mL}$	5.00 $\mu\text{g/mL}$	1.67 $\mu\text{g/mL}$	555.56 ng/mL	185.19 ng/mL	61.73 ng/mL	20.58 ng/mL	6.86 ng/mL	2.29 ng/mL	0	PBS
C	Human KGF	PBS	3.00 $\mu\text{g/mL}$	750.00 ng/mL	187.50 ng/mL	46.88 ng/mL	11.72 ng/mL	2.93 ng/mL	732.42 pg/mL	183.11 pg/mL	45.78 pg/mL	0	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
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。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 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 FGF10	0.5 mg/mL	/	直接使用储液
Human KGF	100 µg/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 加入 180 µL Assay Buffer, C2 孔加入 160 µL Assay Buffer, B3-B12、C3-C12 孔, 加入 120 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 5.57 µL Human FGF10, C2 中加入 4.95 µL Human KGF), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔: B 行依次从前孔吸取 60 µL, 加入次孔; C 行依次从前孔吸取 40 µL, 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	5.57 µL Human FGF10 加入	180 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	
C	4.95 µL Human KGF 加入	160 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 60 µL, C2 中吸取 40 µL; 分别加入到第二个梯度稀释孔 B3、C3, 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) 分别加入梯度稀释好的药物, 每孔 100 µL。
- k) 盖上班盖, 于 37 °C CO₂ 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_FGFR2b Reporter 293 Cell Line+ Human FGF10	0 µg/mL	15.00 µg/mL	2.29 ng/mL
	483423	12745144	532737
H_FGFR2b Reporter 293 Cell Line+ Human KGF	0 µg/mL	3.00 µg/mL	45.78 pg/mL
	448960	13174279	430139

3) 验证结果

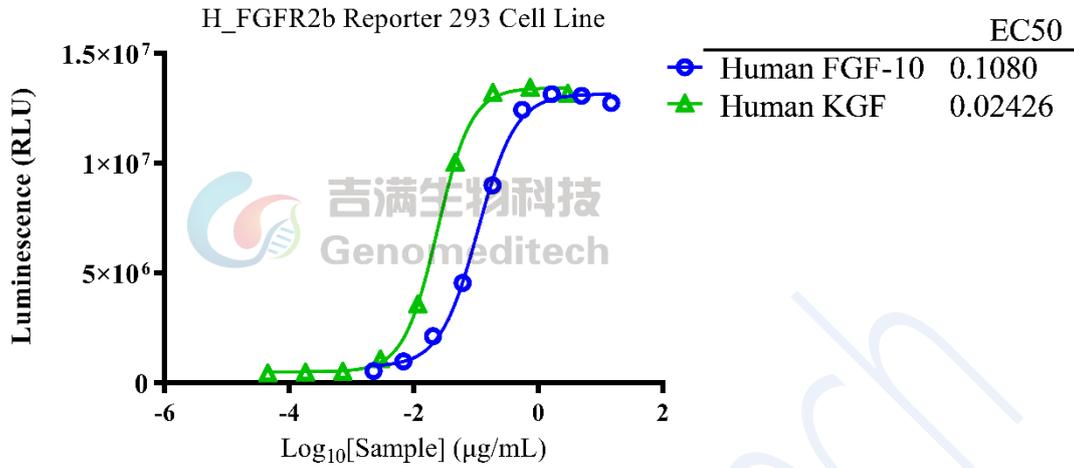


Fig 2. 激活验证结果

2. Block 抗体抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_FGFR2b Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 FGF10、KGF 作为激活药物，Anti-FGFR2 hIgG1 Reference Antibody (Bemabio) 作为 block 抗体（分子量约 150 kDa；以下简称 Bemarituzumab）。Conc.01 终浓度为 100 µg/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	Bemarituzumab	100.00 µg/mL	25.00 µg/mL	6.25 µg/mL	1.56 µg/mL	390.63 ng/mL	97.66 ng/mL	24.41 ng/mL	6.10 ng/mL	1.53 ng/mL	0	PBS
C	Bemarituzumab	100.00 µg/mL	25.00 µg/mL	6.25 µg/mL	1.56 µg/mL	390.63 ng/mL	97.66 ng/mL	24.41 ng/mL	6.10 ng/mL	1.53 ng/mL	0	PBS
D		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
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 $1.5 \times$

10⁵ cells/mL。以排枪加 100 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖板上盖，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) 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10、C2-C10）。
- d) 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Bemarituzumab	5.9 mg/mL	/	直接使用储液
FGF10	0.5 mg/mL	/	直接使用储液
KGF	100 μg/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、C2 孔分别加入 80 μL Assay Buffer，B3-B11、C3-C11 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、C2 分别中加入 2.81 μL Bemarituzumab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 20 μL，加入次孔										对照组	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	2.81 μL Bemarituzumab 加入		80 μL	60 μL									
C	2.81 μL Bemarituzumab 加入		80 μL	60 μL									
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2、C2 中吸取 20 μL，加入到第二个梯度稀释孔 B3、C3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10、C10）。
- i) 配置 2 × 激活剂：200 ng/mL FGF10（0.74 μL 0.5 mg/mL Human FGF10 母液加入到 1850 μL Assay Buffer 中，混匀后使用）；40 ng/mL KGF（0.48 μL 100 μg/mL Human KGF 母液加入到 1200 μL Assay Buffer 中，混匀后使用）。

- j) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，吸弃上清。分别加入步骤 h 梯度稀释的抗体，50 μL 每孔，孵育 1h。
- k) 1 h 后，将步骤 j 的细胞孔板取出，分别加入步骤 i 配置好的 FGF10、KGF 溶液，每孔加入 50 μL 。
- l) 盖上班盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 16 h。
- m) 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_FGFR2b Reporter 293 Cell Line	100 ng/mL FGF10 + 0 $\mu\text{g/mL}$ Bemarituzumab	100 ng/mL FGF10 + 100 $\mu\text{g/mL}$ Bemarituzumab	100 ng/mL FGF10 + 1.53 ng/mL Bemarituzumab
	1948844	553857	2016961
H_FGFR2b Reporter 293 Cell Line	20 ng/mL KGF + 0 $\mu\text{g/mL}$ Bemarituzumab	20 ng/mL KGF + 100 $\mu\text{g/mL}$ Bemarituzumab	20 ng/mL KGF + 1.53 ng/mL Bemarituzumab
	1815624	461188	1978903

3) 验证结果

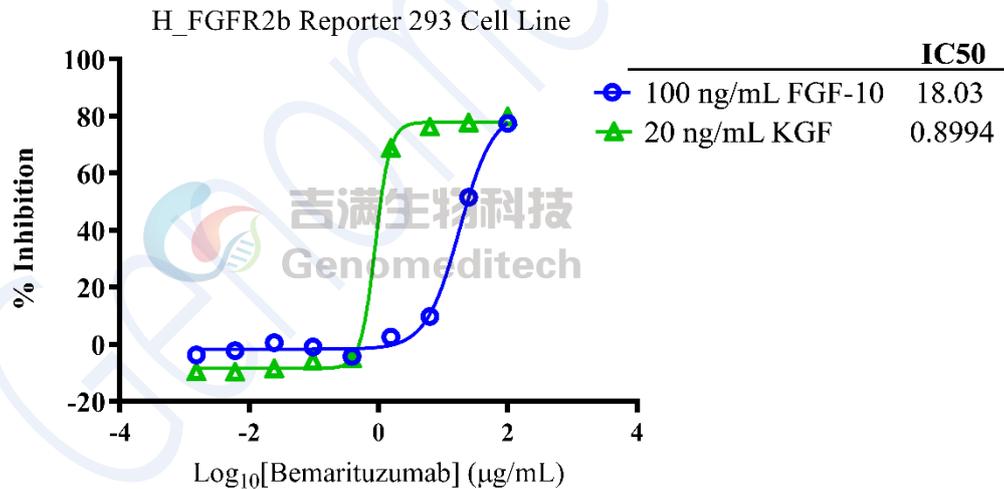


Fig 3.抑制结果

附录 1 流式验证结果

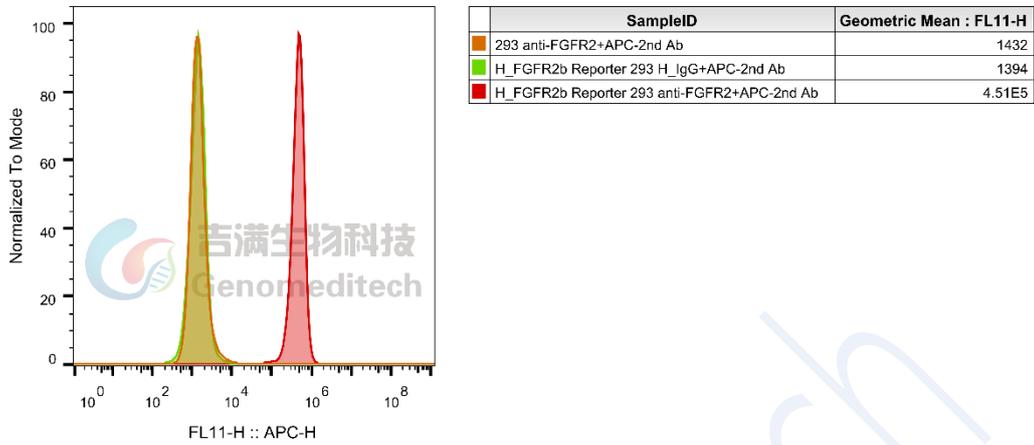


Fig 4.使用 Anti-FGFR2 hIgG1 Reference Antibody (Bemabio) (Genomeditech/ GM-88057MAB)抗体流式验证结果

相关产品

CLDN18	
Cynomolgus_CLDN18.2-eGFP CHO-K1 Cell Line	H_CLDN18(isoform2)-eGFP 293 Cell Line
H_CLDN18.1-eGFP HEK-293 Cell Line	H_CLDN18.2 MC38 Cell Line
H_CLDN18.2 MKN45 Cell Line(High Expression)	H_CLDN18.2 MKN45 Cell Line(Low Expression)
H_CLDN18.2 MKN45 Cell Line(Medium Expression)	H_CLDN18.2(isoform2) CHO-K1 Cell Line
H_CLDN18.2-eGFP CT-26 Cell Line	Mouse_CLDN18.2-eGFP CHO-K1 Cell Line
Rat_CLDN18.2-eGFP CHO-K1 Cell Line	Rhesus_CLDN18.2-eGFP CHO-K1 Cell Line
Anti-CLDN18.2 hIgG1 Reference Antibody (IMAB362)	Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody(LM-102)
Anti-CLDN18.2 hIgG1 Antibody(Zolbetuximab)	
TROP2(TACSTD2)	
Cynomolgus_Trop2 CHO-K1 Cell Line	Cynomolgus_TROP2 HEK-293 Cell Line
H_TROP2 CHO-K1 Cell Line	H_TROP2 CT26 Cell Line
H_TROP2 HEK-293 Cell Line	H_TROP2 LLC1 Cell Line
H_TROP2 MC38 Cell Line	
Anti-H_TROP2 hIgG1 Antibody(Datopotamab)	Anti-TROP2 hIgG1 Antibody(Hu2G10-5)
Anti-Trop2 hIgG1 Reference Antibody (Sacbio)	Anti-Trop2 hIgG1 Reference Antibody(Datbio)
Anti-Trop2-DXD ADC(Dar4)[Datopotamab deruxtecan,Dato-DXD]	Anti-Trop2-SN38 ADC(Dar8)[Sacituzumab govitecan]
Biotinylated Cynomolgus TROP2 Protein; His-Avi Tag	Biotinylated Human TROP2 Protein; His-Avi Tag
Human TROP2 Protein; His Tag	
GUCY2C(GC-C)	
Cynomolgus_GUCY2C HEK-293 Cell Line	H_GUCY2C CHO-K1 Cell Line
H_GUCY2C HEK-293 Cell Line	

Anti-H_GUCY2C hIgG1 Antibody(Indusatumab)	
FGFR2	
Cynomolgus_FGFR2b HEK-293 Cell Line	H_FGFR2b CHO-K1 Cell Line
H_FGFR2b HEK-293 Cell Line	Mouse_FGFR2b HEK-293 Cell Line
Anti-FGFR2 hIgG1 Antibody(hFR2-14_H12-L1)	Anti-FGFR2 hIgG1 Referece Antibody (Bemabio)
Cynomolgus FGFR2(IIIb) D1-D3 Protein; His Tag	Human FGFR2(IIIb) D1-D3 Protein; hFc Tag
Human FGFR2(IIIb) D2-D3 Protein; hFc Tag	Human FGFR2(IIIb) D2-D3 Protein; His Tag
Human FGFR2(IIIc) D1-D3 Protein; His Tag	Mouse FGFR2(IIIb) D2-D3 Protein; His Tag
CD44	
H_CD44s CHO-K1 Cell Line	H_CD44v6 CHO-K1 Cell Line
H_CD44v6 CHO-K1 Cell Line (Medium Expression)	H_CD44v6 HEK-293 Cell Line
Anti-CD44v6 hIgG1 Antibody(bivatuzumab)	
ADC Related Product	
Anti-DXD Mouse IgG1 Antibody (23E21C5)	Anti-DXD Mouse IgG1 Antibody (4A5A12)
Anti-Dxd Mouse IgG2a Antibody (17D6A4)	Anti-Eribulin Mouse IgG2a Antibody (10F8G4)
Anti-MMAE Mouse IgG1 Antibody (11C10E3)	Anti-MMAE Mouse IgG2a Antibody (17A1K11)
Anti-MMAE Mouse IgG2a Antibody (8F6A3)	Anti-SN38 Mouse IgG1 Antibody(59H11C7)
Mouse anti Human IgG1-DXD(Dar8)	Mouse anti Human IgG1-MMAE(Dar4)
Human IgG1 Isotype-DXD (Dar8)	Human IgG1 Isotype-Eribulin (Dar4)
Human IgG1 Isotype-MMAE (Dar4)	
Recombinant DT3C Protein	

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。