

产品手册

H_VEGF Reporter 293 Cell line

H_VEGF Reporter 293 细胞

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.11.1

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.	VEGF121 验证实验.....	7
1)	细胞准备.....	7
2)	药物准备.....	7
3)	加样步骤.....	8
4)	报告基因检测.....	8
5)	验证结果.....	9
2.	VEGF165 验证实验.....	10
1)	细胞准备.....	10
2)	药物准备.....	10
3)	加样步骤.....	11
4)	验证结果.....	11
3.	VEGF165 激活；Bevacizumab 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 1	VEGFR2 竞争实验.....	15
附录 2	传代稳定性.....	15
相关产品清单	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-C09057	H_VEGF 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-C09057	H_VEGF 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

在正常生理学中，血管内皮生长因子（VEGF）对血管再生起着至关重要的作用。但在肿瘤细胞中，VEGF 可以激活血管生成，从而使肿瘤具有超强的生长能力。

VEGF 通过与 VEGF 受体酪氨酸激酶结合来激活内皮细胞中的 VEGF 信号，从而刺激内皮细胞的增殖和存活，增加血管的通透性，维持肿瘤的生长代谢。KDR（Kinase Insert Domain Receptor），其编码 VEGFR2 受体。以 VEGF 及其受体信号转导通路为靶点的血管生成抑制剂在抗肿瘤疗法中应用广泛，近年来，科学家还在开发一系列靶向 VEGF 及免疫检查点的联合治疗方法。

H_VEGF Reporter 293 Cell Line 是基于转录因子信号通路构建的 Luciferase 报告基因细胞系。当 VEGF 结合 VEGFR2 受体后，激活转录因子信号通路，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 VEGF 相关药物的体外效果评价。

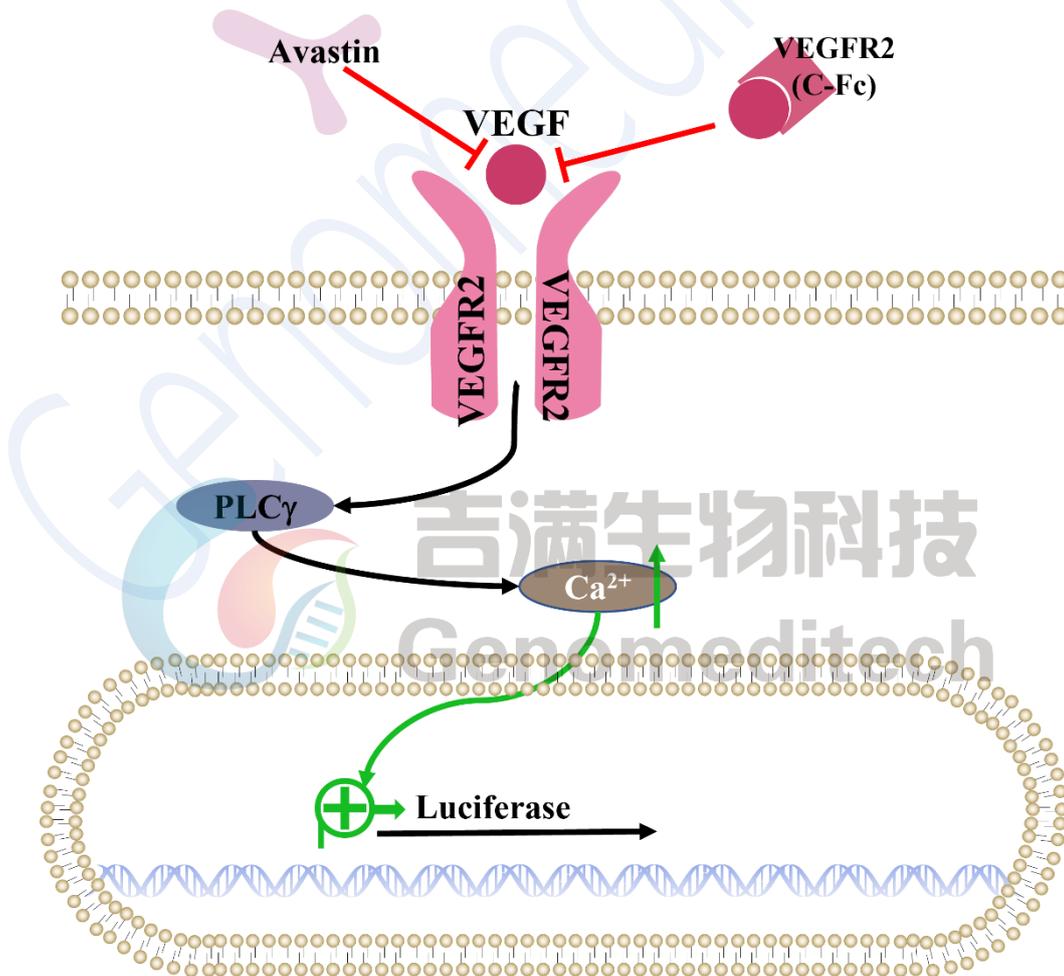


Fig 1.原理示意图

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+400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418
细胞冻存液:	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.
G418	10 mg	Genomeditech/GM-040402-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
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	96-well	Corning/3912
Not Treated Microplate		
Human VEGF 121	10 μg	Novoprotein/C744
Human VEGF165	10 μg	Novoprotein/C083
Human KDR(VEGFR2)	10 μg	Novoprotein/CJ92
Anti-VEGF Antibody(Bevacizumab)	hIgG1 /	Genomeditech/GM-51978AB
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C

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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

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。

六、 使用方法

针对本产品,使用 VEGF121(Novoprotein/C744; 14.2kDa)、VEGF165(Novoprotein/C083; 19.1kDa) 进行功能激活实验,使用 VEGFR2 (Novoprotein/CJ92; 110.4kDa) 进行药物竞争实验,使用 Avastin (Bevacizumab) 进行 Block 实验。针对不同样品,可调整优化操作步骤以获得更好的结果。

1. VEGF121 验证实验

操作步骤可调整优化,对于本实验,推荐 H_VEGF Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。VEGF121(14.2 kDa)作为阳性药物,Conc.1 浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$, 4 倍梯度稀释,Conc.1-Conc.9 分别排布在 B2-B10, B11 为 0 浓度对照。周围为 $100 \mu\text{L}$ 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	VEGF121	1 $\mu\text{g/mL}$	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	15.26 pg/mL	0	PBS
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D												
E												
F												
G												
H												

1) 细胞准备

在实验前 20-24 h,将细胞从培养瓶中消化下来,以新鲜培养基重悬细胞,检测细胞活力并计数。离心(根据不同细胞可调整转速)收集细胞,再以新鲜培养基调整细胞浓度为 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上班盖,于孵箱中孵育过夜。

2) 药物准备

- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品,使用一行(如 B 行,单重复可以检测 6 个药物)。

c) 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。以 VEGF121 为例, 如 B2 孔中加入 145.2 μL 的 Assay buffer (基础培养基含 1% FBS), B3-B11 加入 110 μL 的 Assay Buffer。

d) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
VEGF121	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	/	直接使用储液

e) 吸取 1.47 μL 待测样品母液, 加入到第一个梯度稀释孔中 (如 B2), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 36.7 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 VEGF121	加入	145.2 μL	110 μL									
C													
D													
E													
F													
G													
H													

f) 从第一个梯度稀释孔 (如 B2) 中吸取 36.7 μL 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 B3), 充分混匀。对于不同浓度的药物, 首孔加入药物量不同, 首孔后的梯度稀释操作是相同的, 可以使用排枪进行实验。

g) 以此类推, 直至 B10 孔, B11 为不加抗体的对照。

h) 将装有稀释好的药物的多孔板盖上盖板。

3) 加样步骤

- 步骤 1 接种过夜的靶细胞, 每孔吸弃 100 μL 培养基。
- 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 100 μL 。
- 盖上检测板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 7 h。
- 收样检测 Luciferase。

4) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

5) 验证结果

H_VEGF Reporter 293 Cell Line	PBS Control	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15.26 pg/mL
	7034	472621	6958

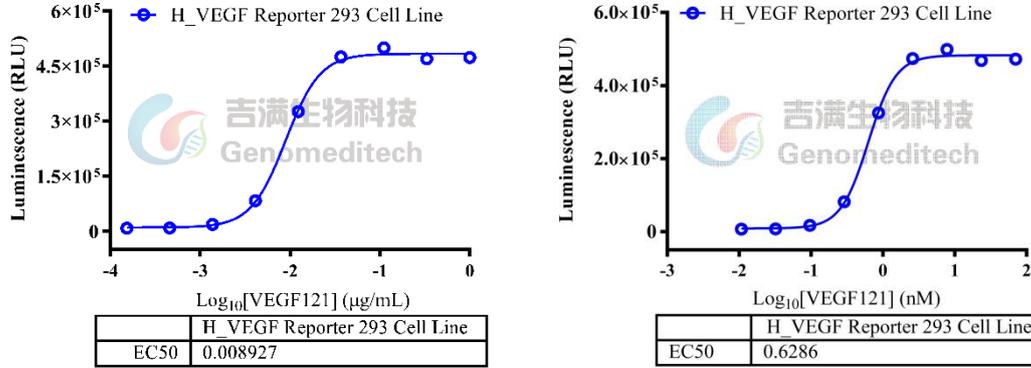


Fig.功能验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制；使用 Luciferase Assay Kit（Genomeditech/GM-040501A）检测）

2. VEGF165 验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_VEGF Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。VEGF165(19.1kDa)作为阳性药物，Conc.1 浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.1-Conc.9 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围为 $100 \mu\text{L}$ 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	VEGF165	1 $\mu\text{g/mL}$	333.33 ng/mL	111.11 ng/mL	37.04 ng/mL	12.35 ng/mL	4.12 ng/mL	1.37 ng/mL	457.25 pg/mL	152.42 pg/mL	0	PBS
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D												
E												
F												
G												
H												

1) 细胞准备

在实验前 16-24 h，将细胞从培养瓶中消化下来，以新鲜培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数。离心 (根据不同细胞可调整转速) 收集细胞，再以新鲜培养基调整细胞浓度为 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。

2) 药物准备

- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品，使用一行 (如 B 行，单重复可以检测 6 个药物)。
- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。以 VEGF165 为例，如 B2 孔中加入 $163.35 \mu\text{L}$ 的 Assay buffer (基础培养基含 1% FBS)，B3-B11 加入 $110 \mu\text{L}$ 的 Assay Buffer。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
VEGF165	$100 \mu\text{g/mL}$	/	直接使用储液

- 吸取 $1.65 \mu\text{L}$ 待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中 (如 B2)，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	1.65 μL VEGF121	加入	163.35 μL	110 μL									
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- f) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 55 μL 液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 B3），充分混匀。对于不同浓度的药物，首孔加入药物量不同，首孔后的梯度稀释操作是相同的，可以使用排枪进行实验。
- g) 以此类推，直至 B10 孔，B11 为不加抗体的对照。
- h) 将装有稀释好药物的多孔板盖上盖板。

3) 加样步骤

- a) 步骤 1 接种过夜的靶细胞，每孔吸弃 100 μL 培养基。
- b) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 100 μL 。
- c) 盖上检测板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- d) 收样检测 Luciferase。

4) 验证结果

H_VEGF Reporter 293 Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	152.42 $\mu\text{g/mL}$
	1650	15594	1879

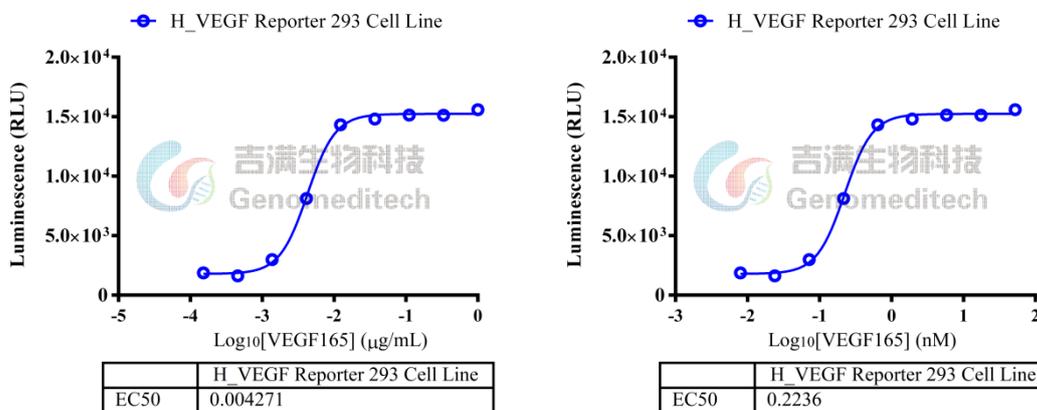


Fig. 功能验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制；使用 Luciferase Assay Kit (Genomeditech/GM-040501A) 检测）

3. VEGF165 激活; Bevacizumab 抑制实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 H_VEGF Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 Cells/孔。使用 Anti-VEGF hIgG1 Antibody(Bevacizumab) (以下简称为 Bevacizumab;150 kDa)作为阳性药物, Conc.01 终浓度为 $3 \mu\text{g/mL}$, 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 $100 \mu\text{L}$ 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	Bevacizumab	PBS	3 $\mu\text{g/mL}$	750 ng/mL	187.5 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	0
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D													
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 16-24 h, 离心收集 H_VEGF Reporter 293 Cell Line, 以完全培养基重悬细胞, 计算细胞密度及活力, 通过补加完全培养基的方式调整细胞浓度到 1.5×10^5 cells/mL。以排枪加 $100 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ 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
Bevacizumab	1.05 mg/mL	/	直接使用储液
VEGF165	100 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	取 2 μL 储液+18 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 $72.91 \mu\text{L}$ Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 $55 \mu\text{L}$ 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 $0.42 \mu\text{L}$ Bevacizumab), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.33 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.42 μL Bevacizumab	加入	72.91 μL	55 μL									
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.33 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) 配置 2 \times 激活剂，10 ng/mL VEGF165 (1.83 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ VEGF165 母液加入到 1829.5 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 55 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 孵育过夜的细胞孔，吸弃上清 100 μL 。
- l) 然后加入步骤 j 孵育好的混合溶液，每孔 100 μL ，盖上盖板，继续孵育 6 h。
- m) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_VEGF Reporter 293 Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$ + 5 ng/mL VEGF165	3 $\mu\text{g/mL}$ + 5 ng/mL VEGF165	45.78 pg/mL + 5 ng/mL VEGF165
	30084	4629	31540

3) 验证结果

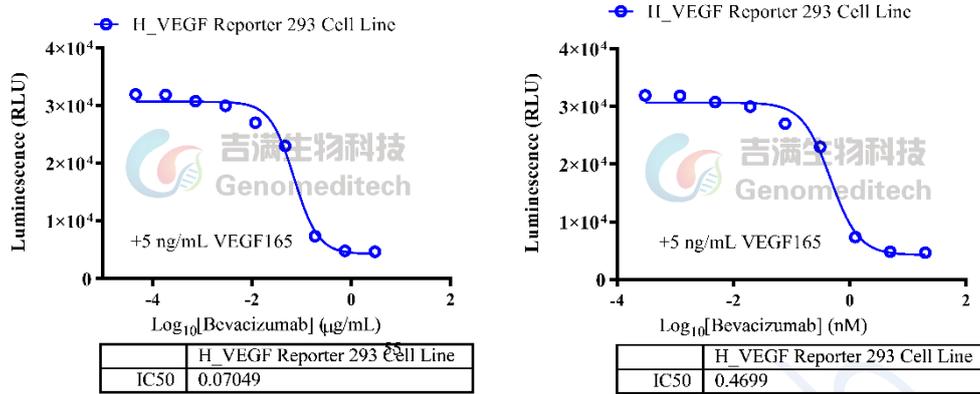


Fig 4. 功能验证结果

(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 VEGFR2 竞争实验

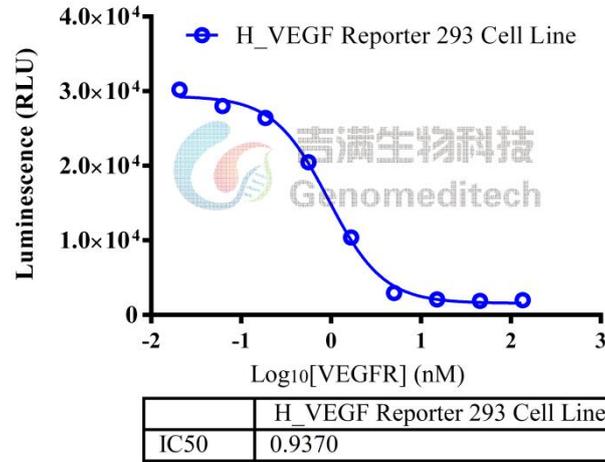


Fig 5. 功能验证结果 (激动剂为 10 ng/ml VEGF 165)

附录 2 传代稳定性

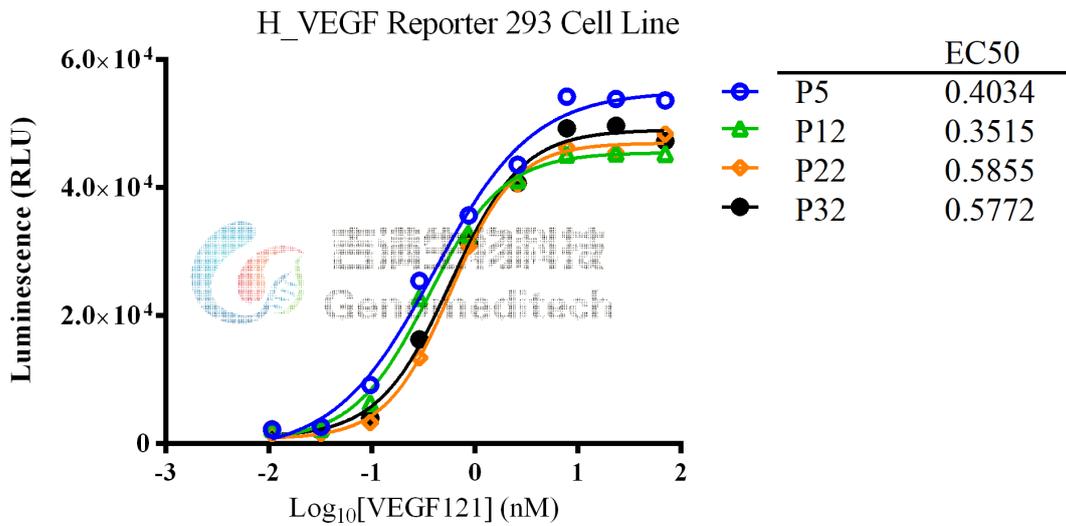


Fig 6. 使用 VEGF121 验证功能细胞传代稳定性的结果

相关产品清单

VEGF	
H_VEGF Reporter 293 DDX35TM Cell Line	
Anti-VEGF hIgG1 Antibody(Bevacizumab)	Anti-VEGF hIgG1 Reference Antibody (Bevbio)

使用许可协议:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech