

## 产品手册

### H\_ACVR2A Reporter Cell Line

### H\_ACVR2A Reporter 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.9.5

## 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.	GDF-8 蛋白激活实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	8
2.	GDF-8 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.....	10
3.	Activin A 激活实验.....	11
1)	加样步骤.....	11
2)	报告基因检测.....	12
3)	验证结果.....	12
4.	Activin A 激活, Bimagrumab 抑制实验.....	13
1)	加样步骤.....	13
2)	报告基因检测.....	14
3)	验证结果.....	14
附录 1:	流式验证结果.....	15
附录 2:	ACVR2B KO 结果.....	15
附录 3:	稳定性验证结果.....	16
使用许可协议:	.....	17

## 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-C28074	H_ACVR2A Reporter Cell Line	5E6 Cells/mL

### 组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C28074	H_ACVR2A Reporter 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

激活素 II 型受体(ActRII)包括ActRIIA (ACVR2A)和ActRIIB(ACVR2B)两种不同受体, 它们属于转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 受体家族的成员, 是包括活化素A(Activin A)和活化素B(Activin B)及BMP7、BMP9、BMP10、GDF1、GDF8(myostatin)、 GDF11和Nodal在内的其他TGF- $\beta$ 家族成员的II型号受体。 ALK4和ALK7分别是活化素A和活化素B的主要I型TGF- $\beta$ 受体家族成员。 Bimagrumab 是一种人源单克隆抗体, 可阻断激活素 II 型受体 (ActRII), 从而对骨骼肌生长进行调节。据研究发现, Bimagrumab与ActRIIB、ActRIIA均具有亲和力, 但与ActRIIB的亲和力至少比与ActRIIA强200倍。

吉满生物H\_ACVR2A Reporter Cell Line是一种Luciferase报告基因细胞系。在吉满生物Activin A Reporter Cell Line (Genomeditech/GM-C26082) 的基础上, 将 ACVR2B基因敲除, 因此GDF8、Activin A等蛋白只能结合ACVR2A激活下游信号通路。通过加入特定的拮抗型抗体, 阻断由此激活的下游信号通路, 随后, 通过测定荧光信号确定荧光素酶 (Luciferase) 的表达, 间接评估拮抗剂对信号通路的影响程度, 因此, 此细胞可便捷、灵敏、特异性的筛选和验证靶向ActRIIA (ACVR2A)的拮抗型药物。

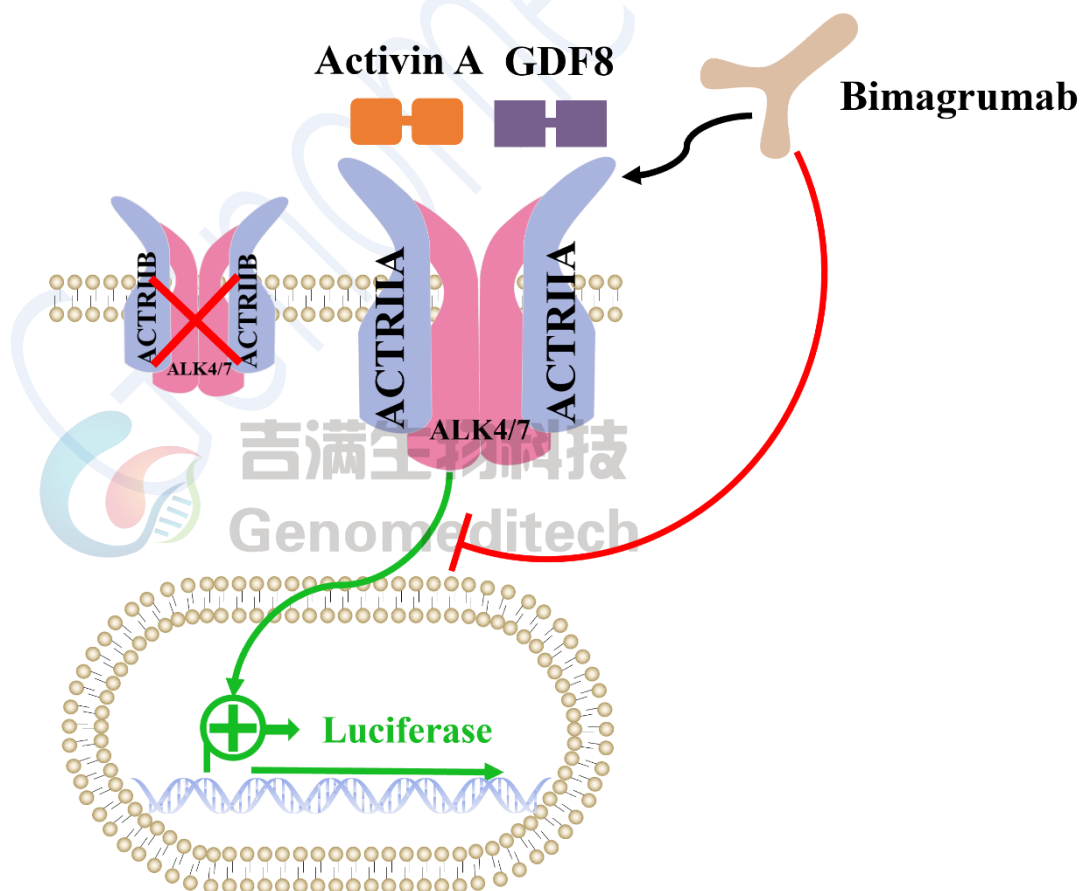


Fig 1.作用原理

## 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+400 µg/mL G418+125 µg/mL Hygromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	DMEM+1% FBS+1% P.S

注意：此细胞对抗生素非常敏感，应使用吉满配套的细胞生长培养基。

### 2. 试剂耗材准备

#### 试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
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 White Flat Bottom Polystyrene Not Treated	96-well	Corning/3912
Microplate		
Recombinant Human/Mouse/Rat GDF-8	10 µg	Novoprotein /CJ43
Human Activin A Protein; His Tag	/	Genomeditech/GM-87616RP
Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Fab-17G05)	/	Genomeditech/GM-82350AB
Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Bimagrumab)	/	Genomeditech/GM-51148AB
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

- 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 × 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 × 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  $5 \times 10^6$  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,当细胞密度大于 80%,即可进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4, 2-3 天传代。
- 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 × 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,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。
- 此细胞在 ACVR2B 敲除母细胞的基础上进行构建,敲除母细胞含有 **Blasticidin**、**Puromycin** 抗性基因。

## 六、使用方法

### 1. GDF-8 蛋白激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_ACVR2A Reporter Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human/Mouse/Rat GDF-8（以下简称 GDF-8；13.1 KDa）作为阳性药物，Conc.01 浓度终为  $5 \mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.09 分别排在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围孔加入  $100 \mu\text{L}$  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	GDF-8	5 $\mu\text{g/mL}$	1.25 $\mu\text{g/mL}$	312.5 $\text{ng/mL}$	78.13 $\text{ng/mL}$	19.53 $\text{ng/mL}$	4.88 $\text{ng/mL}$	1.22 $\text{ng/mL}$	305.18 $\text{pg/mL}$	76.29 $\text{pg/mL}$	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  $1.5 \times 10^5$  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）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
GDF-8	$200 \mu\text{g/mL}$	/	直接使用储液

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入  $143 \mu\text{L}$  的 Assay buffer，B3-B11 加入  $110 \mu\text{L}$  的 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  $3.67 \mu\text{L}$  GDF-8）。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 36.67 $\mu\text{L}$ 加入次孔										对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	3.67 $\mu\text{L}$ GDF-8	加入	143 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- g) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 36.67  $\mu\text{L}$  液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 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 孵育过夜的细胞孔板取出，吸弃上清。
- j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 100  $\mu\text{L}$ 。
- k) 盖上检测板盖，于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 7 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_ACVR2A Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	76.29 $\mu\text{g/mL}$
	181108	2957284	182532

## 3) 验证结果

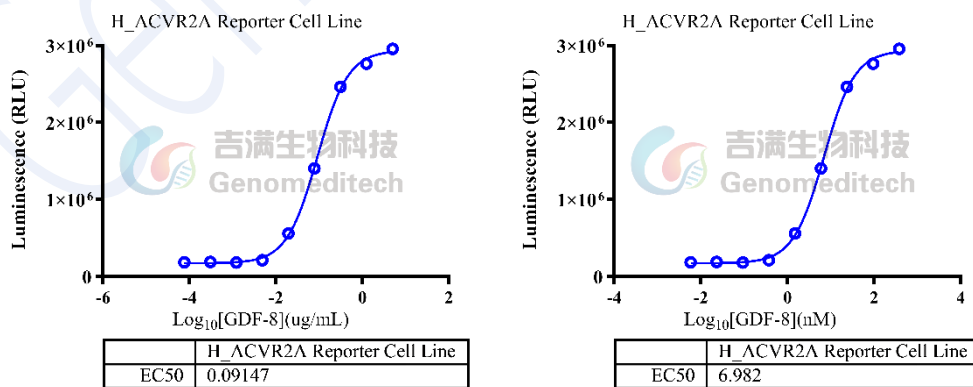


Fig 2. 功能验证结果（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）



## 2. GDF-8 激活, Bimagrumab 抑制实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 H\_ACVR2A Reporter Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  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  $30 \mu\text{g/mL}$ , 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.11 分别排在 B1-B11, B12 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	Bimagrumab $30 \mu\text{g/mL}$	$7.5 \mu\text{g/mL}$	$1.88 \mu\text{g/mL}$	$468.75 \text{ ng/mL}$	$117.19 \text{ ng/mL}$	$29.3 \text{ ng/mL}$	$7.32 \text{ ng/mL}$	$1.83 \text{ ng/mL}$	$457.76 \text{ pg/mL}$	$114.44 \text{ pg/mL}$	$28.61 \text{ pg/mL}$	0
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D												
E												
F												
G												
H												

### 1) 加样步骤

- 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  $1.5 \times 10^5$  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 B1-B11)。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
Bimagrumab	$3.15 \text{ mg/mL}$	/	直接使用储液
GDF-8	$200 \mu\text{g/mL}$	$20 \mu\text{g/mL}$	取 $2 \mu\text{L}$ 储液+ $18 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B1 孔加入  $71.94 \mu\text{L}$  Assay Buffer, B2-B12 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  $1.4 \mu\text{L}$  Bimagrumab), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.33 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	1.4 $\mu\text{L}$ Bimagrumab	71.94 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B1 中吸取 18.33  $\mu\text{L}$ ，加入到第二个梯度稀释孔 B2，混匀。
- h) 以此类推，直至第 11 个梯度稀释孔 (B11)。
- i) 配置 2 $\times$  激活剂: 200 ng/mL GDF-8 (7.4  $\mu\text{L}$  20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GDF-8 母液加入到 732.6  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  的 GDF-8 蛋白溶液。盖上盖板，继续孵育 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_ACVR2A Reporter Cell Line	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	28.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	803743	176481	856247

## 3) 验证结果

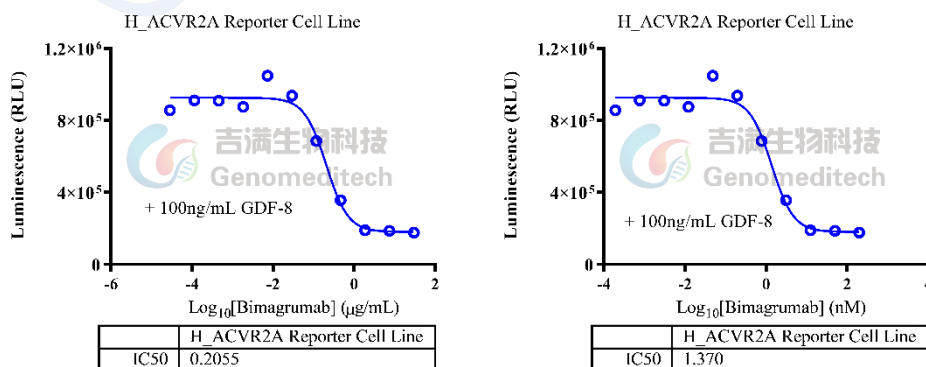


Fig 3. 功能验证结果

(右图对抗体进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

### 3. Activin A 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_ACVR2A Reporter Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 Human Activin A Protein; His Tag（以下简称 Human Activin A; 13 KDa）作为阳性药物，Conc.01 浓度终为 200 ng/mL，5 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.08 分别排布在 B2-B9，B10 为 0 浓度对照。周围孔加入 100  $\mu$ 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	
B	Human Activin A	200 ng/mL	40 ng/mL	8 ng/mL	1.6 ng/mL	320 pg/mL	64 pg/mL	12.8 pg/mL	2.56 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  $1.5 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加 100  $\mu$ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100  $\mu$ L PBS。盖上板盖，于孵箱中孵育过夜。
- 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）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Human Activin A	1.2 mg/mL	0.12 mg/mL	取 2 $\mu$ L 储液+18 $\mu$ L Assay Buffer

- 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 137.27  $\mu$ L 的 Assay buffer，B3-B10 加入 110  $\mu$ L 的 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 0.23  $\mu$ L Human Activin A）。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 27.5 $\mu$ L 加入次孔									对照孔		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	0.23 $\mu$ L Human Activin A	加入	137.27 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L		
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 (如 B2) 中吸取 27.5  $\mu$ L 液体, 加入到第二个梯度稀释孔中 (如 B3), 充分混匀。
- h) 以此类推, 直至第 8 个梯度稀释孔 (B09)。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出, 吸弃上清。
- j) 将之前准备好的梯度稀释液每孔加入 100  $\mu$ L。
- k) 盖上检测板盖, 于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_ACVR2A Reporter Cell Line	0 ng/mL	200 ng/mL	2.56 pg/mL
	177534	2405625	189603

## 3) 验证结果

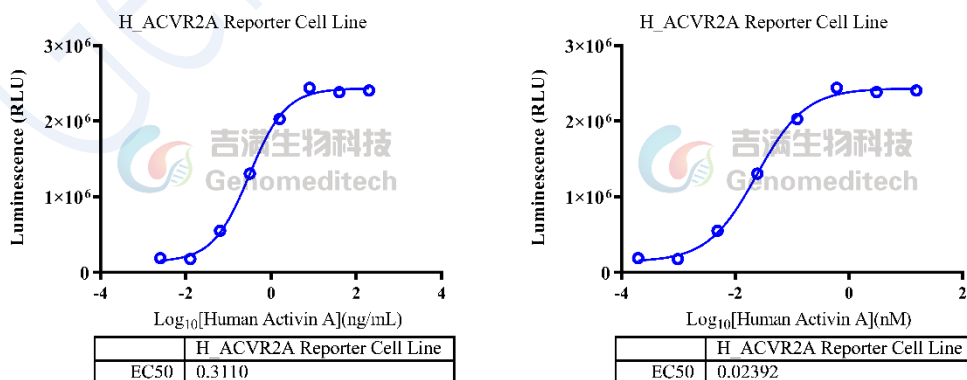


Fig 4. 功能验证结果 (右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制)

## 4. Activin A 激活, Bimagrumab 抑制实验

操作步骤可调整优化, 对于本实验, 推荐 H\_ACVR2A Reporter Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  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  $30 \mu\text{g/mL}$ , 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排在 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	Bimagrumab	PBS	30 $\mu\text{g/mL}$	7.5 $\mu\text{g/mL}$	1.88 $\mu\text{g/mL}$	468.75 $\text{ng/mL}$	117.19 $\text{ng/mL}$	29.3 $\text{ng/mL}$	7.32 $\text{ng/mL}$	1.83 $\text{ng/mL}$	457.76 $\text{pg/mL}$	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  $1.5 \times 10^5$  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
Bimagrumab	2.174 mg/mL	/	直接使用储液
Human Activin A	1.2 mg/mL	1.2 $\mu\text{g/mL}$	取 2 $\mu\text{L}$ 储液+1998 $\mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入  $71.31 \mu\text{L}$  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  $2.02 \mu\text{L}$  Bimagrumab), 混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.33 $\mu$ L, 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	2.02 $\mu$ L Bimagrumab	加入	71.31 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 18.33  $\mu$ L, 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: 10 ng/mL Human Activin A (6.1  $\mu$ L 1.2  $\mu$ g/mL Activin A 母液加入到 727.2  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 的 Human Activin A 蛋白溶液。盖上盖板, 继续孵育 6 h。
- l) 收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_ACVR2A Reporter Cell Line	0 $\mu$ g/mL	30 $\mu$ g/mL	457.76 pg/mL
	1840711	113491	1798883

## 3) 验证结果

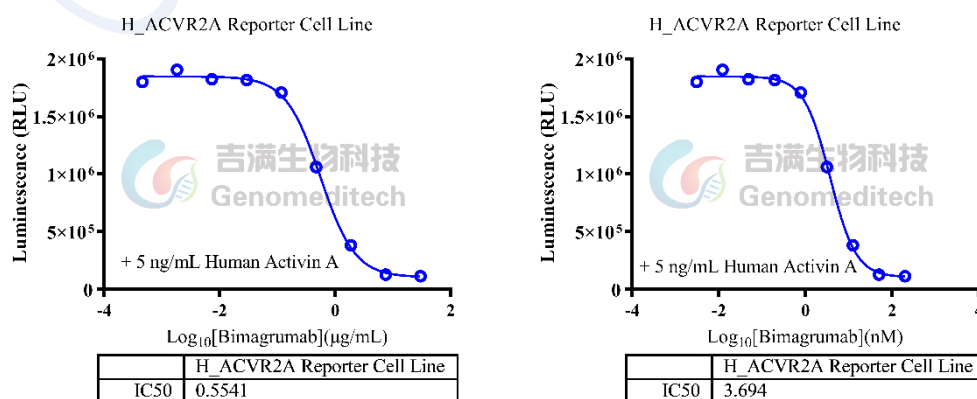


Fig 5. 功能验证结果

(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: 流式验证结果

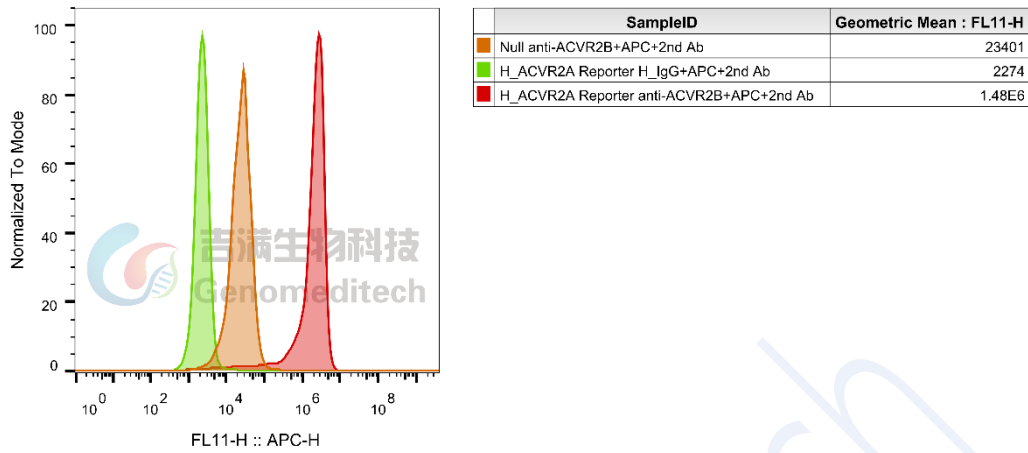


Fig 6. H\_ACVR2A Reporter Cell Line 细胞使用 Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Bimagrumab)  
(Genomeditech/GM-51148AB) 流式验证结果

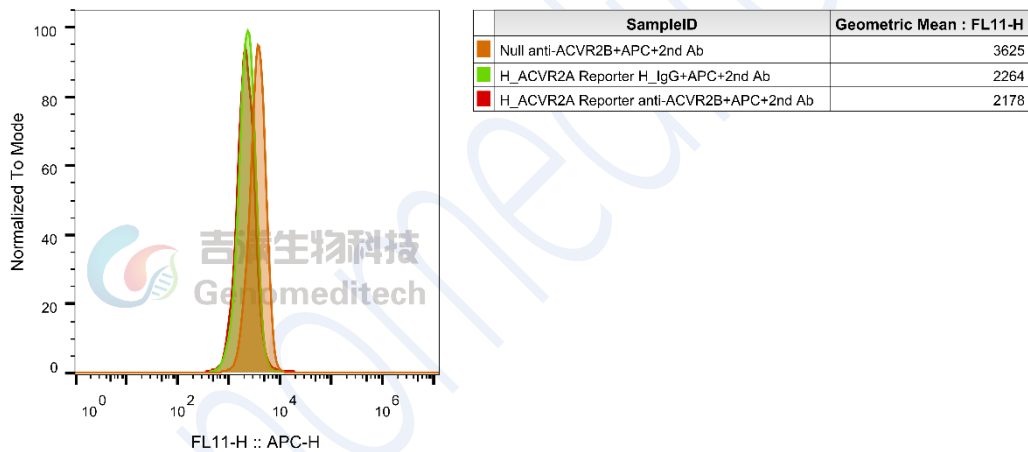


Fig 7. H\_ACVR2A Reporter Cell Line 细胞使用 Anti-ACVR2B hIgG1 Antibody(Fab-17G05)  
(Genomeditech/GM-82350AB) 流式验证结果

## 附录 2: ACVR2B KO 结果



Fig 8. ACVR2B KO 母细胞 Sanger 测序结果



### 附录 3: 稳定性验证结果

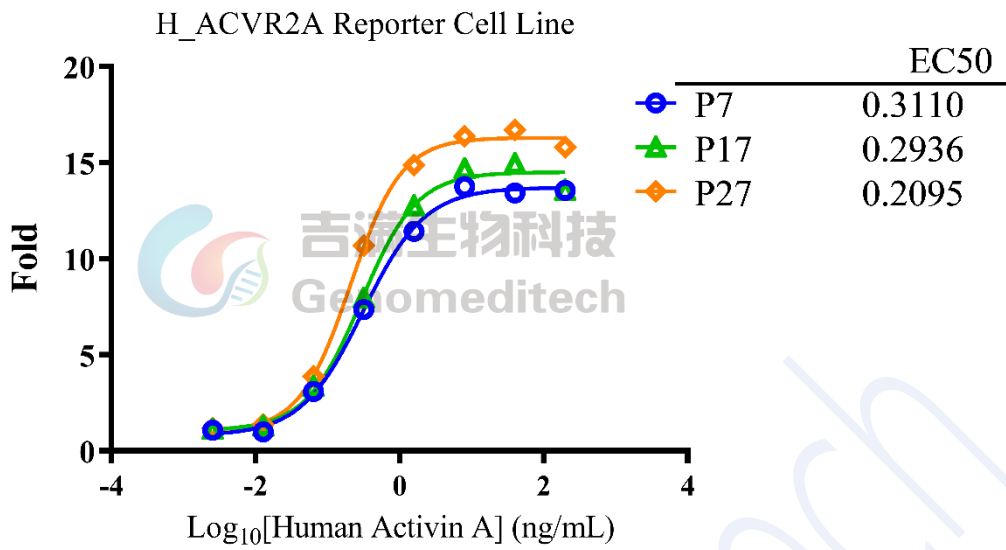


Fig 9. H\_ACVR2A Reporter Cell Line (Genomeditech/GM-C28074) 使用 Human Activin A Protein; His Tag (Genomeditech/GM-87616RP) 稳定性验证结果

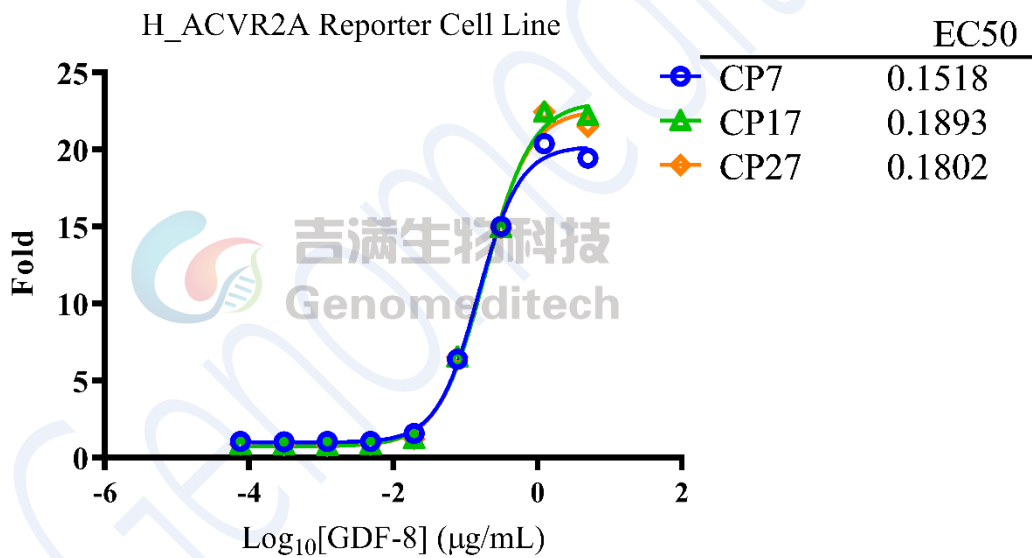


Fig 10. H\_ACVR2A Reporter Cell Line (Genomeditech/GM-C28074) 使用 Recombinant Human/Mouse/Rat GDF-8 (Novoprotein/CJ43) 稳定性验证结果



## 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