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

产品手册

H_VEGF Reporter 293 DDX35™ Cell Line

H_VEGF Reporter 293 DDX35™ 细胞系

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

版本号：V2.12.2

Genomeditech

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、 传代稳定性......5
五、 材料准备......6
1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备......6
2. 试剂耗材准备......6
六、 细胞复苏、传代、冻存......7
1. 细胞复苏......7
2. 细胞传代（以 10 cm 皿为例）......7
3. 细胞冻存......7
七、 使用方法（示例）......8
1. Assay 验证实验......8
1) 加样步骤......8
2) 报告基因检测......9
3) 验证结果......9
附录 1 流式稳定性验证......10
相关产品......10
使用许可协议：......11

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-C26018	H_VEGF Reporter 293 DDX35™ Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C26018	H_VEGF Reporter 293 DDX35™ 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。

吉满生物 H_VEGF Reporter 293 DDX35™ Cell Line 报告基因细胞系，是通过海量单克隆，多轮单克隆等筛选，获得的具有高稳定特性同时兼具高灵敏性、高倍率性的优选单克隆。可以满足客户批量建库、放行实验等标准。

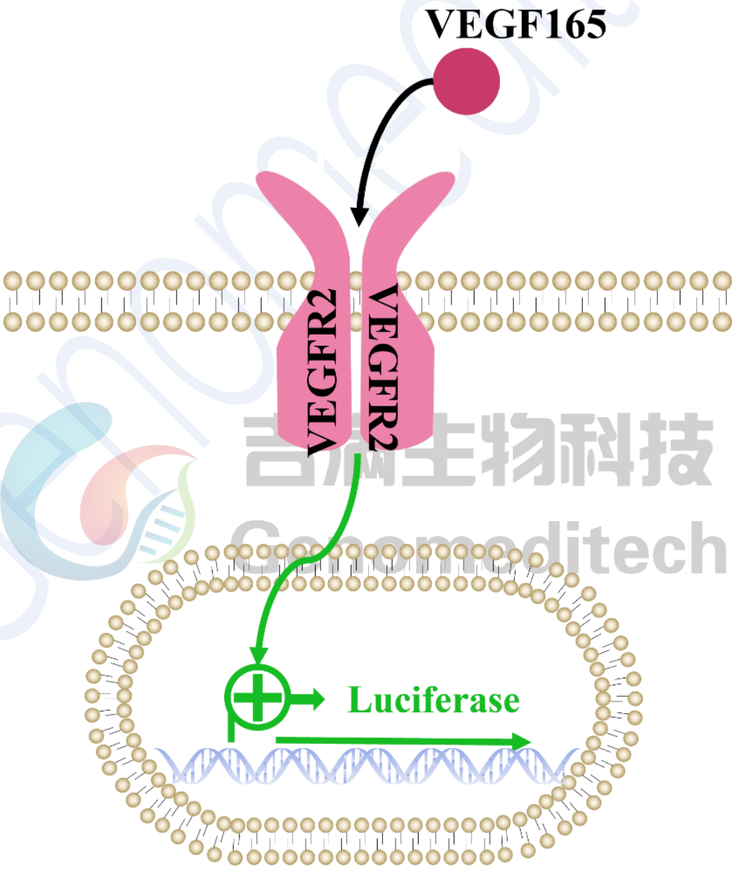


Fig 1.VEGF 信号通路图

四、 传代稳定性

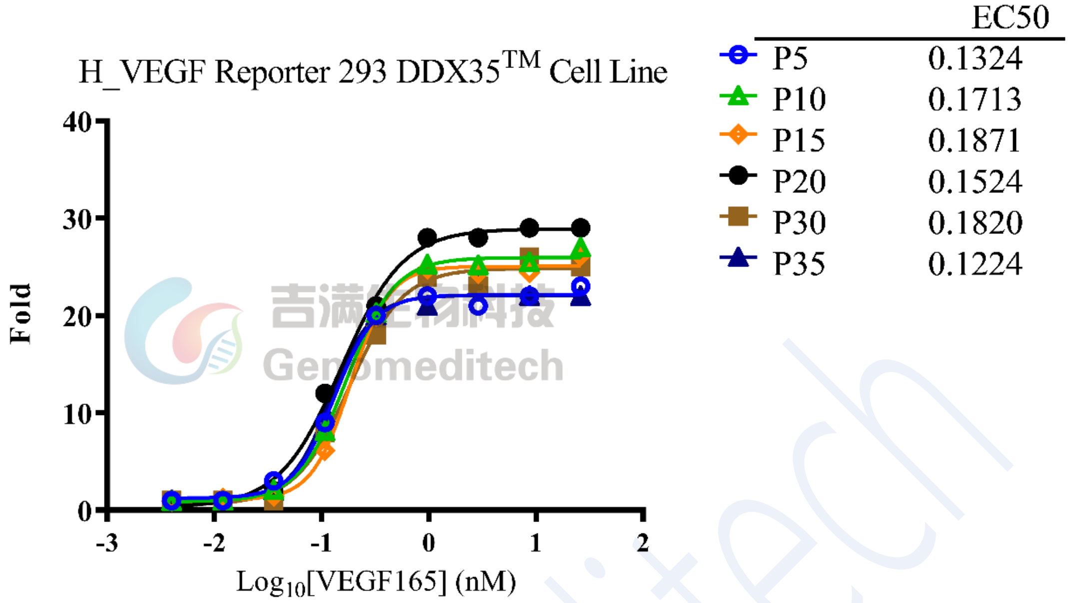


Fig 2. 制备 VEGF165 梯度稀释液；提前 16-24 h 配置 H_VEGF Reporter 293 DDX35™ Cell Line（Genomeditech/# GM-C26018），每孔细胞量 1.8 ×10⁴ 个。将过夜培养的细胞吸弃上清，加入稀释好的 VEGF165，孵育 7 h 后检测 Luciferase 数值，使用 GraphPad 系统进行数据分析，纵坐标转换为倍率。结果显示，不同代次间倍率、EC50 数值稳定。

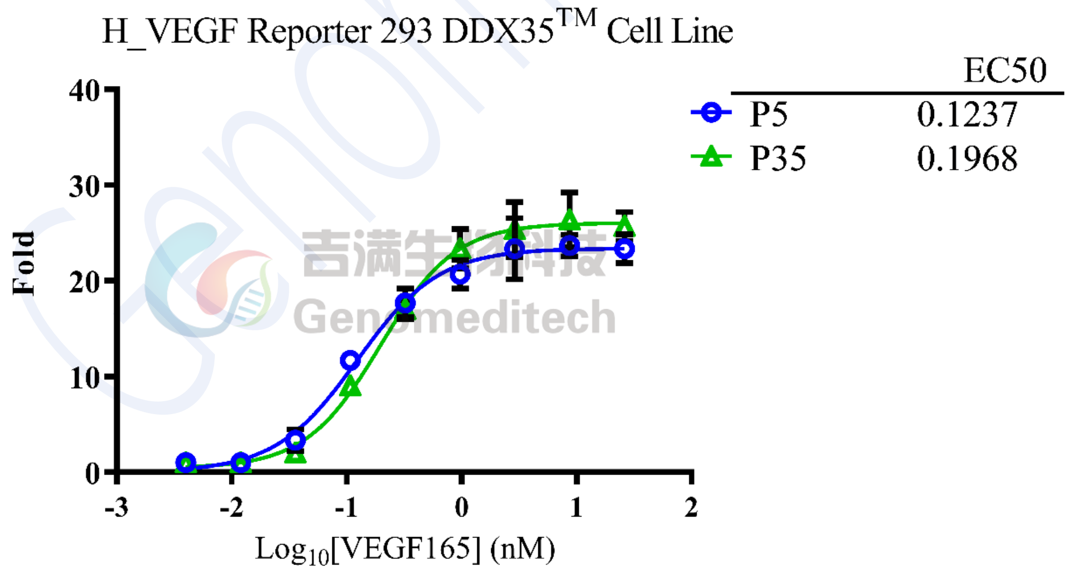


Fig 3. 制备 VEGF165 梯度稀释液；提前 16-24 h 配置 H_VEGF Reporter 293 DDX35™ Cell Line（Genomeditech/# GM-C26018），每孔细胞量 1.8 ×10⁴ 个。将过夜培养的细胞吸弃上清，加入稀释好的 VEGF165。3 复孔，孵育 7 h 后检测 Luciferase 数值，使用 GraphPad 系统进行数据分析，纵坐标转换为倍率。结果显示，P5 代与 P35 代倍率、EC50 数值稳定。

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

五、 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+400 μg/mL G418
细胞冻存培养基：	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
G418	1 g	Genomeditech/GM-040402-1
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
Recombinant Human VEGF165	/	Novoprotein/C083
Anti-VEGFR2 hIgG1 Antibody(ramucirumab)	/	Genomeditech/GM-80717AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	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

六、 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 5 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。

e) 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：

a) **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。**

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 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。**

七、 使用方法（示例）

1. Assay 验证实验

操作步骤可根据示例调整优化，对于本次实验，推荐 H_VEGF Reporter 293 DDX35™ Cell Line 细胞量为 1.8× 10^4 cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human VEGF165（19.1 kDa；以下简称 VEGF165）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 500 ng/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。周围孔加入 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	VEGF165	PBS	500 ng/ml	166.67 ng/ml	55.56 ng/ml	18.52 ng/ml	6.17 ng/ml	2.06 ng/ml	685.87 pg/ml	228.62 pg/ml	76.21 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 1.8 × 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) 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。

d) 母液准备

药物名称	储液	母液	配置方法
VEGF165	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 孔加入 164.18 µL Assay Buffer，B3-B10 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 B1 中加入 0.83 µL VEGF165），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 55 µL，加入次孔										对照组	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.83 µL VEGF165	加入	164.18 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	110 µL	

g) 从第一个稀释孔 B2 中吸取 55 µL，加入到第二个稀释孔 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) 加入梯度稀释好的药物，100 µL 每孔。

k) 盖上板盖，于 37 °C CO_2 培养箱中培养 7 h。

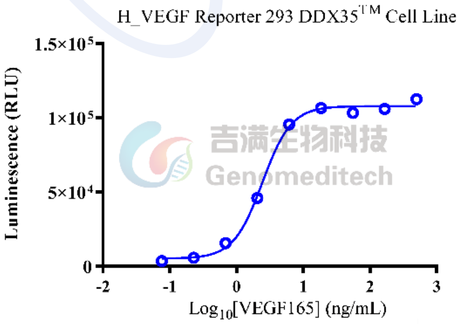
l) 使用报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

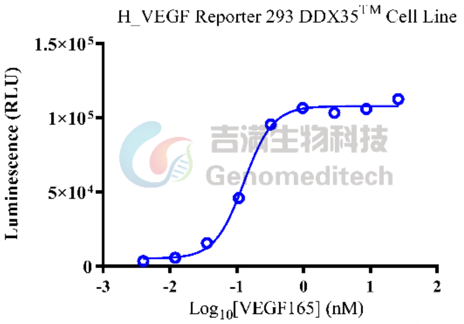
参考报告基因检测说明书。

H_VEGF Reporter 293 DDX35™ Cell Line	0 µg/mL	500 ng/ml	76.21 pg/ml
	4867	112576	3450

3) 验证结果



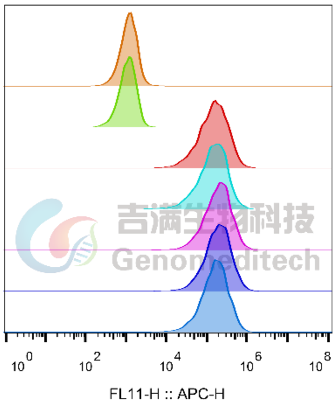
	H_VEGF Reporter 293 DDX35 TM
EC50	2.451



	H_VEGF Reporter 293 DDX35 TM
EC50	0.1283

Fig 4.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）。

附录 1 流式稳定性验证



SampleID	Geometric Mean : FL11-H
293 anti-VEGFR2+APC-2nd Ab	1173
H_VEGF Reporter 293 DDX35TM H_IgG+APC-2nd Ab	1084
H_VEGF Reporter 293 DDX35TM anti-VEGFR2+APC-2nd Ab CP5	142526
H_VEGF Reporter 293 DDX35TM anti-VEGFR2+APC-2nd Ab CP10	136427
H_VEGF Reporter 293 DDX35TM anti-VEGFR2+APC-2nd Ab CP20	178619
H_VEGF Reporter 293 DDX35TM anti-VEGFR2+APC-2nd Ab CP30	181853
H_VEGF Reporter 293 DDX35TM anti-VEGFR2+APC-2nd Ab CP35	154037

Fig 5.流式稳定性验证

使用 Anti-VEGFR2 hIgG1 Antibody(ramucirumab)(Genomeditech/GM-80717AB)抗体

相关产品

VEGF:VEGFR	
H_VEGF Reporter 293 Cell Line	H_VEGFR1 CHO-K1 Cell Line
H_VEGFR1 HEK-293 Cell Line	Membrane Bound H_VEGF165 CHO-K1 Cell Line
Anti-mouse VEGFR-2 mIgG2a Antibody(DC101)	Anti-mouse VEGFR-2 RIgG1 Antibody(DC101)
Anti-Mouse_PD1×VEGF hIgG1 Bispecific Antibody	Anti-VEGF hIgG1 Antibody(Bevacizumab)
Anti-VEGF hIgG1 Reference Antibody (Bevbio)	Anti-VEGF×PD1 hIgG1 Reference Antibody (Ivobio)
Biotinylated Human VEGFR2 Protein; His-Avi Tag	Human VEGF110 Protein; His Tag
Human VEGF121 Protein; His Tag	Human VEGF165 Protein; His Tag
Human VEGFR1 Protein; His Tag	Human VEGFR2 Protein; hFc Tag
Human VEGFR2 Protein; His Tag	Mouse VEGF120 Protein; His Tag
Mouse VEGF164 Protein; His Tag	Mouse VEGFR2 Protein; His Tag

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

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