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

产品手册

H_EGFR Reporter Cell Line

H_EGFR 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：V2.8.240524

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、 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. H_EGFR Reporter Cell Line 细胞复苏.....6
2. H_EGFR Reporter Cell Line 细胞传代.....6
3. H_EGFR Reporter Cell Line 细胞冻存.....6
六、 使用方法.....7
1. 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. 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
附录 1 流式验证结果.....12
使用许可协议：.....13

Genomeditech

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-C29969	H_EGFR 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-C29969	H_EGFR Reporter Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196℃

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

表皮生长因子受体（EGFR）是一种 I 型跨膜蛋白，是细胞外蛋白配体表皮生长因子家族（EGF 家族）成员的受体。EGFR 与配体结合诱导细胞质残基上的受体异二聚化和自磷酸化，激活细胞内的信号通路，促进细胞生长、分裂增殖和细胞存活。可通过阻断 EGFR 结合位点或通过抑制细胞内酪氨酸激酶活性来抑制 EGFR 信号传导。

当 EGFR 发生突变时，会导致 EGFR 信号通路在没有配体结合的情况下持续激活，从而导致细胞异常增殖。EGFR 突变在多种肿瘤中被发现，例如非小细胞肺癌、乳腺癌、结肠癌和头颈部鳞状细胞癌（HNSCC）等。

吉满生物 H_EGFR Reporter Cell Line 是一种 Luciferase 报告基因细胞系，当 EGF 与受体结合后，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 EGFR 相关药物的体外效果评价。

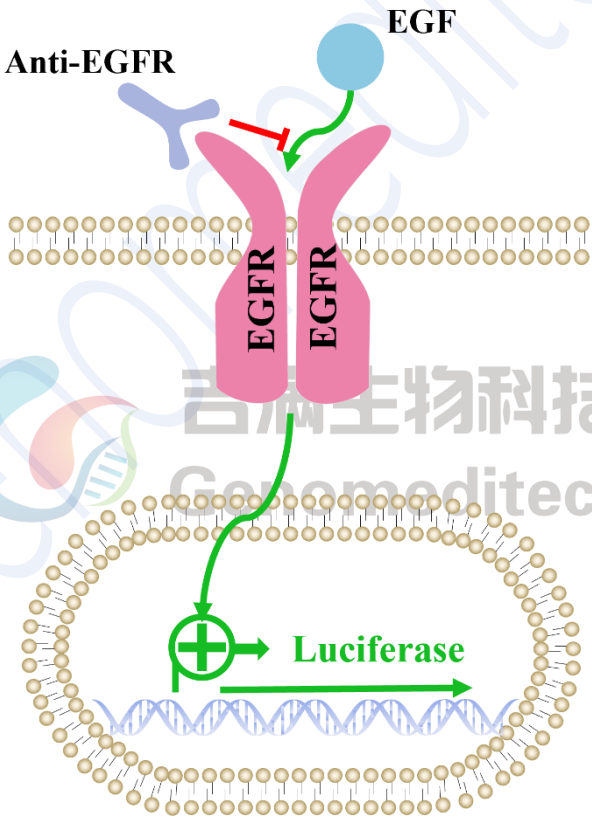


Fig.1 EGFR 通路示意图

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+0.75 μg/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.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
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
GMOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040503C
Recombinant Human EGF	100 μg	Beyotime /P5552-100μg
Anti-H_EGFR hIgG1 Antibody(Necitumumab)	/	Genomeditech/GM-49155AB

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. H_EGFR Reporter Cell Line 细胞复苏

a) 37℃水浴锅预热培养基，加入预热后的完全培养基 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℃恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。

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，800 rpm，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。

d) 使用 1 mL 完全培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞。

e) 通过补加完全培养基的形式，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。

2. H_EGFR Reporter Cell Line 细胞传代

a) 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。

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 左右完全培养液混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，800 rpm 室温离心 3 min。

e) 弃上清，细胞沉淀用完全培养液重悬，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%）。

3. H_EGFR Reporter Cell Line 细胞冻存

a) 使用 800 rpm，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℃下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

六、 使用方法

1. 激活实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_EGFR Reporter Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 Recombinant Human EGF（以下简称 H_ EGF；6.2 kDa）作为阳性药物，Conc.01 浓度为 2 μg/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	H_ EGF	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

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 1.5×10^5 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。

b) 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。

c) 对于待测样品，使用一行（如 B 行）。

d) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
H_ EGF	0.1 mg/mL	/	直接使用储液

e) 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 161.7 μL 的 Assay buffer，B3-B11 加入 110 μL 的 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 3.3 μL H_ EGF）。

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	3.3 μL H_ EGF	加入	161.7 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 孵育的孔板取出，每孔吸弃 90 μL 培养基。然后加入步骤 h 准备好的梯度稀释液，每孔加入 100 μL。

j) 盖上检测板盖，于 37°C CO_2 培养箱中培养 7 h。

k) 收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_EGFR Reporter Cell Line	0 μg/mL	2 μg/mL	304.83 pg/ml
	8096	306485	9679

3) 验证结果

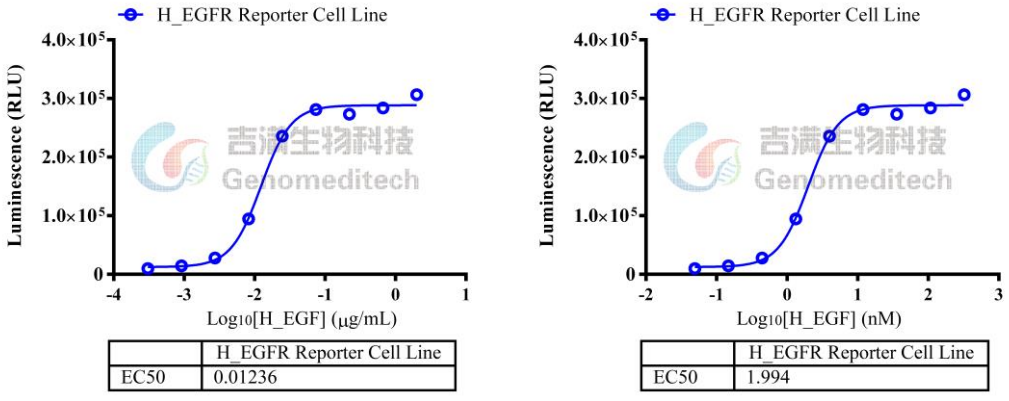


Fig.2 激活功能验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

2. 抑制实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_EGFR Reporter Cell Line 细胞量为 2 × 10^4 cells/孔。本次实验使用 Anti-H_EGFR hIgG1 Antibody(Necitumumab)（以下简称 Anti-H_EGFR；分子量：150 kDa）作为抑制药物，H_ EGF 作为激活药物（激活终浓度为 20 ng/mL），Conc.01 终浓度为 100 μg/mL，4 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.9 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	Anti-H_EGFR	PBS	100 μg/mL	25 μg/mL	6.25 μg/mL	1.56 μg/mL	390.63 ng/mL	97.66 ng/mL	24.41 ng/mL	6.1 ng/mL	1.53 ng/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 2 × 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。

b) 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。

c) 对于待测样品，使用一行（如 B 行）。

d) 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Anti-H_EGFR	2.57 mg/mL	/	直接使用储液
H_ EGF	0.1 mg/mL	0.01 mg/mL	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer

e) 加入 Assay Buffer，各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 67.63 μL 的 Assay buffer，B3-B10 加入 55 μL 的 Assay Buffer。

f) 吸取 5.71 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 18.33 μL，加入次孔									对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		12
A													
B	5.71 μL Anti-H_EGFR	加入	67.63 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	0	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

g) 从第一个梯度稀释孔（如 B2 孔）中吸取 18.33 μL 液体，加入到第二个稀释孔中（如 B3），充分混匀。

h) 以此类推，直至 B10 孔。B11 为不加药物的对照。

i) 取出步骤 a 铺板过夜的细胞孔板，每孔吸弃 90 μL 培养基。

j) 将步骤 h 准备的 Anti-H_EGFR 药物，每孔取 50 μL 依次加入步骤 i 的细胞孔板中，放入培养箱孵育 1 h。

k) 配置激活药物 H_ EGF（激活浓度×2）：取 6 μL 母液加入 1494 μL Assay Buffer 混匀。

l) 取出步骤 j 的细胞孔板，每孔中加入 50 μL 步骤 k 配置好的激活药物，盖上检测板盖，于 37°C CO_2 培养箱继续孵育 7 h。

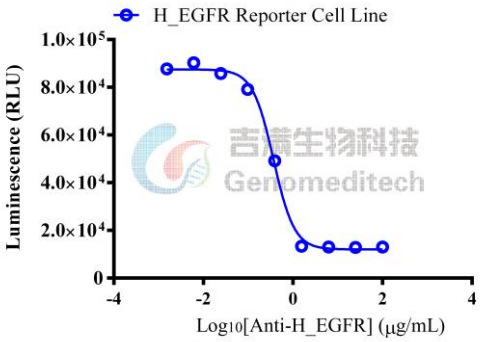
m) 使用 GMOne-Step 报告基因检测试剂盒，收样检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

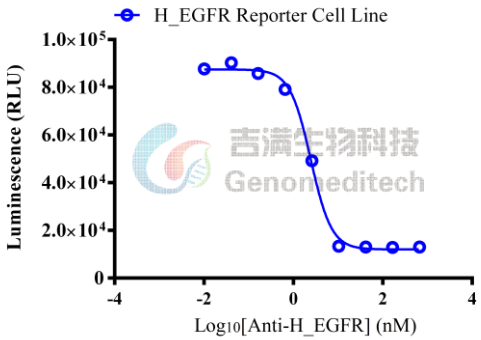
参考报告基因检测说明书。

H_EGFR Reporter Cell Line	0 μg/mL	100 μg/mL	1.53 ng/mL
	92183	13069	87677

3) 验证结果



	H_EGFR Reporter Cell Line
IC50	0.3683



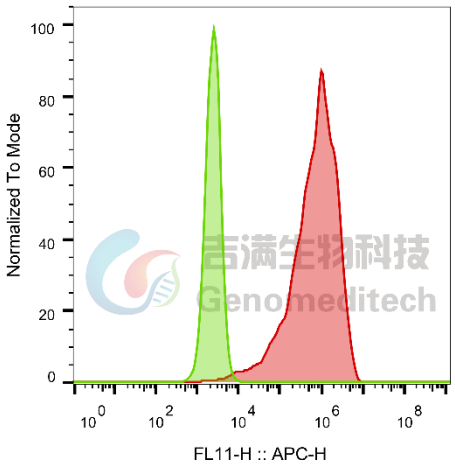
	H_EGFR Reporter Cell Line
IC50	2.456

Fig.3 抑制功能验证结果

（右图对药物进行质量浓度和摩尔浓度的换算后绘制）

Genomeditech

附录 1 流式验证结果



	SampleID	Geometric Mean : FL11-H
	H_EGFR Reporter H_IgG+APC-2nd Ab	2426
	H_EGFR Reporter Anti-EGFR+APC-2nd Ab	6.26E5

Fig.4 流式验证结果

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

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