

## 产品手册

### H\_AR HEK-293 Cell Line

### H\_AR HEK-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、	材料准备.....	3
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	3
2.	试剂耗材准备.....	3
四、	细胞复苏、传代、冻存.....	4
1.	细胞复苏.....	4
2.	细胞传代（以 10 cm 皿为例）.....	4
3.	细胞冻存.....	4
五、	验证结果（示例）.....	5
1.	WB 检测蛋白表达.....	5
2.	结果与分析.....	6
附录 1	H_AR 氨基酸序列（P10275-1 2016-03-16 v3）.....	7
使用许可协议：	.....	8

## 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-C45635	H_AR HEK-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-C45635	H_AR HEK-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. 本产品相关实验，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

## 三、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+0.75 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO

### 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
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Androgen Receptor(D6F11) Rabbit Monoclonal Antibody	/	CST/#5153

#### 重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
全自动化学发光/荧光图像分析系统	上海天能科技有限公司/Tanon 4600

## 四、 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 × 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 × 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。

## 五、 验证结果（示例）

### 1. WB 检测蛋白表达

#### 1) 样品处理

稳转株细胞从培养箱中取细胞去除培养液，预冷 PBS 洗涤 2 次。弃去 PBS，IP 裂解液冰上裂解细胞，后加 5X loading buffer。沸水浴煮 10 min，冰上冷却后把蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内即可。

#### 2) SDS-PAGE 凝胶配制

根据目的蛋白分子量大小配制不同浓度的胶，具体体系如下：

分离胶配制：

分离胶（10mL 体系）	8%	9%	10%	12%	13%	15%
H <sub>2</sub> O (mL)	4.6	4.3	4	3.3	2.9	2.3
30% PAGE (mL)	2.7	3	3.3	4	4.4	5
1.5 mol/L Tris (pH8.8) (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10% SDS (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
10% APS (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
TEMED (mL)	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004

浓缩胶配制：

浓缩胶（5%）	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL
H <sub>2</sub> O(mL)	2.1	2.7	3.4	4.1
30% PAGE(mL)	0.5	0.67	0.83	1.0
1.0 mol/L Tris (pH6.8) (mL)	0.38	0.5	0.63	0.75
10% SDS(mL)	0.03	0.04	0.05	0.06
10% AP (mL)	0.03	0.04	0.05	0.06
TEMED(mL)	0.003	0.004	0.005	0.006

### 3) 电泳

先用 80V 约 30 min 使溴酚蓝到达浓缩胶和分离胶分界线后，调电压至 120V。电泳时间根据检测蛋白质分子量而定，一般等到溴酚蓝达到胶的底部即可停止电泳。

### 4) 转膜（湿转）

电泳结束后，300 mA 恒流条件下转膜（转膜时间根据分子量大小而定），将蛋白转移到硝酸纤维素膜（NC 膜）上。

### 5) 封闭

转膜完毕后，立即把蛋白膜放置到预先准备好的 TBST 中，洗涤 10 min 以洗去转膜液。吸尽洗涤液加入 5%脱脂牛奶（TBST 配制）室温封闭 2 h。

### 6) 一抗孵育

封闭结束后吸尽封闭液，加入 5%脱脂牛奶稀释好的一抗，4°C缓慢摇动孵育过夜。

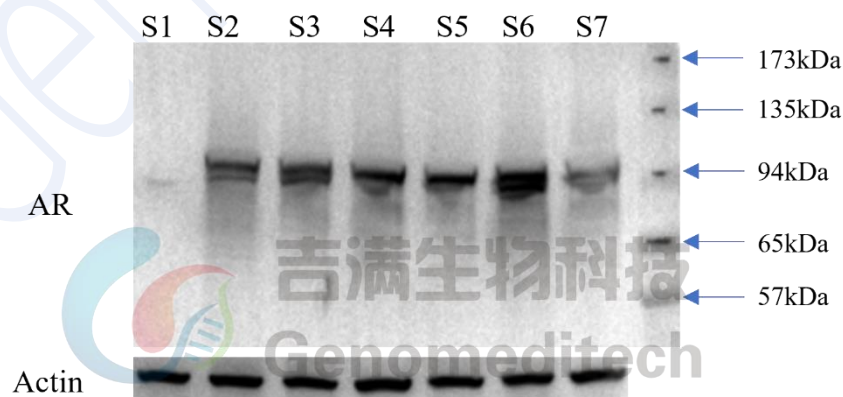
### 7) 二抗孵育

用 TBST 溶液洗膜 3 次，10 min/次。用含 5%脱脂牛奶的 TBST 溶液稀释相应的二抗，室温孵育 2 h。

### 8) 显影

二抗孵育之后，用 TBST 溶液洗膜 3 次，10 min/次。使用 Tanon 4600 系列全自动化学发光/荧光图像分析系统显影。

## 2. 结果与分析



S1: Con    S2: H\_AR HEK-293 Cell Line pool  
S3: #2    S4: #6    S5: #8    S6: #14    S7: #15

Fig. The protein expression levels of H\_AR in the H\_AR HEK-293 Cell Line(Cat. GM-C45635) were determined by Western blotting (WB), Designate clone #14 (S6) as the lead product candidate.

## 附录 1 H\_AR 氨基酸序列 (P10275-1 2016-03-16 v3)

MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAQNLVFQSVREVIQNPGPRHPEAASAAPPGASLLLLQQQ  
QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSPPRQQQQQQGEDGSPQAHRRGPTGYLVLDEEQPS  
QPQSALECHPERGCVPEPGAAVAASKGLPQQLPAPPDEDDSAAPSTLSLLGPTFPGLSSCS  
ADLKDILSEASTMQLLQQQQQEA VSEGSSSGRAREASGAPTSSKDNYLGGTSTISDNAKE  
LCKAVSVSMGLGVEALEHLSPGEQLRGDCMYAPLLGVPPAVRPTPCAPLAECKGSLDD  
SAGKSTEDTAEYSPFKGGYTKGLEGESLGCSSAAAGSSGTLELPSTLSLYKSGALDEAA  
AYQSRDYNNFPLALAGPPPPPPPHPHARIKLENPLDYGSAWAAAAAQCRCRYGDLASLHG  
AGAAGPGSGSPSAAASSWHTLFTAEEGQLYGPCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
EAGAVAPYGYTRPPQGLAGQESDFTAPDVWYPGGMVSRVPYPSPTCVKSEMGPWMDSY  
SGPYGDMRLETARDHVLPIIDYFPPQKTCLICGDEASGCHYGALTCGCKVFFKRAAEGK  
QKYL CASRNDCTIDKFRKNCPSCLRKCYEAGMTLGARKLKKLGNLKLQEEGEASST  
SPTEETTQKLTVSHIEGYECQPIFLNVLEAIEPGVVCAGHDNNQPDSFAALLSSLNELGERQ  
LVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWR SFTNVNSRMLYFAPD  
LVFNEYRMHKSRMYSQCVRMRHLSQEFGLQITPQEFLCMKALLLSIIPVDGLKNQKFF  
DELRMNYIKELDRIIACKRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQFTFDLLIKSHMVS  
DFPEMMAEII SVQVPKILSGKVKPIYFHTQ

## 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