

产品手册

H_RSPO1(R-spondin1) CHO-K1 Cell Line

H_RSPO1(R-spondin1) CHO-K1 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

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.....	4
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	4
2.	试剂耗材准备.....	4
四、	细胞培养、复苏、冻存.....	5
1.	H_RSPO1(R-spondin1) CHO-K1 Cell Line 细胞复苏.....	5
2.	H_RSPO1(R-spondin1) CHO-K1 Cell Line 细胞传代.....	5
3.	H_RSPO1(R-spondin1) CHO-K1 Cell Line 细胞冻存.....	6
五、	Western Blot.....	7
1.	实验方法.....	7
2.	结果与分析.....	8
	使用许可协议:	9
	附录 1 H_RSPO1(R-spondin1)氨基酸序列.....	10

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-C19910	H_RSPO1(R-spondin1) CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C19910	H_RSPO1(R-spondin1) CHO-K1 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、 材料准备

1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

细胞复苏培养基:	F12K+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	F12K+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Puromycin
细胞冻存培养基:	90% FBS+10% DMSO

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
Anti-RSPO1 antibody	/	Abcam/ab106556
Tween-20	500 mL	Yeason/60305ES76
TEMED	10 mL	Beyotime/ST728
SDS	500 g	Merck Millipore/L5750
Acryl/Bis 30% Solution (29:1)	500 mL	Sangon/B546017
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	500 mL	Merck Millipore/WBKLS0500

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
PowerPac™ Basic Power Supply	BIO-RAD/1645050
微型垂直电泳槽	Tanon/VE680
转移电泳槽	Tanon/VE186
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、 细胞培养、复苏、冻存

1. H_RSPO1(R-spondin1) CHO-K1 Cell Line 细胞复苏

- a) 细胞冻存密度为 5×10^6 cells/mL，冻存管分装 1 mL。
- b) 在 37°C 水浴锅预热培养基，加入预热完全培养基 5 mL 到 15 mL 离心管。
- c) 从液氮中取出冻存的细胞并迅速放入 37°C 恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。
- d) 用 70% 乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。
- e) 在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到预先加有预热好的 15 mL 离心管中，轻轻混匀，1000 rpm，离心 5 min 使细胞沉淀，弃上清。
- f) 冻存细胞离心后收集沉淀，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，活细胞大于 3×10^6 cells/mL。
- a) 通过补加完全培养基的形式，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，参考体系：10 cm 皿（8-10 mL 悬液）；6 cm 皿/T25 瓶（5 mL 悬液）。后续细胞传代可根据培养皿中细胞聚合度调整。

2. H_RSPO1(R-spondin1) CHO-K1 Cell Line 细胞传代

- a) 放入 37°C 恒温培养箱中孵育 24 h，镜下观察细胞贴壁情况。如已贴壁，根据细胞密度，小心更换培养基或进行细胞传代。当细胞密度大于 60% 时，即可进行传代。如未贴壁，继续孵育观察。
- a) 细胞消化液：0.25% Trypsin-EDTA，消化时间为：2-3 min。
- b) 贴壁细胞按细胞密度（汇合度）进行传代，推荐细胞传代比例为 1:4-1:5，2-3 天传代传代。
- c) 将皿或培养瓶中的培养基用移液管或吸管弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- d) 弃 PBS，加 1 mL 消化液润洗一遍，吸弃，再次吸取 1 mL 消化液，37°C 消化 2-3 min，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。
- e) 加 2 mL 左右完全培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，1000 rpm 室温离心 3 min。

- f) 弃上清，细胞沉淀用完全培养基重悬，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 20-30%）。

	培养基	面积	接种细胞量	汇合度 100%
35mm Dish	2 mL	9.6 cm ²	0.3×10^6	1.2×10^6
60 mm Dish	5 mL	28 cm ²	0.8×10^6	3.2×10^6
100 mm Dish	10 mL	78 cm ²	2.2×10^6	8.8×10^6
T-25 Flask	5 mL	25 cm ²	0.7×10^6	2.8×10^6
T-75 Flask	10 mL	75 cm ²	2.1×10^6	8.4×10^6

3. H_RSPO1(R-spondin1) CHO-K1 Cell Line 细胞冻存

- 细胞冻存液：90% FBS+10% DMSO。
 - 使用 1000 rpm，3 min 离心收集细胞。
 - 使用预冷细胞冻存液重悬细胞，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，冻存体积为 1 mL，冻存密度为 5×10^6 cells/mL。
- 拧紧盖子，适当标记后，将细胞冻存管置于梯度降温盒中，在-80℃下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

五、 Western Blot

1. 实验方法

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 ₂ 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 ₂ 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

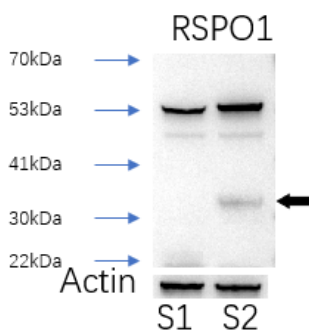


Fig. Western Blot检测CHO-K1细胞中目的基因的表达量

一抗: 1:500 二抗: rabbit, 1:3000
S1: CON S2: H_RSPO1(R-spondin1)

经 Western Blot 验证，构建的过表达稳转株有过表达效果。

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

附录 1 H_RSPO1(R-spondin1)氨基酸序列

MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGRQRRISAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKL
FILLERNDIRQVGVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCIKCKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYLH
KGRCYPACPEGSSAANGTMECSSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVL
HAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKRRKGGQGRRENANRNLARKESKEAGAG
SRRRKGQQQQQGGTVGPLTSAGPA

Genomeditech