

产品手册

H_cMET HEK-293(cMET KO) Cell Line

H_cMET HEK-293(cMET KO)细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.11.1

目录

一、	背景.....	3
二、	产品基本信息及组分.....	3
三、	包装、运输及储存.....	3
四、	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
五、	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
六、	验证结果.....	5
1.	流式检测蛋白表达.....	5
附录 1	H_cMET 氨基酸序列（P08581-1）.....	6
相关产品		7
使用许可协议：		7

一、背景

cMET（也称作 MET 或 HGFR）是一种酪氨酸激酶受体，属于肝细胞生长因子（HGF）受体家族。cMET 通常导致癌症的形成、进展和转移，通过促进细胞的运动，帮助肿瘤细胞穿越组织间隙进入血液循环。吉满生物 H_cMET HEK-293(cMET KO) Cell Line 表达细胞系在敲除内源性表达的 cMET 后，重新过表达密码子优化的 cMET 基因。通过控制 cMET 的表达，明确其在细胞生物学中的具体功能，可用于研究 cMET 在肿瘤发生、发展中的作用和抗癌药物的筛选。

二、产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-C36567	H_cMET HEK-293(cMET KO) Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C36567	H_cMET HEK-293(cMET KO) Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C

三、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。

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+125 µg/mL Hygromycin
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.
Hygromycin	1 g	Genomeditech/GM-040403-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122

Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
DMEM	500 mL	gibco/C11995500BT
Anti-H_HGFR(Met) Antibody(Emibetuzumab)	hIgG4 /	Genomeditech/GM-28859AB
重要仪器		
Equipment	Manufacturer/Catalogue No.	
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3	
流式细胞仪	贝克曼库尔特国际贸易（上海）有限公司/CytoFLEX	

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 5×10^6 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 cMET 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、 验证结果

1. 流式检测蛋白表达

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐H_cMET HEK-293(cMET KO) Cell Line 细胞量为 2×10^5 cells/管。操作步骤如下：

- 实验前，需等待细胞生长速率稳定，约需要3-5 d。
- 实验当天，消化H_cMET HEK-293(cMET KO) cell line，取100 μ L细胞悬液（细胞计数后用PBS调整浓度为 2×10^6 cells/mL），加入适量的表面抗体（Anti-H_HGFR(Met) hIgG4 Antibody(Emibetuzumab)），4℃避光孵育1 h。
- 加入1-2 mL PBS冲洗，重复此步骤。
- 加入荧光标记的二抗，4℃避光孵育30 min。
- 1000 rpm离心5 min，去除上清，用300 μ L PBS重悬。
- 立即上机检测。
- 验证结果。

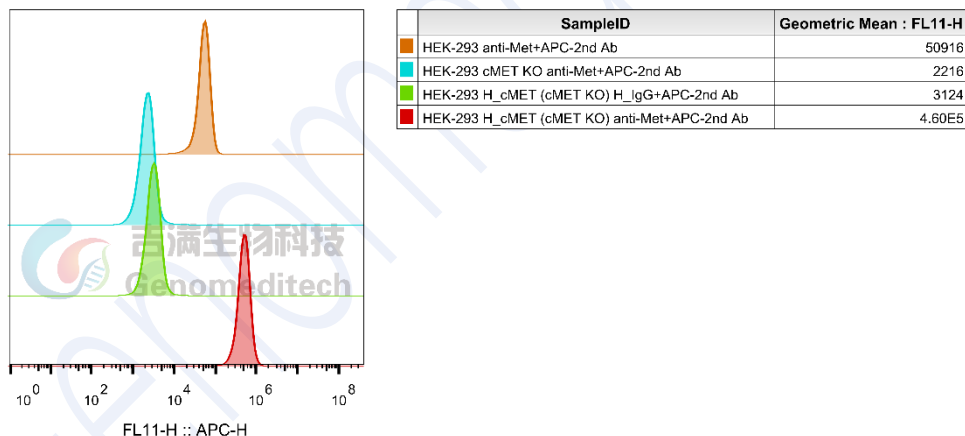


Fig 1.流式验证结果

附录 1 H_cMET 氨基酸序列 (P08581-1)

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYI
YVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNR
GTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHP
HSISVRRLKETKDGFMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDQTFHTRIIRFCSIN
SGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNQLQAAYVSKPGAQLARQIGASLNDLILFGVFAQSKPDSAEP
MDRSAMCAFPKIYVNDFFNKIVNKNVRCQLQHFYGPNEHCNRTLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQ
RVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSRGPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHTLN
QNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPVFQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQICLPAIYKV
FPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTSESTMNTLKCTVGPAMNKHFNMSII
ISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAAGTLLTLTGNYLNSGNSRHSISGGKCTLKSVSNSILECYTP
AQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVYEHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRN
FTVACQHRSNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGLSKYFDLIYVHNVPVFKPFKPVMMISMGNENV
LEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSLNIEWKQAISSTVLGKVIVQPD
QNFTGLIAGVVSISTALLLLGFFLWLKKRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNE
SVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNPELVQAVQHVI
GPSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLNDNDGKKIHCVAKSLNRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLL
GICLRSEGSPLVVLPMKHGDLRNFI RNETHNPTVKDLIGFLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCML
DEKFTVKVADFLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTR
GAPPYPDVNTFDITVYLLQGRLLQPEYCPDPLYEVMKLCWHPKAEMRPSFSELVSRISAIFSTFIGEHYVH
VNATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNADDEVDRPASFWETS

附录 2 Sanger 测序结果



Fig 2. 敲除母细胞测序结果显示 cMET 本底已敲除

相关产品

FcγR	
H_CD32B aAPC CHO-K1 Cell Line	Cynomolgus_FcRn MDCK Cell Line
H_FCGR1A(CD64) CHO-K1 Cell Line	H_FCGR1A(CD64) HEK-293 Cell Line
H_FCGR2A(CD32A) CHO-K1 Cell Line	H_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line
H_FCGR3A(CD16a) 158F CHO-K1 Cell Line	H_FCGR3A(CD16a) 158V CHO-K1 Cell Line
H_FCGR3B(CD16b) CHO-K1 Cell Line	H_FcRn CHO-K1 Cell Line
H_FcRn MDCK Cell Line	Mouse_FcRn MDCK Cell Line
Anti-FcRn hIgG4 Reference Antibody(Rozabio)	Anti-H_FcRn IgG4 Antibody(Rozanolixizumab)
Anti-Mouse CD1632 mIgG2b Antibody(2.4G2)	
ADCCP	
ADCC FcγRIIIa(158F) Jurkat Effector Cell Line	ADCC FcγRIIIa(158V) DDX35TM Jurkat Effector Cell Line
ADCC FcγRIIIa(158V) Jurkat Effector Cell Line	ADCC M_FcγRIV Jurkat Effector Cell Line
ADCP FcγRI Jurkat Effector Cell Line	ADCP FcγRIIa DDX35TM Jurkat Effector Cell Line
ADCP FcγRIIa Jurkat Effector Cell Line	ADCP FcγRIIa R131 Jurkat Effector Cell Line
ADCP FcγRIIb Jurkat Effector Cell Line	

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。

- 用户不允许以任何方式修改细胞系，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。
- 如需对产品进行第三方转让、商业开发或临床前、临床试验期间的药物功能验证、商业化生产检测使用等超出本声明的应用，须另行获得吉满生物科技（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