

产品手册

H_AR Reporter 293 Cell Line

H_AR Reporter 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、	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.	细胞复苏.....	6
2.	细胞传代（以 10 cm 皿为例）.....	6
3.	细胞冻存.....	6
六、	使用方法（示例）.....	7
1.	激活验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
2.	阻断实验.....	10
加样步骤.....		10
1)	报告基因检测.....	11
2)	验证结果.....	12
附录 1	功能验证结果：.....	13
附录 2	WB 验证结果.....	13
使用许可协议：	14

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-C45341	H_AR Reporter 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-C45341	H_AR Reporter 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 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

雄激素受体（AR, Androgen Receptor），又称 NR3C4，属核受体超家族类固醇受体亚族，在前列腺上皮细胞中高度富集，在睾丸、骨骼肌及皮肤等组织中亦显著表达。作为睾酮与双氢睾酮的特异性受体，AR 是介导雄激素信号、调控男性性分化与发育、维持前列腺生长及骨代谢稳态的核心分子，已成为前列腺癌、雄激素性脱发及肌肉萎缩等领域的重要干预靶点。

AR 经由配体结合域（LBD）结合雄激素后发生构象重塑，与热休克蛋白解离并形成同源二聚体转位入核，随后识别靶基因启动子区的雄激素反应元件（ARE），招募共激活因子启动下游转录。此外，AR 亦可通过非基因组信号通路激活 PI3K/AKT、Ras/MAPK 及 STAT3 通路。上述基因组与非基因组通路协同驱动细胞增殖、存活与分化相关基因的表达，促进前列腺上皮生长，其异常激活是前列腺癌发生与演进的核心驱动力。

吉满生物 H_AR Reporter Cell Line 报告基因细胞系，是基于 AR-ARE 转录调控通路构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。当雄激素与 AR 受体结合后，AR 发生核转位并结合至报告基因载体中的 ARE 元件，从而激活荧光素酶（Luciferase）的表达。Luciferase 读值即代表 AR 信号通路的激活效果，因此可用于 AR 相关药物的体外效果评价。

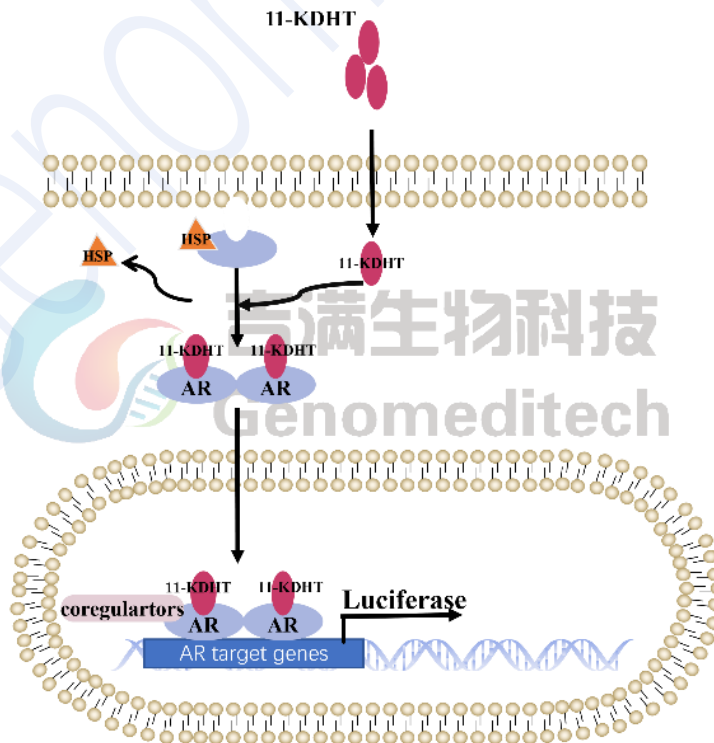


Fig 1.原理示意图

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin+0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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.
DMEM	500 mL	Gibco/C11995500BT
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
96 well round cell culture plate	96-well	PakGent/CL-PT096
96-well White Opaque Plate	96-well	Thermo/236108
96-well U-bottom Plate	96-well	Saining/1014010
Androgen Receptor (D6F11) Rabbit Monoclonal Antibody	/	CST/5153
11-Ketodihydrotestosterone	1 mg	MCE/HY-135794
Metribolone	1 mg	GLPBIO/GC19800
Bicalutamide	50 mg	MCE/HY-14249
Enzalutamide	5 mg	MCE/HY-70002
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000 T	Genomeditech/GM-040513A

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. 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， $176 \times g$ ，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。
- 通过补充复苏培养基的形式，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 $176 \times g$ ，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， $176 \times g$ 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。

六、 使用方法（示例）

1. 激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_AR Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验使用 11-Ketodihydrotestosterone (304.42 Da; 以下简称 11-KDHT) 和 Metribolone (411.65 Da) 作为阳性药物，11-KDHT 的 Conc.01 浓度为 300 nM，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.010 分别排布在 B2-B11，B12 为 0 浓度对照；Metribolone 的 Conc.01 浓度为 300 nM，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.010 分别排布在 C2-C11，C12 为 0 浓度对照；周围孔加入 100 μ L 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	11-KDHT	PBS	300.00 nM	100.00 nM	33.33 nM	11.11 nM	3.70 nM	1.23 nM	411.52 pM	137.17 pM	45.72 pM	15.24 pM	0
C	Metribolone	PBS	300.00 nM	100.00 nM	33.33 nM	11.11 nM	3.70 nM	1.23 nM	411.52 pM	137.17 pM	45.72 pM	15.24 pM	0
D			PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

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 μ L 细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖上市盖，于孵箱中孵育过夜使用。

- 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
11-KDHT	10 mM	10 μ M	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer，连续稀释 3 次

Metribolone	10 mM	10 μM	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer, 连续稀释 3 次
-------------	-------	-------	--

- d) 96 孔 U 孔板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔分别加入 180 μL Assay Buffer; B3-B12 孔, 分别加入 120 μL Assay Buffer, 如 C2 孔分别加入 180 μL Assay Buffer; C3-C12 孔, 分别加入 120 μL Assay Buffer。
- e) 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 5.57 μL 11-KDHT, 如 C2 中加入 5.57 μL Metribolone), 混匀。

母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 60 μL, 加入次孔											对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	5.57 μL 11-KDHT	加入	180 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL
C	5.57 μL Metribolone	加入	180 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL
D												
E												
F												
G												
H												

- f) 从第一个梯度稀释孔 B2 中分别吸取 60 μL, 加入到第二个梯度稀释孔 B3 中, 从第一个梯度稀释孔 C2 中分别吸取 60 μL, 加入到第二个梯度稀释孔 C3 中, 充分混匀。
- g) 以此类推, 直至第 10 个梯度稀释孔 (B11、C11)。
- h) 将孵育过夜的细胞取出, 每孔吸弃 100 μL 培养基。
- i) 加入之前准备好的梯度稀释液, 每孔 100 μL。
- j) 盖上班盖, 于 37 °C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- k) 收样, 转至 96 孔白底板上机, 检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_AR Reporter 293 Cell Line +11-KDHT	0.Conc	300.00 nM	15.24 pM
	56821	1919869	50169
H_AR Reporter 293 Cell Line + Metribolone	0.Conc	300.00 nM	15.24 pM
	49644	1390870	40287

3) 验证结果

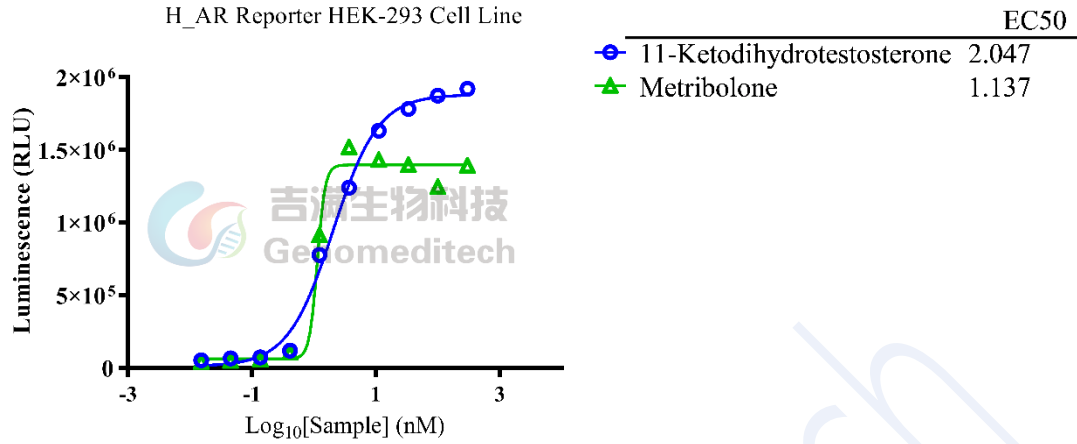


Fig 2. Response to 11-Ketodihydrotestosterone and Metribolone. The H_AR Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C45341) at a density of 1.5E4 cells/well (96-well format) were stimulated with serial dilutions of 11-Ketodihydrotestosterone(MCE/HY-135794) and Metribolone (GLPBIO/GC19800) in assay buffer (DMEM + 1% FBS + 1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [33.8] and [28.0]. Data are shown by drug molar concentration.

2. 阻断实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_AR Reporter 293 Cell Line 细胞量为 1.5×10^4 cells/孔。本次实验分别使用 11-Ketodihydrotestosterone（以下简称 11-KDHT）作为激活药物（定浓 3 nM），Bicalutamide 作为 block 药物（430.37 kDa）。Conc.01 终浓度分别为 30 μ M，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 μ L 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	Bicalutamide	30.00 μ M	7.50 μ M	1.88 μ M	468.75 nM	117.19 nM	29.30 nM	7.32 nM	1.83 nM	457.76 pM	PBS	
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D												
E												
F												
G												
H												

加样步骤

- 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 μ L 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖板上盖，于孵箱中孵育过夜使用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。
- 准备母液

药物名称	储液	母液	配置方法
Bicalutamide	10 mM	1 mM	取 2 μ L 储液 + 18 μ L Assay Buffer
11-KDHT	10 mM	1 μ M	取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer, 连续稀释 4 次

- 96 孔 U 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 加入 80 μ L Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 60 μ L 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 加入 5.11 μL Bicalutamide），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 20 μL ，加入次孔										对照组	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	5.11 μL Bicalutamide	加入	80 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 20 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 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，吸弃上清。加入步骤 h 梯度稀释好的药物，每孔 50 μL ，盖上盖板，放入培养箱中孵育 1 h。
- j) 配置激活药物 11-KDHT（ $2 \times$ 激活浓度），6 nM Neurotrophin-4（8.69 μL 11-KDHT 母液加入到 1440 μL Assay Buffer 中，混匀后使用）。
- k) 1 h 后，将步骤 i 细胞孔板取出，加入步骤 j 准备好的激活药物，每孔 50 μL 。
- l) 盖上板盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- m) 收样，转至 96 孔白底板上机，检测 Luciferase。

1) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_AR Reporter 293 Cell Line	3 nM 11-KDHT +0 μM Bicalutamide	3 nM 11-KDHT +30 μM Bicalutamide	3 nM 11-KDHT +457.76 pM Bicalutamide
	120523	353386	2768757

2) 验证结果

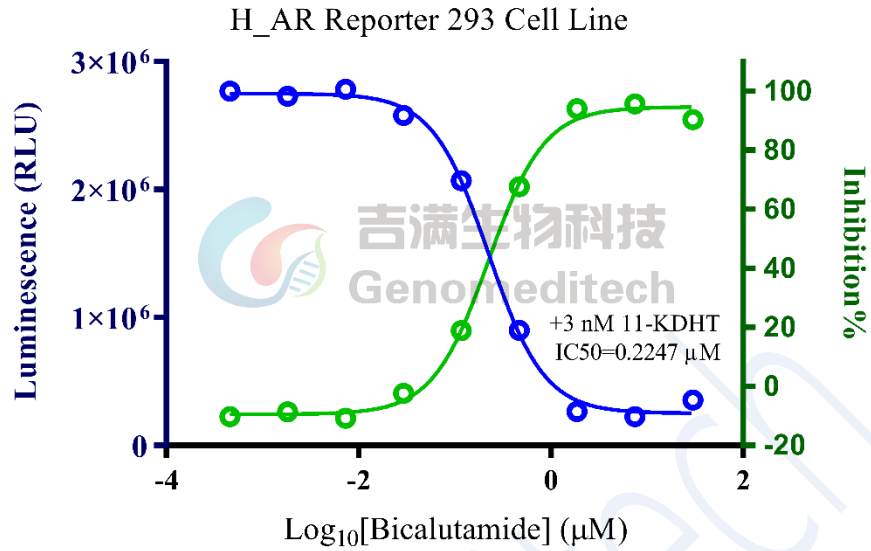


Fig 3. Inhibition of 11-Ketodihydrotestosterone induced reporter activity by Bicalutamide. Serial dilutions of the Bicalutamide(MCE/HY-14249) was incubated with 1.5×10^4 cells/well of the H_AR Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C45341) in a 96-well plate for 1 hour in assay buffer (DMEM +1% FBS+1% P.S). Subsequently, the 11-Ketodihydrotestosterone (MCE/HY-135794) was added to each well at a final concentration of 3 nM,, and the coculture proceeded for an additional 6 hours. Firefly luciferase activity is then measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech)(left Y-axis, relative luminescence units), with inhibition percentages shown on the right Y-axis.

附录 1 功能验证结果:

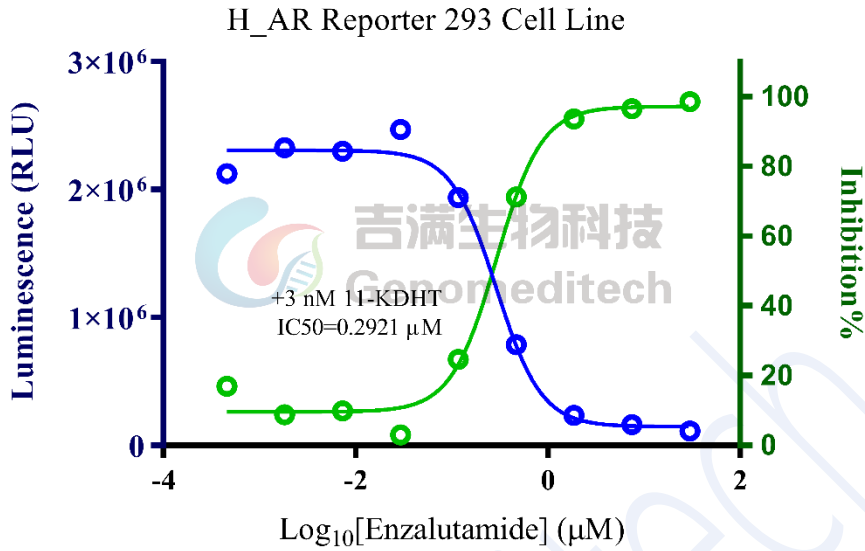


Fig 4. Inhibition of 11-Ketodihydrotestosterone induced reporter activity by Enzalutamide. Serial dilutions of the Enzalutamide(MCE/HY-70002) was incubated with 1.5E4 cells/well of the H_AR Reporter 293 Cell Line (Cat. GM-C45341) in a 96-well plate for 1 hour in assay buffer (DMEM +1% FBS+1% P.S). Subsequently, the 11-Ketodihydrotestosterone (MCE/HY-135794) was added to each well at a final concentration of 3 nM,, and the coculture proceeded for an additional 6 hours. Firefly luciferase activity is then measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech)(left Y-axis, relative luminescence units), with inhibition percentages shown on the right Y-axis.

附录 2 WB 验证结果

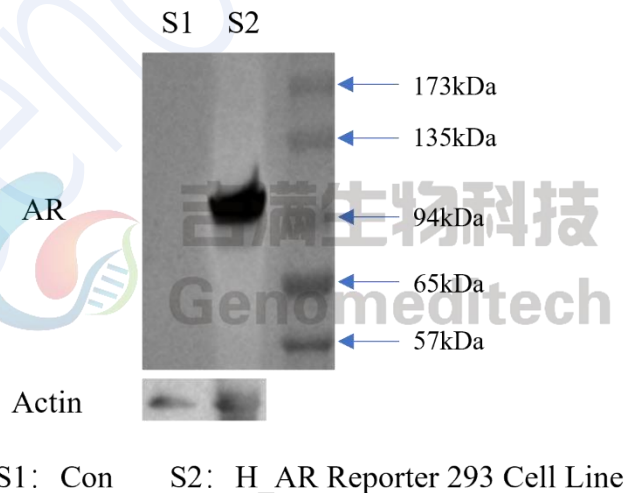


Fig 4. The protein expression levels of AR in the H_AR Reporter 293 Cell Line(Cat. GM-C45341) were determined by Western blotting (WB).

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