

HEK-293 Cav3.1 Cell Line 产品说明书

目录

1. 背景	3
1.1 CaV3.1 离子通道介绍	3
1.2 HEK-293 Cav3.1 检测模型	3
2. HEK-293 Cav3.1 细胞的验证	3
2.1 细胞前处理方法	3
2.2 采用全自动膜片钳记录 HEK293 Cav3.1 模型细胞电流	4
2.3 药理学验证	4
附录: HEK-293 Cav3.1 细胞培养方法	5

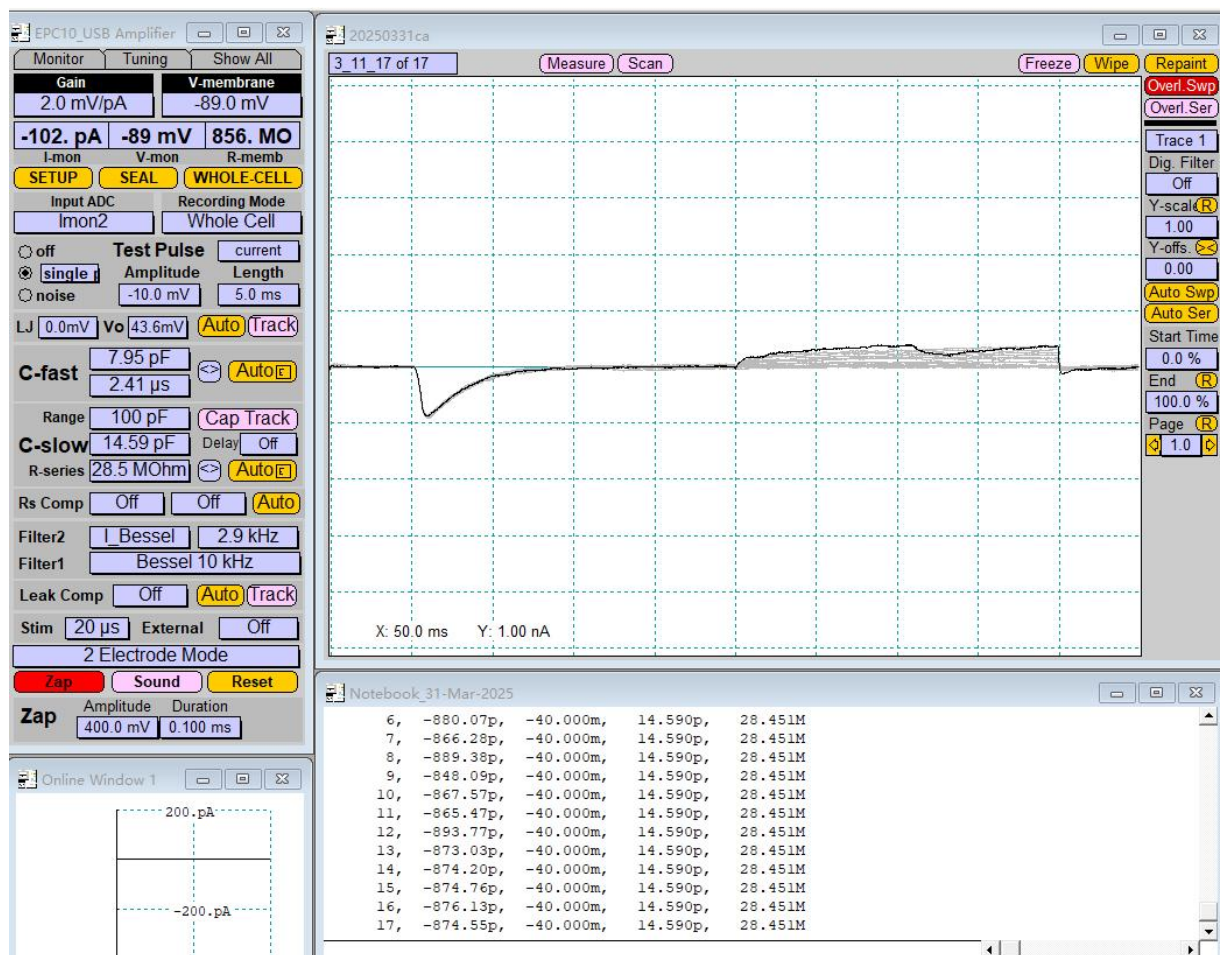
1. 背景

1.1 CaV3.1 离子通道介绍

CaV3.1 是 T 型钙通道的三种亚型之一（另外两种为 CaV3.2 和 CaV3.3），由 CACNA1G 基因编码，是一种低电压激活（LVA）的钙离子通道，它可以在细胞膜接近静息电位时被激活，是神经元重要的“钙内流”来源之一。CaV3.1 最核心的生理功能与神经元的兴奋性调控相关，主要作用为帮助神经元产生节律性的放电，在抑制性信号结束后，让神经元产生一次强烈的爆发式放电，这在丘脑等脑区至关重要，另外，在浦肯野细胞的树突棘中，CaV3.1 在突触传递引发的局部钙信号中起主导作用。CaV3.1 在体内多个组织中有表达，包括一些肿瘤组织（如肉瘤、结直肠癌等）。

1.2 HEK-293 Cav3.1 检测模型

基恩科生物设计了稳定表达了人源 Cav3.1 钙通道的 HEK-293 细胞系。将人源 Cav3.1 基因 cDNA 克隆转染 HEK293 细胞中，单克隆筛选稳定表达 Cav3.1 基因，随后通过膜片钳技术验证了 Cav3.1 通道的功能特征。



Genecarer 公司的 HEK-293 Cav3.1 细胞系适用于相关研究，全自动自动膜片钳（Nanion: Port-a-Patch）进行了验证。

2. HEK-293 Cav3.1 细胞的验证

2.1 细胞前处理方法

细胞培养于 6 孔板，吸出培养基，用 PBS 清洗 2 遍，加入 0.5mL 胰蛋白酶（Gibco, TrypLE），37° C 消化 3-5min，消化完成后，每孔加入 0.5mL 完全培养基和 0.5mL 细胞电极外液，4° C 放置 20min，用巴氏吸管吹打 10 次左右吸出，进行膜片钳检测实验

2.2 采用全自动膜片钳记录 HEK293 Cav3.1 模型细胞电流

细胞电极外液成分如下（单位 mM）：130 mM NaCl、4 mM KCl、1 mM MgCl₂、10 mM CaCl₂、5 mM D-葡萄糖单水合物、10 mM Hepes（用氢氧化钠调节至 pH 7.4）、渗透压：302 mOsmol。

电极电极内液成分如下（单位 mM）：10 mM CsCl、10 mM NaCl、110 mM Cs-Fluoride、10 mM EGTA、10 mM Hepes（用氢氧化铯调节至 pH 7.2）、用 CsOH 将 pH 调节至 7.20，渗透压：285 mOsmol。

采用 2 至 3.5M Ω 的电极电阻进行封接。在记录电极与稳定表达 Cav3.1 的单个 HEK-293 细胞之间形成 G Ω 级高阻封接后，通过破膜使电极尖端与细胞内部建立电学通路，形成稳定封接，通过将细胞膜从维持电位 -80 mV 去极化至 +50 mV（步阶增量 10 mV，时程 1000 ms）来记录内向钙电流。这些脉冲之后紧跟一个至 +10 mV（300 ms）的脉冲，以记录尾电流幅度。电压脉冲的施加间隔为 10 s。

2.3 药理学验证

米贝地尔（Mibefradil）为经典的 T 型钙通道阻滞剂，可同时阻断 L 型和 T 型离子通道。采用 HEK293 Cav3.1 细胞，通过钙通道阻断剂的作用，灌流递增浓度的受试物，Mibefradil 浓度分别为 5 nM, 50 nM, 500 nM and 5000 nM。绘制累积浓度-效应曲线并测定 IC₅₀ 值。两次电压脉冲之间，将细胞钳制于 -80 mV。在经历一个 -50 mV（100 ms）的前置脉冲后，将细胞钳制于 0 mV（200 ms）以开放 CaV3.1 通道。分析峰电流幅度的时间进程，将其归一化至对照条件下的电流幅度，并计算各测试浓度的效应。

附录：HEK-293 Cav3.1 细胞培养方法

1. 培养条件

- 1) 完全培养基成分：DMEM+10%FBS+1%P/S
- 2) 培养环境：37℃、5%CO₂
- 3) 传代比例：1:2~1:4
- 4) 传代频次：2~3 天传代一次
- 5) 冻存条件：冻存液：90%FBS+10%DMSO 温度：液氮

2. 细胞培养

2.1 细胞复苏

- 2.1.1 从液氮罐或者-80℃冰箱取出细胞冻存管，并迅速将冻存管置于 37℃水浴中来回晃动，迅速解冻。为避免污染，可将冻存管置于干净的一次性 PE 手套内再置于水浴中。
- 2.1.2 待冻存管中液体融化后，立即取出，并用 75%酒精纱布擦拭冻存管表面。
- 2.1.3 将冻存管置于生物安全柜中，并将冻存管中的液体转移到含有约 9mL 完全培养基的离心管中，300g，5min 离心，弃上清。
- 2.1.4 用适量的完全培养基重悬细胞并转移到新的培养瓶中，并将细胞置于 5% CO₂、37℃恒温培养箱静置培养。

2.2 细胞传代

- 2.2.1 当细胞密度达到 80%以上时，可以进行传代，**传代比例 1:2~1:4，2~3 天传代一次**。具体操作如下：
- 2.2.2 吸取并弃掉培养瓶中培养基，加入适量 PBS，轻轻晃动润洗细胞，然后将 PBS 吸出。
- 2.2.3 加入约 1.0 mL **0.25%胰酶**，轻轻晃动浸润细胞，然后放在培养箱内消化 2~3 分钟，在显微镜下观察发现细胞变圆，轻轻拍打瓶壁观察到 80%细胞从壁上脱落分离时即可加入约 5ml 完全培养基中和胰蛋白酶。并轻轻吹打将细胞从培养瓶表面吹落使细胞分散成单细胞悬液。（此处为 T75 培养瓶所用体积，可根据实际情况增减用量）。
- 2.2.4 将终止消化后的细胞悬液转移至干净的 15ml 离心管中，300g，5min 离心，弃上清。
- 2.2.5 用适量的完全培养基重悬细胞，并按照传代比例（推荐**传代比例 1: 2~1: 4**）转移到新的培养瓶中，并将细胞置于 5% CO₂、37℃恒温培养箱静置培养。

2.3 细胞冻存

细胞汇合度达到 80%-90%时可进行细胞冻存操作。自制冻存液成分：90%FBS+10%DMSO，为保证冻存细胞较高活力，冻存液最好提前配制并置于 4℃冰箱预冷。

细胞冻存具体操作如下：

- 2.3.1 吸取并弃掉培养瓶中培养基，加入适量 PBS 洗涤一次。
- 2.3.2 加入约 1.0 mL 0.25%胰酶，轻轻晃动浸润细胞，然后放在培养箱内消化 2~3 分钟，在显微镜下观察发现细胞变圆，轻轻拍打瓶壁观察到 80%细胞从壁上脱落分离时即可加入约 5ml 完全培养基中和胰蛋白酶。并轻轻吹打将细胞从培养瓶表面吹落使细胞分散成单细胞悬液。（此处为 T75 培养瓶所用体积，可根据实际情况增减用量）。

2.3.3 将终止消化后的细胞悬液转移至干净的 15ml 离心管中，300g，5min 离心，弃上清。

2.3.4 根据细胞沉淀量加入适量提前配制好并预冷的细胞冻存液（推荐 1 个 T75 培养瓶的细胞可加入 3ml 冻存液），轻轻吹打使细胞分散。

2.3.5 将细胞悬液转移至细胞冻存管中，1ml/管。冻存管需提前写好标签或者贴好标签。标签信息包含细胞名称，代数，冻存时间及操作人员姓名等。

2.3.6 将细胞冻存管置于细胞程序降温盒中，并将盒子置于-80℃冰箱中过夜。过夜后可将冻存管转移至液氮罐中长期保存。