敲除细胞株说明书

产品基本信息

产品货号	YKO-H537		
细胞名称	PBK Knockout cell line（U-2 OS）	细胞形态	上皮样, 贴壁细胞
基因名称	PBK	传代比例	1:3~1:5
培养体系	90% McCOY's 5A+10%FBS		
冻存液体系	50%McCOY's 5A+40%FBS+10%DMSO		
特殊备注			

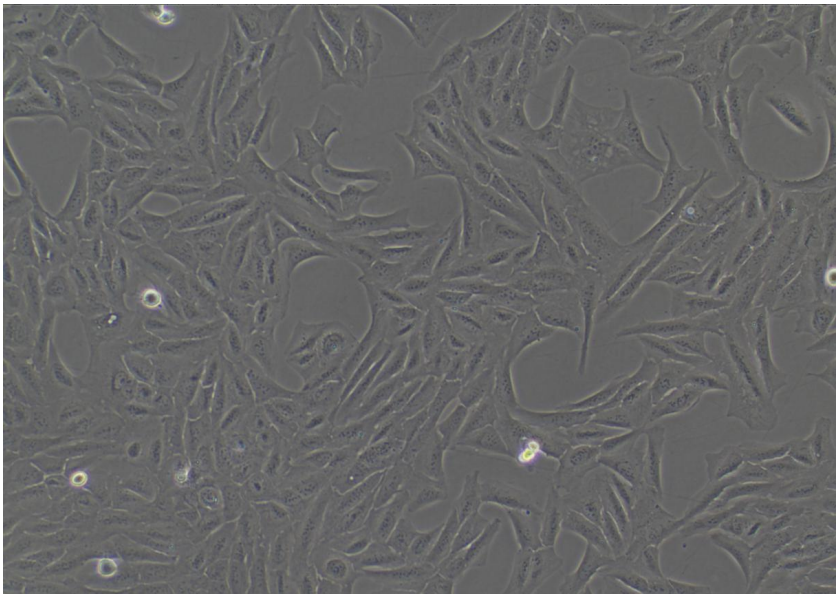
Product Validation Data

Genotype (by sequencing):

E5 Clone del 386 bp (E4 is completely deleted)

tctcccttccacagtatagatagtaagacttgttttagtatat~~(tagatcttacctcccaattgaaatggaaatgtagcagaggtgttcatagtccaaactattttaaattctgtttttaaaagcaaatttctttcaagctttttcccaaaaatttggaagtcattttaaaaagtattgtggttttattgttttctatcctttttaaatgaatttttttcttagATCTCCAAGAGGTTTGTCTCATTCTCCTTGGGCTGTAAAAAAGATTAATCCTATATGTAATGATCATTATCGAAGTGTGTATCAAAAGAGACTAATGGATGAAGCTAAGATTTTGAAAAGCCTTCATCATCCAAACATTGTTGgtacgtttaaatttggtagcagtatctggtatattattttgtttattcagaaacagcttatat)~~gctctcttaactggttcactaatagaaatgaagaggatggggctggatatttaatgggtatc

Cell image



细胞接收

1) 冻存细胞：如果是干冰运输的冻存细胞，收到后请立即转入液氮储存或短暂（24H)放至-80℃冰箱保存，或直接进行细胞复苏。

2) 活细胞：如果是 T25 瓶活细胞运输，收到后用 75%的酒精对 T25 瓶外表面进行消毒，之后放在 5%CO2、37℃的细胞培养箱静置 2h，静置后取出细胞瓶在显微镜下观察细胞贴壁情况和细胞汇合度，分别在 100X 和 40X 下各拍 2 个不同视野的细胞拍照记录。如果汇合度达到 80%以上的传代密度，可以进行传代操作，如果细胞汇合度没有达 80%以上不够传代，弃掉瓶内培养基，更换新鲜完全培养基。（灌满细胞培养基不能正常用来培养细胞。）

注意：收到细胞后，活细胞首先观察细胞瓶是否完好，培养液是否漏液、浑浊等现象。冻存细胞若发现干冰已挥发完、冻存管瓶盖脱落、破损等异常情况，请务必**拍照保留**，并于收货 24h 内与我们联系（电话：400-688-9033；https://www.ubigene.com）。

细胞复苏

1) 准备工作：将完全培养液置 37℃水浴锅预热 30 分钟，随后将冻存的细胞从液氮中取出，转移

到-80℃冰箱，放置数分钟让残余液氮挥发；

2) 在超净台内用吸管吸取 6-7 mL 完全培养液至 15 mL 离心管中；

3) 将细胞从-80℃冰箱取出暂时放置于干冰里，复苏时稍稍甩动，去除残留的干冰和液氮，再迅速用镊子夹住盖子放入 37℃水浴中快速晃动（注意：水不能没过盖子），使其在 1 分钟左右完全融化；

4) 在超净台内，用酒精棉球擦拭冻存管外壁消毒，稍稍晾干。用单道移液器将所有融化的细胞悬液转至提前准备好的完全培养液中，盖上盖子，1100 rpm 室温离心 4 分钟收集细胞；

5) 超净台内小心吸弃上清，用单道移液器吸取 1 mL 新鲜完全培养液重悬细胞至单细胞悬液，再转移至装有 4 mL 完全培养液的 T25 cm^2 培养瓶（或者 6cm 的皿）中，写上细胞名称、复苏日期、代次，放置 37℃、5% CO2 饱和湿度培养箱内培养。

注意：请勿直接复苏到 T75 cm^2 瓶或 10cm 的皿。

细胞传代

1) 常规细胞长至 80%-90%汇合度即可传代。在超净台内把培养瓶里的培养液倒至废液缸，用 1× PBS（T25 cm^2 培养瓶添加约 2~3mL，T75 cm^2 培养瓶约 4~5 mL）洗涤细胞 1~2 次，以去除残余的培养液和血清（血清含有胰酶的抑制因子）；

2) 加入相应体积的胰酶溶液，具体参考附表 1，轻轻晃动瓶子并使胰酶完全浸过细胞，将培养瓶放入培养箱孵育 1~2 分钟（若细胞难以消化，可适当延长孵育时间），待在显微镜下观察到大部分细胞变圆不贴壁，轻轻晃动和敲击培养瓶两侧有大量细胞脱离时，立即终止消化；

3) 加入 2 倍胰酶体积的完全培养液终止消化，并轻吹打细胞数次，使所有细胞彻底脱壁；（注意：吹散细胞时注意要轻柔，尽量不产生气泡或尽可能产生少量气泡。）；

4) 用 10 mL 移液管转移细胞悬液到一支 50 mL 离心管中，同一批次的细胞可以合并收集在一起，视情况用适量 PBS 将培养瓶里的残余细胞洗下来，一起加到 50mL 离心管中。盖上盖子，做好

标记;

5) 1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子弃上清，加 2mL 完全培养基重悬细胞;

6) 细胞按照一定的接种比例传代，首次按照 1：3 进行传代，若细胞在两天内长满可增加传代比例，若细胞生长三四天还未长满，可适当缩小传代比例。

表 1　不同规格培养物加入胰酶体积列表

培养物规格	胰酶体积
6 孔板	0.5 mL
T25	1 mL
T75	2-3 mL
T175	3-4 mL

细胞冻存

1) 按细胞传代的方法，在超净台内把培养瓶里的细胞进行消化至单细胞悬液，加入培养基终止反应。所有液体转移到一支 50 mL 离心管中。

2) 用移液管吹打混合均匀，取 20 μL 进行细胞计数;

3) 1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子倒去上清，用 1~2 mL 4℃预冷的冻存液重悬细胞，随后加入冻存液调整至密度为 $1x10^6$-$1x10^7$ 个细胞/mL。

4) 将细胞悬液按 1 mL/管平均分装至冻存管中，旋紧盖子，冻存管应提前贴好细胞名称、细胞代次、数量、冻存日期;

5) 将冻存管放置于 4℃预冷的程序降温盒中，并在冻存结束的 15 分钟之内将程序降温盒放置超低温冰箱内;

6) 过夜后，将冻存细胞转移至液氮罐内保存。