KYSE-150-Luc 细胞使用说明书

产品基本信息

产品货号	YC-B002-Luc-P		
细胞名称	KYSE-150-Luc	细胞形态	上皮样, 贴壁细胞
荧光抗性	u65e0u8367u5149uff0cPuro	传代比例	1:2~1:4
培养体系	90%RPMI-1640+10%FBS 源井细胞培养未加双抗，客户可视实际情况选择添加		
冻存液体系	50%RPMI-1640+40%FBS+10%DMSO	半药浓度	Puro=1.0 μg/ml
特殊备注			

产品验证数据

（1）荧光素酶检测流程

利用 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 试剂盒（Promega，Cat：E1910）说明书进行荧光素酶活性检测，并在酶标仪（BioTek，型号：Synergy LX）的化学发光模块下进行萤火虫荧光素酶反应强度读数。

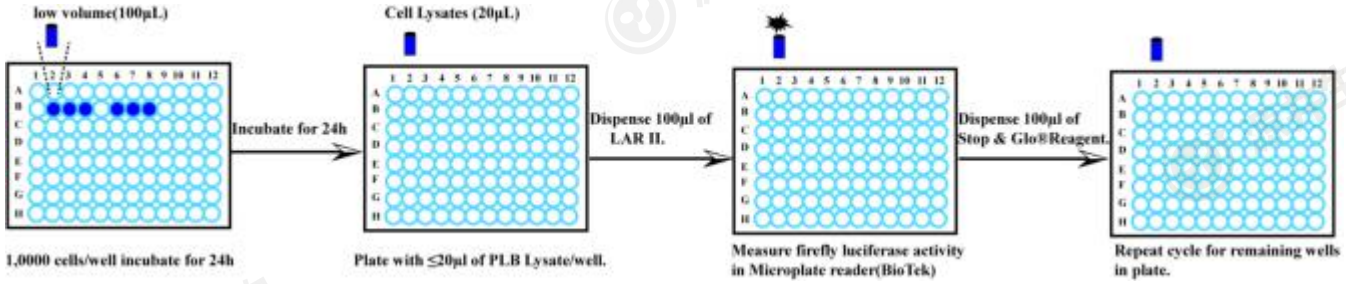


图 1 荧光素酶活性检测流程

（2）荧光素酶检测结果

样品	复孔 1	复孔 2	复孔 3	平均值	表达倍数
KYSE-150-Luc	28575	23985	26517	26359.000	66.008
KYSE-150	572	405	221	399.333	

Luciferase 稳转细胞株介绍

基因报告系统广泛应用于真核生物基因表达和细胞生理学的研究，是提高实验准确度的常用方法。荧光素酶（Luciferase）是以荧光素（luciferin）或脂肪醛（firefly aldehyde）为底物来检测荧光素酶活性的一种常见基因报告系统，因其具有方便快捷、灵敏度强、成功率高等优点，在基因表达的研究中得到广泛应用。

所供 Luciferase 稳转细胞株采用慢病毒法构建，除稳定高效地表达 luciferase 基因外，还具有特异性强、成像质量高、发光强度可精确定量等优点，可实现包括启动子活性研究、哺乳动物细胞双杂交实验以及活体动物成像实验等多方面的灵活应用。

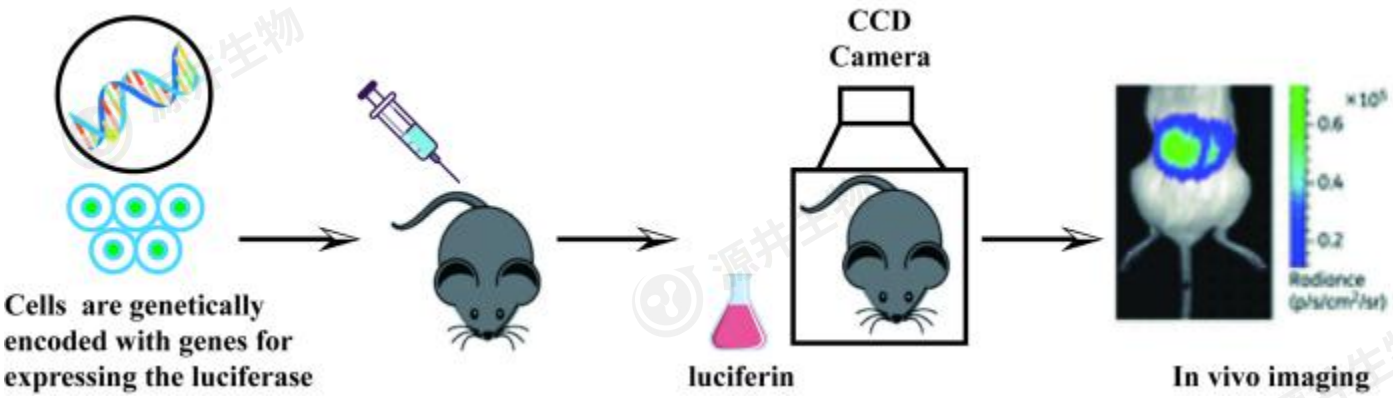


图 2 Luciferase 稳转肿瘤细胞株体内成像过程

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

注意：为了维持 Luciferase 荧光素酶基因表达量的稳定，建议传代时半药培养。

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。