维根生物科技有限公司
Vigen Biotechnology (Zhenjiang) Co., Ltd

VigenCell®
Tel: 183 628 99236
E-mail: 253540644@qq.com

GL261-ffluc+EGFRvIIIt 稳转株说明书

一、基本信息

产品名称	GL261-ffluc+EGFRvIIIt polyclonal stable cell line
中文名称	EGFRvIIIt 过表达 GL261 稳转株
产品货号	VGC-0539-024P
稳转基因	名称：Homo sapiens epidermal growth factor receptor (EGFR), transcript variant EGFRvIII (序 列 ： NM_001346941.2) EGFRvIIIt ： EGFRvIII 基因缺失胞内段的突变体。
荧光蛋白	W/O
细胞株抗性	Puro R（嘌呤霉素抗性）+ BSD R（杀稻瘟菌素抗性）
细胞株类型	混合稳转（✓）；单克隆株（x）
细胞形态	成纤维细胞样，贴壁生长
细胞规格	1×10^6 细胞冻存细胞或 T25 细胞瓶细胞
完全培养基	DMEM-H + 10% FBS
培养条件	(1) 气相：95%空气，5% CO_2；(2) 温度：37 ℃
传代方法	建议 1 : 2 ~ 1 : 3 传代，每 2 ~ 3 天换液一次。
细胞冻存	无血清冻存液（VGA-0046-0100）；- 80 ℃短期保存；液氮长期保存
运输条件	活细胞常温运输或冻存细胞干冰运输
备注信息	如混合稳转细胞株带抗性基因，建议每传 8～10 代用相应抗性药物筛选一次（ 嘌呤霉素：1 μg/mL ； 杀稻瘟菌素：10 μg/mL ）；或在细胞培养过程中添加适当浓度的抗性药物以维持细胞株阳性率（ 嘌呤霉素：0.1 μg/mL ； 杀稻瘟菌素：1 μg/mL ）。

二、细胞到货处理

1、常温到货细胞

1.1 T25 细胞培养瓶寄送活细胞（**细胞处于培养液中**）的处理方法：

a) 观察细胞培养瓶是否完好，培养液是否有漏液、浑浊等现象。若有，请拍照，并及时与技术支持联系。

b) 用 75%酒精擦拭细胞培养瓶表面，显微镜下观察细胞状态。若因运输问题，部分贴壁细胞从瓶壁脱落,先不要打开培养瓶盖，将细胞置于细胞培养箱内静置培养 2～4 小时，以便稳定细胞状态。

c) 静置完成后，取出细胞培养瓶，镜检、拍照，记录细胞状态，如有异常现象，例如污染，细胞状态差等，请拍照留证并及时与技术支持联系。

d) 仅留适量细胞培养液（弃去多余），然后将细胞置于 37 ℃，5% CO2 培养箱培养。

e) 根据细胞习性及时换液、传代、冻存细胞。

1.2 冻存管寄送活细胞（**细胞处于全血清中**）的处理方法：

a) 用 75%酒精彻底消毒细胞冻存管，然后在超净工作台将细胞悬液转移至 15 mL 无菌离心管，500 g，室温离心 5 min。

b) 弃血清，用完全培养基重悬细胞沉淀。

c) 细胞接种于合适的细胞培养皿或培养瓶，然后置于 37 ℃，5%CO2 培养箱培养。

d) 次日观察细胞形态，如有异常现象，例如污染，细胞状态差等，请拍照留证并及时与技术支持联系。

e) 根据细胞习性及时换液、传代、冻存细胞。

2、干冰运输细胞

a) 将细胞从干冰中取出后立即置于 37 ℃水浴，轻轻转动冻存管，直至管内细胞完全融化（最好在 1～2 min 内解冻）。

b) 将冻存管转移到超净工作台，用 75% 酒精彻底消毒冻存管。

c) 将解冻细胞转移到 15 mL 无菌离心管，500 g，室温离心 5 min。

d) 弃细胞冻存液，用完全培养基重悬细胞沉淀。

e) 将细胞接种于合适的细胞培养皿或培养瓶，然后置于 37 ℃，5% CO2 培养箱培养。次日观察细胞形态，如有异常现象，例如污染，细胞状态差等，请拍照留证并及时与技术支持联系。

f) 根据细胞习性及时换液、传代、冻存细胞。

三、细胞培养

1、细胞复苏

将含有 1 mL 细胞悬液的冻存管在 37 ℃水浴中快速摇晃至溶解，然后在超净工作台将细胞转移至 15 mL 无菌离心管，加入 4 mL 培养基或无菌 PBS 混合均匀，室温，500 g，离心 5 min，弃上清液，用完全培养基重悬细胞，将细胞移入培养瓶或培养皿培养，第二天更换培养液并检查细胞生长情况。

2、细胞传代

2.1 贴壁细胞传代：当细胞密度约 80%时，可进行传代培养：

a)吸出原培养皿中的培养基，PBS 缓冲液润洗细胞两次，加 2～3 mL 0.25%胰酶进行消化（注意根据实际情况，把握消化时间）。

b）镜下观察消化情况，在细胞边缘缩小，贴壁松动时（可用吸管吸起些许胰酶轻轻吹打细胞层某处，即可肉眼可见细胞层脱落，或吹打后镜下观察吹打处，即消化完成，否则继续消化）直接吸掉胰酶，加 3～4 mL 完全培养基，轻轻吹打细胞层，把细胞层吹落，吹散。

c)取部分细胞悬液转移至新的培养皿中，添加适当的完全培养基，把细胞悬液打匀，于培养箱中培养。

2.2 悬浮细胞传代：当细胞密度约 80%时，可进行传代培养：

a) 直接将原培养液和细胞一起转移至 15 mL 或 50 mL 无菌离心管，400～500 g 室温离心 5 min，吸掉培养基，用新鲜完全培养基重悬细胞。

b) 根据细胞生长特性，按合适比例传代细胞，将细胞悬液转移至新的培养皿或培

养瓶，将细胞置于 37℃培养箱中培养。

3、细胞冻存

收集细胞，500 g，离心 5 min，弃上清液，加入无血清冻存液（VGA-0046-100）轻轻悬浮细胞，移入冻存管后进行冻存。

四、使用须知

1）本产品仅供购买方单方使用，不得向任何第三方赠送、转让或销售；

2）本产品仅供实验室和体外研究使用，不能用于任何临床检验、诊断、治疗，或任何非法用途；

3）收货 48 h 内如若发现异常，请及时联系售后，逾期视为收货良好；

4）请严格按照本说明书操作，否则造成细胞失活等情形，不予提供补发服务。

五、细胞株质检

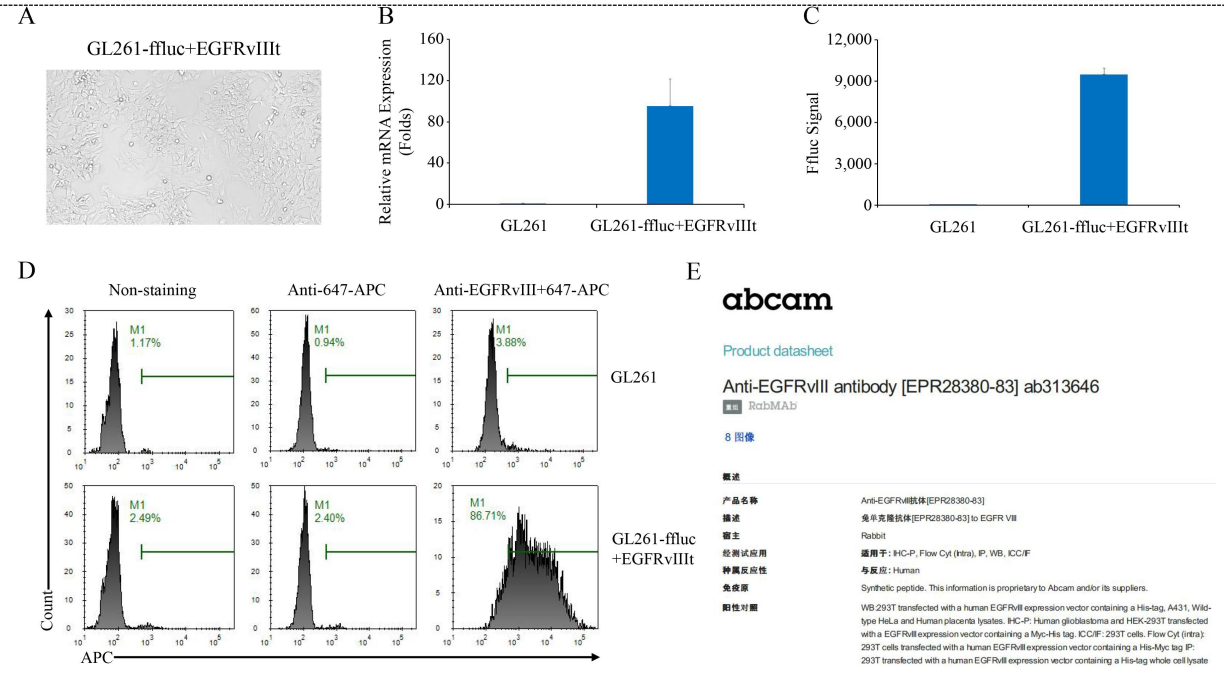


Fig.1. GL261-ffluc+EGFRvIIIt 稳转株 COA

A、 稳转株显微镜图；B、 qPCR检测目的基因表达；C、 ffluc信号值检测。3 ×10⁴ 细胞接种于96-well全白细胞培养板，培养24 h后 在检测孔加入5 μL D-luciferin 底物 (VGA-0038-001)，然后用酶标仪检测自发光信号值；D、 APC检测EGFRvIII表达；E、 APC检测抗体信息。

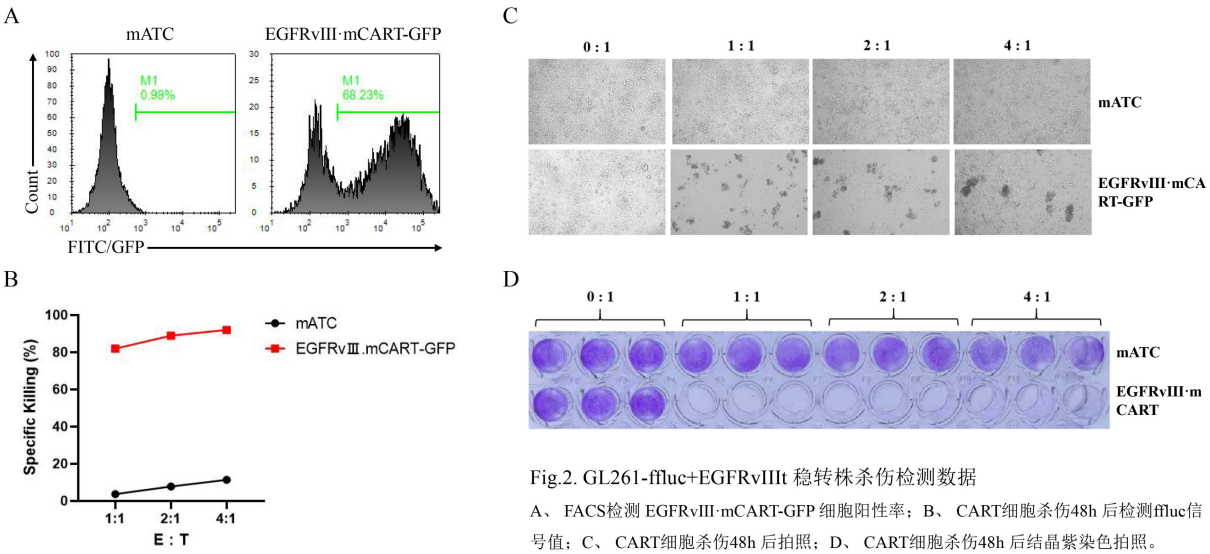


Fig.2. GL261-ffluc+EGFRvIIIt 稳转株杀伤检测数据

A、 FACS检测 EGFRvIII·mCART-GFP 细胞阳性率；B、 CART细胞杀伤48h 后检测ffluc信号值；C、 CART细胞杀伤48h 后拍照；D、 CART细胞杀伤48h 后结晶紫染色拍照。