



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

CHO-K1-CRE-ffluc2 单克隆株说明书

一、基本信息

| | |
|-------|---|
| 英文名称 | CHO-K1-CRE-ffluc2 monoclonal stable cell line |
| 中文名称 | CHO-K1-CRE-ffluc2 单克隆株 |
| 产品编号 | VGC-0055-R002P |
| 产品货号 | 0055-43C7-2S |
| 产品说明 | <p>cAMP 反应原件(cAMP Response Elements, CRE)是转录因子 CRE 结合蛋白 (CREB)识别的 DNA 调控原件。CRE 信号通路参与细胞增殖、心率调控等多种生物功能。</p> <p>CRE-ffluc 单克隆株采用 CHO-K1 细胞株构建并采用无限稀释法筛选，通过慢病毒稳定转入 CRE 控制表达的 luciferase 基因。CRE 激活启动 luciferase 表达，通过检测 luciferase 活性可以灵敏地反应 CRE 通路的状态。</p> |
| 荧光蛋白 | GFP |
| 细胞株抗性 | Puro R (嘌呤霉素抗性) |
| 细胞株类型 | 混合稳转 (x)；单克隆株 (✓) |
| 细胞形态 | 上皮细胞样，贴壁生长。 |
| 细胞规格 | T25 细胞瓶复苏细胞或 1×10^6 细胞冻存细胞。 |
| 完全培养基 | F12 + 10% FBS + 1% P/S (选择添加)。 |
| 培养条件 | (1) 气相：95%空气，5% CO ₂ ；(2) 温度：37 °C。 |
| 传代方法 | 建议 1：2 或 1：3 传代，每 2~3 天传代或换液一次。 |
| 细胞冻存 | 无血清冻存液 (VGA-0046-0100)；-80 °C 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 (12 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 (1.2 µg/mL)。 |



www.vigenbio.com



Technical Support



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

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 °C，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 °C，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 °C 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。



www.vigenbio.com



Technical Support



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

e) 将细胞接种于合适的细胞培养皿或培养瓶，然后置于 37 °C，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 °C 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 °C 培养箱中培养。

3、细胞冻存



www.vigenbio.com



Technical Support

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、功能实验

Forskolin 可以提高细胞内 cAMP 基因水平，激活 CRE 信号通路。

- 1、CHO-K1-CRE-ffluc 消化成单细胞，用 1% FBS 培养基重悬，接种于 96 孔全白细胞培养板，每孔 4×10^4 细胞。
- 2、细胞接种同时加入 Forskolin (终浓度 100 μM)，将细胞置于 37°C 二氧化碳培养箱培养。分别培养 1 h，3 h，6 h。
- 3、分别培养 1 h，3 h，6 h 时，在待检测孔加入 5 μL 的荧光素酶底物（D-luciferin，30 mg/mL），用化学发光酶标仪检测信号值，如下：

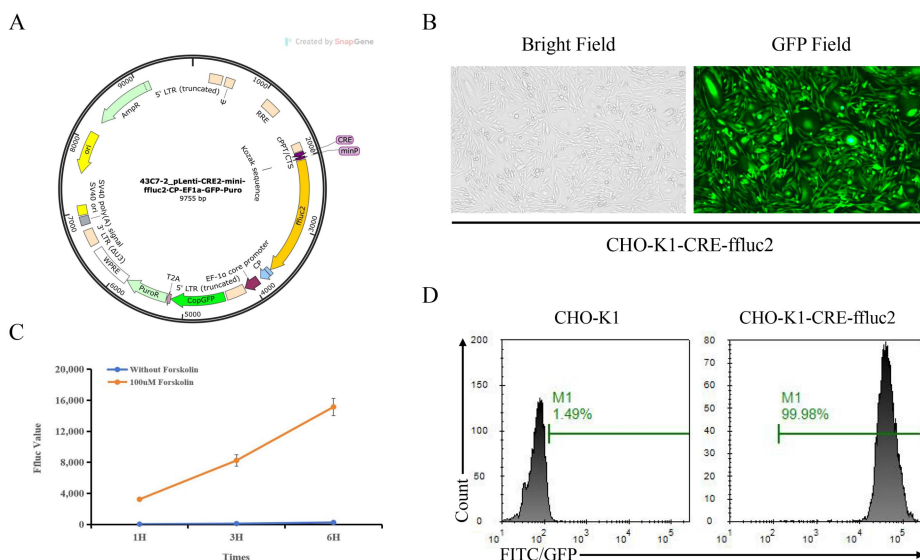


Fig.1. CHO-K1-CRE-ffluc2 单克隆株 COA

A、pLenti-GFP-Puro+CREp-ffluc2 慢病毒重组质粒图谱；B、GFP表达检测的荧光显微镜图；C、Forskolin刺激后信号值检测；D、FACS检测细胞株阳性率。

