

一、产品信息及背景

产品编号	产品名称	规格	数量
GM-C39851	EGFR S768I Homozygous RKO Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管

EGFR 是受体酪氨酸激酶家族 (TK) 的成员。广泛分布于哺乳动物成纤维细胞、上皮细胞等细胞表面, EGFR 信号通路对细胞的增殖、分化等生理过程发挥重要的作用。当 EGFR 发生突变时, 导致 EGFR 信号通路在没有配体结合的情况持续激活, 从而导致细胞异常增殖。

EGFR S768I Homozygous RKO Cell Line 通过基因编辑技术在细胞系的内源性 EGFR 基因上引入 S768I 点突变, 属于 20 号外显子的激活型点突变, 能够增强细胞内信号通路的活性, 并在没有外源配体的情况下促进细胞增殖。

二、包装、运输及储存

1. 细胞系产品干冰运输, -196°C 以下 (冰箱或液氮的气相) 长期储存。
2. 接触产品请带手套。请收到产品立即确认产品是否为冻存状态, -196°C 以下 (冰箱或液氮的气相) 长期储存。
3. 本产品相关实验, 应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

三、验证结果



Fig . Sanger 测序验证结果

四、培养条件及试剂材料

细胞复苏培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S		
细胞生长培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S		
试剂	规格	品牌/货号	
DMEM	500 mL	Gibco/C11995500BT	
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500	
Pen/Strep(P.S)	100 mL	Thermo/15140-122	

五、 细胞复苏、传代、冻存

1. 细胞复苏

- 37°C水浴锅预热复苏培养基，加入预热后的复苏培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37°C恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下轻轻摇动解冻，直到刚刚融化（通常 2-3 分钟）。
- 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀，176 × g，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 复苏培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，活细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $3-4 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中。

3. 细胞冻存

- 使用 176 × g，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中，-80°C下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

2. 细胞传代

注：细胞复苏后的 1 至 2 代，使用复苏培养基，待细胞状态稳定后，再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 此细胞为上皮细胞，贴壁生长，培养箱中孵育 16-24 h 后，镜下观察细胞贴壁情况。细胞密度大于 80%，即可进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 天传代。
- 将皿或培养瓶中的培养液弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液，37°C 消化 30 s - 60 s，显微镜下观察。
- 待细胞变圆，细胞间隙明显，部分细胞刚开始脱离瓶壁时，加 2 mL 左右培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，176 × g 室温离心 3 min。
- 弃上清，细胞沉淀用培养基重悬，根据传代前细胞密度分盘（根据培养皿面积和细胞密度计算，传代后细胞密度为 30-40%）。

注意事项：

- 细胞刚复苏，死细胞较多，属于正常现象，经调整会有明显好转，状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定。
- FBS 血清需 56°C 加热 30 分钟，可灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。
- 此细胞含有 **Blasticidin** 抗性基因。

使用许可协议:

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策:

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。

Genomeditech