cyagen | OriCell



细胞产品手册

OriCell® KPC with Luciferase & RFP 表达荧光素酶和红色荧光蛋白的小鼠胰腺癌细胞系

产品货号：M1-1006

We help you discover life

背景介绍

KPC 小鼠品系描述

KPC 小鼠同时携带 K-Ras G12D 和 LSL-Trp53 R172H 两种致病突变，是目前成功建立的一种胰腺导管腺癌模型小鼠，具有很多与人胰腺癌相似的特点，如胰腺内皮细胞瘤形成，强烈的免疫反应。此外，在约80%的 KPC 小鼠中体内可以观察到肿瘤的转移，主要在肝脏和肺部组织中，这些部位也是人类胰腺癌常见的转移部位，考虑到个体差异性和环境因素的影响，该模型的发病成瘤情况以实际为准。

KPC 小鼠携带 LSL-KrasG12D、LSL-Trp53R172H 和 Pdx1-Cre 三种基因型，是完美的自发胰腺癌小鼠模型之一，它与人类胰腺癌的关键特征非常相似。KPC 模型可用作胰腺导管腺癌（PDAC）的模型，并且由于该模型体内的肿瘤有转移倾向，因此 KPC 小鼠可用于研究原发性和转移性病变的免疫生物学。

KPC 小鼠构建方式

KPC 小鼠由赛业生物独立研发获得（模型编号：C001308）。通过将 KP 小鼠与 Pdx-Cre 小鼠交配获得。首先将 LSL-K-Ras G12D 小鼠（条件性过表达 K-Ras G12D 突变基因小鼠）与 LSL-Trp53 R172H 小鼠（条件性过表达 Trp53 R172H 突变基因小鼠）杂交，产生基因组中携带但不表达两种致病突变基因的小鼠，即 KP 小鼠。然后将 KP 小鼠与 Pdx-Cre 小鼠（胰腺特异性 Cre 重组酶表达小鼠）杂交以产生 KPC 小鼠，该小鼠在 Pdx 启动子的调控下，通过 Cre 重组酶特异性删除胰腺组织中的 Loxp-Stop-Loxp（LSL）基因沉默元件，使 K-Ras G12D 和 Trp53 R172H 突变基因选择性的在胰腺组织中表达。K-Ras G12D 突变和 Trp53 R172H 突变使胰腺肿瘤发展更为迅速，同时转移潜力加大。

KPC 新生小鼠胰腺正常，不存在肿瘤细胞，在 8 至 10 周龄时，胰腺内开始出现前体病变或胰腺上皮内瘤变（PanIN），大多数小鼠在 16 周龄时发展出局部侵入性胰腺导管腺癌（PDAC），并伴有密集的促纤维增生反应。肿瘤通常具有中等分化的导管形态，具有广泛的间质结缔组织增生，类似于在人类肿瘤中观察到的最常见形态。

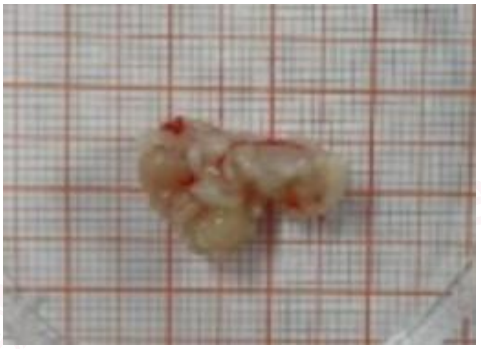


图 1. 18 周龄 KPC 小鼠胰腺肿瘤形态

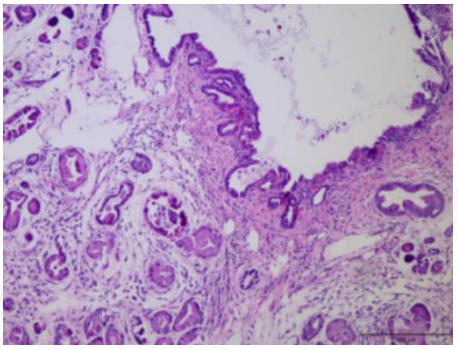


图 2. KPC 小鼠胰腺肿瘤组织 HE 染色图

KPC 小鼠细胞系构建方式

1. 将获得的 KPC 模型鼠 CO_2 窒息处死，用 75%的酒精浸泡消毒 3~4 min ；
2. 无菌条件下，使用干净的眼科镊和眼科剪打开小鼠腹腔，小心地将胰腺从周围组织中分离出来；
3. 将提取的胰腺放入无菌生理盐水或 PBS 中，轻轻清洗以去除血液和其他杂质；
4. 将清洗后的胰腺放入预冷的 PBS 无菌培养皿中，使用眼科剪将其切割成小块；
5. 加入 I 型胶原酶在 37°C 下轻轻摇动消化约 15~30 min；
6. 将消化后的混合物通过细胞筛过滤，以去除未消化的组织块，直至轻松通过枪头；
7. 过滤后的细胞悬液转移到离心管中，以 250×g 的速度离心 4 min，细胞重悬接种；
8. 观察培养，细胞经过纯化培养后于液氮保存。

产品介绍

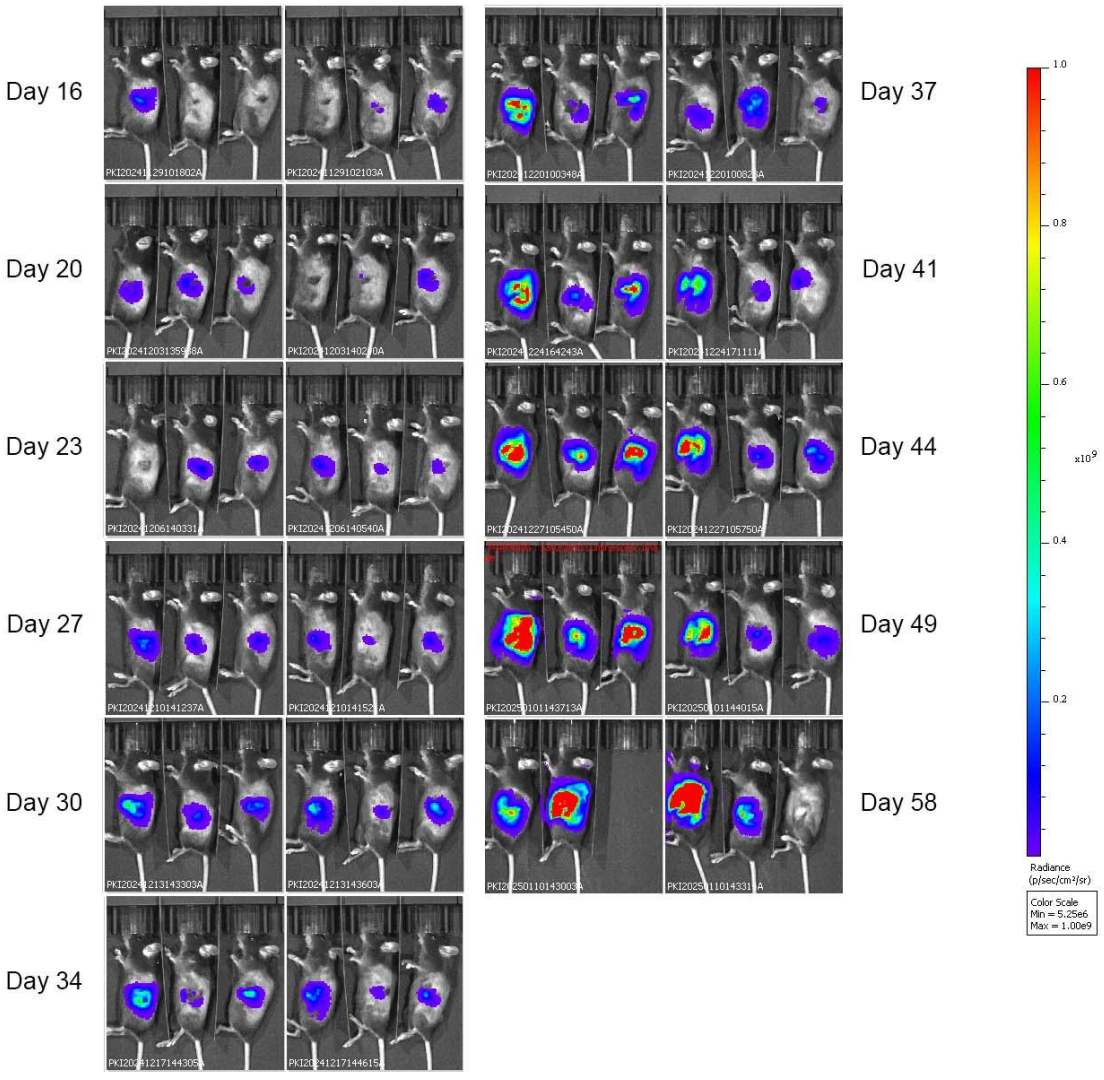
研究应用

KPC 模型鼠可用于胰腺导管腺癌（PDAC）和结直肠癌发生和转移机制研究，胰腺导管腺癌（PDAC）和结直肠癌治疗药物筛选、研发和评价；其它 KRAS G12D 或 Trp53 R172H 相关肿瘤研究。

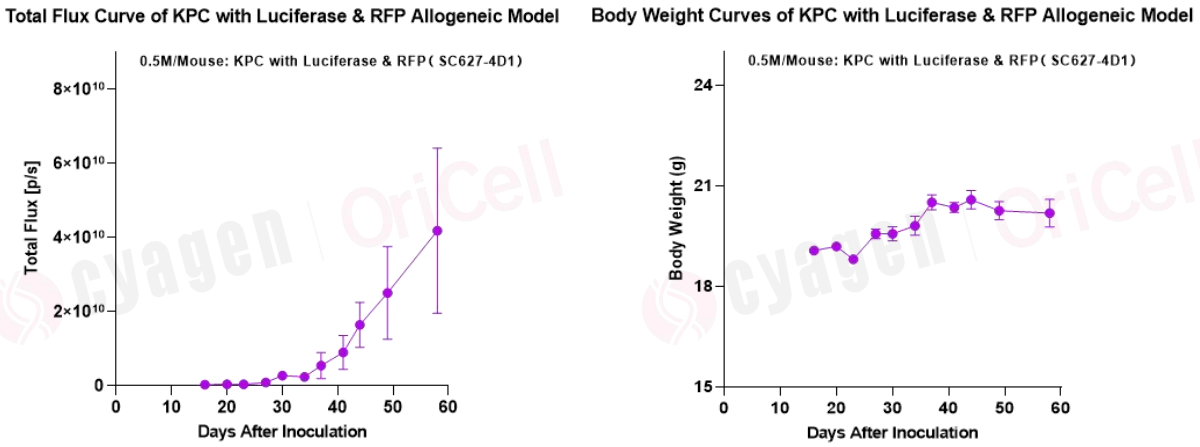
由赛业 OriCell®团队经原代取材获得的 KPC 小鼠胰腺癌细胞可用于研究和厚朴酚通过 SMAD2/3 通路抑制胰腺癌 KPC 小鼠肿瘤生长及其原代细胞的侵袭和迁移；胰腺癌发生和发展机制研究；药物筛选和治疗研究；基因功能和转移机制等研究。

注意：**本产品仅提供给进一步科研使用，不可用于临床治疗等其他用途。**

KPC with Luciferase＆RFP 细胞成瘤数据



赛业（苏州）生物科技有限公司
400-680-8038 info@oricellbio.cn www.oricellbio.cn



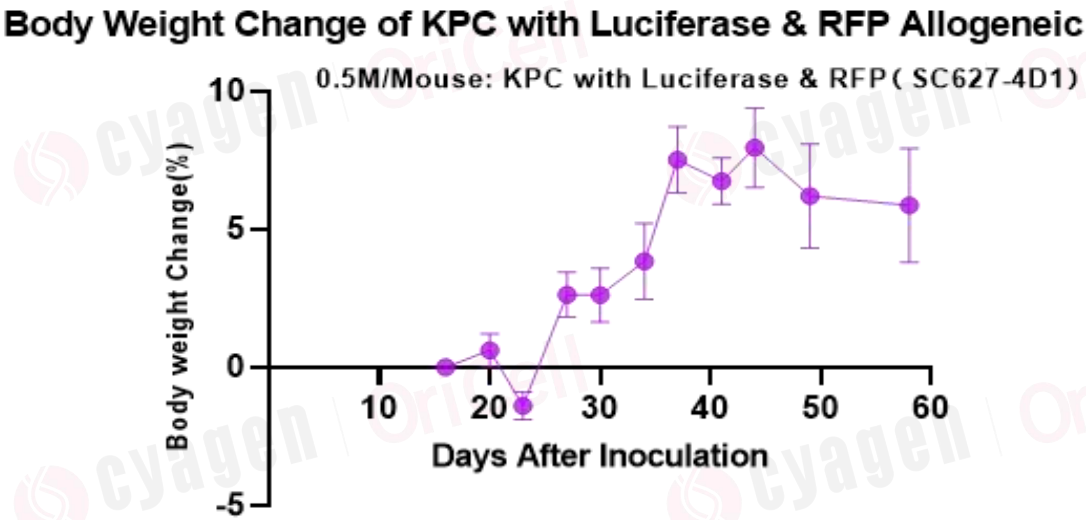
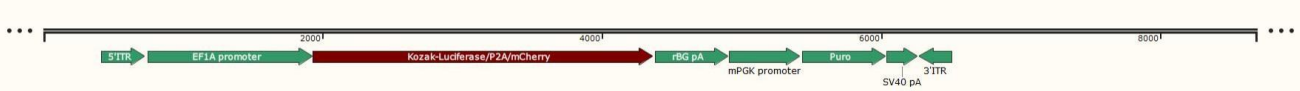


图 1. 胰腺癌细胞 KPC with Luciferase & RFP 胰腺原位移植小鼠活体荧光图片、肿瘤总荧光值增殖曲线及小鼠体重变化曲线（n=6）。将 KPC with Luciferase & RFP 细胞以原位注射的形式接种到 8 周的 C57BL/6J 小鼠体内，并在不同的时间点检测成像荧光强度。细胞接种量为 5×10^5/只，数据以 Mean±SEM 形式呈现。

产品信息

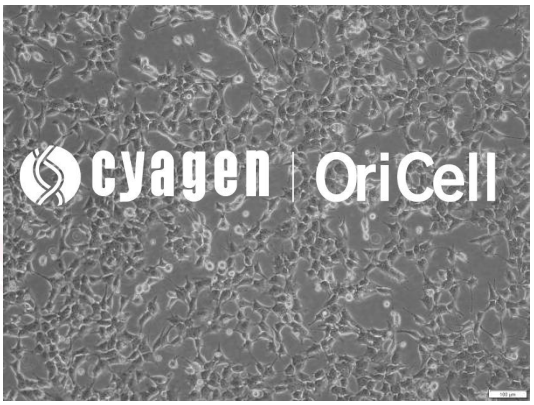
表达载体信息



产品名称	表达荧光素酶和红色荧光蛋白的小鼠胰腺癌细胞系
简称	KPC with Luciferase＆RFP
货号	M1-1006
规格	1×10^6 个/管 或 1×10^6 个/瓶
组织来源	小鼠胰腺
细胞特性	贴壁生长；上皮细胞样
培养条件	95% 空气；5%CO2；37°C
培养基	DMEM+10%FBS
倍增时间	24~48 h
生物安全等级	1
保存条件	液氮（-196°C）
注意事项	荧光筛选：可在 RFP 荧光表达较弱的情况下加入 Puro，以筛选荧光表达较好的细胞，建议 3~5 代筛选一次，药物浓度 0.5~2μg/mL，每次药物维 持 2~4 天（或镜下可见荧光率提高即终止药筛）。该细胞为有限稀释法制备的单克隆细胞株（4D1）。

注意：本产品在生产过程中严格控制无菌。后续培养请根据实际情况选择是否添加抗生素。

OriCell® KPC with Luciferase&RFP 细胞系在倒置相差显微镜下的形态





质量控制

- 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 通过细胞复苏活力检测。
- 通过 STR 检测。

详情见《产品检测报告》。

处理原则

1. 严格的无菌环境。务必保证实验室整体、超净台和培养箱的清洁。
2. 规范的操作方式。请按照产品说明书描述的方式操作，严格控制变量，做好对照实验。
3. 需要合适的、质量可靠的实验耗材和试剂。本产品需使用适合悬浮细胞生长的培养容器，且不建议重复使用。使用的试剂必须经验证可靠，适宜细胞生长且批间差异小。

注意：**本产品冻存液中含有 DMSO，其具有潜在风险，请谨慎处理。**

本产品说明书中使用的试剂简写规则如下：

简写	名称	货号
FBS	Fetal Bovine Serum 胎牛血清	参考官网信息
BCS	Bovine Calf Serum 小牛血清	SBCST-01001
Glu	Glutamine 谷氨酰胺	SGLU-10201
SP	Sodium Pyruvate 丙酮酸钠	SCSP-10301
Dex	Dexamethasone 地塞米松	SDEX-10401
NBCS	Newborn Calf Serum 新生牛血清	NCSST-01001
HS	Horse Serum 马血清	SCHST-01001
NEAA	Non Essential Amino Acid 非必须氨基酸	NEAA-10201
β-mer	β-mercaptoethanol β-巯基乙醇	BMER-10301
P/S	Penicillin- Streptomycin 青霉素-链霉素（双抗）	ATPS-10001
ITS	Insulin、Transferrin、Selenite 胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸添加物	ITSS-10201

细胞的复苏和培养

所需材料

- OriCell® KPC with Luciferase & RFP 细胞
- 适宜细胞生长的完全培养基（如 OriCell® KPC with Luciferase & RFP 细胞系完培培养基）

注意：**收到的细胞如 24 h 内复苏，可存放于-80°C冰箱；超过 24 h 请存放于液氮中，复苏前 10 min 取出，放于-80°C，让管中液氮挥发。**

操作步骤

1. 水浴锅 37°C预热。
2. 完全培养基温浴到 37°C。
3. 在 15 mL 离心管中加入 5 mL 以上完全培养基备用。
4. 从-80°C冰箱中取出细胞，放入 37°C水浴锅中，快速晃动，使冻存液迅速融化。

   注意：**1）融化过程必须晃动冻存管，保证冻存液融化迅速、均匀；**

   2）晃动时应避免水没过管盖造成污染；

   3）管内冻存液融化至只剩一个约 2 mm 直径的冰晶时，即停止水浴。继续晃动冻存管，至冰晶融化。
5. 用 75%医用酒精擦拭冻存管外表面。
6. 在超净台中打开冻存管，用巴氏吸管或移液枪吸取细胞冻存悬液，转移至先前准备的离心管中。
7. 用 1 mL 完全培养基洗涤冻存管 1 次，收集残留细胞，减少损失。
8. 细胞悬液以 250×g 离心 4 min。

   注意：**请以公式 $a=\omega^2 r$（a：向心加速度；ω：旋转角速度，$\omega=\pi n/30$；r：转子半径）计算相应转速。**
9. 离心后去除上清。加入 2 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。
10. 将细胞接种到 1 个 T25 培养瓶或底面积相当的培养容器中。加入足量完全培养基，1 个 T25 培养瓶中培养基总量不少于 5 mL。
11. 摇匀细胞，放入 37°C、5% CO_2、饱和湿度的 CO_2 培养箱中。

    注意：**接种 2 h 内不可移动、观察细胞。这会严重影响细胞贴壁，造成状态不佳、细胞聚团、贴壁不均匀等情况。**
12. 复苏次日，观察细胞状态，并更换新鲜的完全培养基或传代。

    注意：**若发现大量漂浮细胞或其他异常情况，应及时排查原因，并与我们联系。**
13. 之后，每 3 天更换一次完全培养基，直到细胞生长至合适密度，即需传代。

常温细胞接收处理

所需材料

- OriCell® KPC with Luciferase & RFP 细胞
- 适宜细胞生长的完全培养基
- 75%医用酒精
- 数个无菌的 EP 管

注意：**1）收到常温运输的细胞，取出细胞培养瓶后请仔细核对标签信息；**

2）检查培养基是否浑浊；

3）瓶身有无裂痕；

4）瓶口有无培养基渗漏。

如有任何异常情况，请及时与业务经理联系。

操作步骤

1. 用 75%医用酒精全面喷洒擦拭细胞培养瓶，转移入超净工作台。
2. 去除瓶口封口膜，再用蘸有 75%医用酒精的洁净无纺布擦拭瓶口。
3. 镜下观察细胞，检查细胞是否出现大面积脱落，或大量死细胞。
4. 若无异常，请将细胞培养瓶放入 CO2 培养箱内，静置至少 2 h，使运输过程中脱落的细胞重新贴壁。
5. 从培养箱中取出细胞，镜下检查有无异常。
6. 若无异常，在超净工作台中打开培养瓶，吸取至少 2 份 1 mL 培养基至无菌的 EP 管中，妥善保存，以备检测。

   注意：**留样的细胞培养基请放置 4°C冰箱保存。若细胞短期内出现污染，请取其中 1 份做微生物检测；若直到细胞第二次传代没有任何异常，则可丢弃样品。**
7. 弃去多余的培养基，1 个 T25 培养瓶中保留 10 mL 培养基即可。
8. 将细胞放入 37°C、5%CO2、饱和湿度的 CO2 培养箱中。
9. 每 3 天更换一次新鲜的培养基，直到细胞汇合度至 95%以上，即需传代。

细胞的传代

所需材料

- OriCell® 0.25%Trypsin-0.04%EDTA（货号：TEDTA-10001，以下简称胰酶）
- OriCell® Phosphate-Buffered Saline (1×PBS) （货号：PBS-10001，以下简称 PBS）
- 适宜细胞生长的完全培养基

操作步骤

1. 将完全培养基、PBS、胰酶预热至 37°C。
2. 吸去培养容器中的培养基。
3. 用 PBS（T25 培养瓶加入约 3 mL，T75 培养瓶加入约 6 mL）洗涤细胞 2 次，注意动作轻柔，清洗全面。吸去 PBS。
4. 加入胰酶（T25 培养瓶加入约 1.5 mL，T75 培养瓶加入约 3 mL），迅速铺匀，保证充分接触细胞表面。
5. 显微镜下观察消化情况，约 70%~80%细胞收缩变圆后，轻拍培养容器外壁，使细胞脱离培养表面。
6. 立即加入完全培养基（T25 培养瓶加入约 3 mL，T75 培养瓶加入约 6 mL），随即轻摇培养容器，使培养基和胰酶迅速混匀，终止消化。
7. 使用吸管或移液管吸取细胞悬液，吹打培养容器底面数次，尽可能将细胞都吹打下来。

   注意：**吹打动作不可剧烈，避免产生大量气泡，否则可能损伤和损失细胞。**
8. 将细胞悬液转移至离心管中。用 PBS（T25 培养瓶加入约 3 mL，T75 培养瓶加入约 6 mL）洗涤容器 1 次，收集残留细胞。
9. 收集的所有细胞悬液以 250×g 离心 4 min。
10. 离心后去除上清。加入 2 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。
11. 将细胞按(2~3) $\times 10^4$ 个活细胞/cm^2 接种至适宜的培养容器内。

    注意：**我们建议有条件且计数效率较高的情况下，进行手工计数，以期获得精准的细胞浓度指导接种；在没有精确计数条件的情况下，按照适宜比例传代是更好的方法。通常 OriCell® KPC with Luciferase&RFP 细胞传代比例为 1:3~1:4，72 h 内生长至可传代汇合度。请根据细胞实际情况调整传代比例。**
12. 摇匀细胞，放入 37°C、5%CO2、饱和湿度的 CO2 培养箱中。
13. 传代次日，观察细胞状态。若发现较多漂浮细胞，应予以换液。
14. 每 3 天更换一次新鲜的培养基，待细胞汇合度至 95%以上，即需传代或冻存。

细胞的冻存

所需材料

- OriCell® 通用无蛋白非程序冻存液（货号：NCPF-10001）
- OriCell® 通用血清型非程序冻存液（货号：NCRC-10001）

操作步骤

1. 待细胞生长至可传代的密度，即可准备冻存。
2. 细胞收集请参考 OriCell® KPC with Luciferase＆RFP 细胞的传代操作步骤 1~14。
3. 离心后去除上清，用适量冻存液均匀重悬细胞。
4. 将细胞按比例或数量分装至冻存管中。

   注意：**在没有成熟的计数条件下，我们建议将细胞按比例分装冻存即可，长时间在非培养条件下放置会严重影响细胞的状态。在计数时，我们建议将细胞放置于 4°C冰箱内，以减弱细胞代谢，较好地保持细胞状态。**
5. 若选用 OriCell®非程序冻存液，可将冻存管直接分散放入-80°C冰箱中。

   注意：**细胞冻存期间，特别是开始冻存的 4 h 内，不可打开冰箱门，这将严重影响细胞冷冻存活率。**
6. 8 h 后即可将细胞转移入液氮长期保存。

   注意：**细胞不可长期保存在-80°C冰箱中。我们建议在-80°C冰箱中的保存时间不要超过 48 h。**

赛业（苏州）生物科技有限公司保留OriCell®细胞培养产品技术文件的所有权利。

没有赛业（苏州）生物科技有限公司的书面许可，本文件的任何部分，

不得改编或转载用作其他商业用途。