

## KPC 小鼠胰腺癌细胞

### 一、细胞简介

<b>货号</b>	YFX-CLM074
<b>背景描述</b>	PC 小鼠同时携带 K-Ras G12D 和 LSL-Trp53 R172H 两种致病突变。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。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。突变情况如下: KPC: KrasG12D/G: Trp53R270H
<b>细胞形态</b>	上皮细胞样, 贴壁生长。
<b>规格</b>	>1x10 <sup>6</sup> 细胞数量, T25 瓶或者 1mL 冻存管包装。
<b>细胞来源</b>	小鼠胰腺。
<b>培养基</b>	DMEM 高糖+ 10% FBS+ 1% P/S。
<b>培养条件</b>	气相: 空气, 95%; 二氧化碳, 5%; 温度: 37℃; 培养箱湿度为 70%-80%。
<b>消化时间</b>	37℃ 培养箱中消化 1-2 分钟 (难消化的细胞可以适当延长消化时间)。
<b>传代比例</b>	1:2-1:5; 第一次收到细胞建议 T25 培养瓶 1: 2 传代。
<b>换液频率</b>	2-3 天。
<b>细胞冻存液</b>	无血清冻存液。

### 二、细胞收到后处理方式

- 收到细胞后, 75%酒精消毒瓶壁将 T25 瓶置于 37℃ 培养箱放置约 2-3h, 若发现培养瓶破损、有液溢出及细胞有污染, 请拍照后及时联系我们。
- 请在 4 或 5X 显微镜下确认细胞状态, 同时给刚收到的细胞拍照 (10×, 20×) 各 2-3 张以及培养瓶外观照片一张留存, 作为售后时收到时细胞状态的依据。
- 贴壁细胞: 细胞在 37℃ 培养箱中放置 2-3h, 显微镜下观察细胞的生长和贴壁情况, 有些贴壁细胞在快递运送过程中会因振动脱落和脱落后成团的情况。若镜下观察细胞的生长密度若在 60%以下, 可去除培养瓶中灌液培养基 (若有未贴壁的细胞需要离心回收, 重悬打入到原培养瓶中), 加入新配制的完全培养基 6-8mL, 放到细胞培养箱中继续培养。若细胞生长密度达 70%-80%以上, 可以对细胞进行传代处理。传代过程中, 若因运输振动脱落的细胞需要离心回收。

### 三、细胞传代

如果细胞密度达 80%-90%，即可进行传代培养。

对于贴壁细胞传代可以参考以下方法：

- 1、在生物安全柜内，打开培养瓶瓶口，吸弃瓶内的培养基。
- 2、向培养瓶内加入 3mL 无菌的 1×PBS，水平放置培养瓶，使 PBS 能够浸润到培养瓶底面上所有的面积，吸弃 PBS。
- 3、向瓶内加入 1mL 0.25% 胰蛋白酶（含 EDTA），浸润底面后放入 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1~2min。
- 4、孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起，若全部消化下来则直接向培养瓶内加入 2mL 完全培养基中，将悬液吸入 15mL 离心管。

**注：如细胞不能一次性完全消化，可采取如下方法：**

- A. 准备一个无菌的 15mL 离心管，加入 2mL 完全培养基。
- B. 将消化下来的细胞加入到上述离心管中。
- C. 向之前消化的培养瓶中加入 1mL 胰酶继续消化 2min 左右，轻拍培养瓶，95%左右细胞脱落后加入 2mL 含 10%FBS 的完全培养基中和，中和后的细胞悬液移入 A 中的离心管内。

### 四、细胞冻存

收到细胞后建议在培养前 3 代时冻存一批细胞种子以备后续实验使用。下面 T25 瓶为例：

- 1、选择指数生长期的细胞，吸去培养液，加 PBS 清洗 1-2 遍。去 PBS，加入 0.25% 胰酶 1.5mL 润洗 10 秒，去胰酶。将培养瓶放 37 度培养箱，靠残余胰酶继续消化细胞直至细胞变圆，拍打瓶侧使细胞脱落。细胞消化下来后，加 5mL 培养液全部吹打下来，再 1000RPM 离心 3 分钟。
- 2、加入 1-1.5mL 成品冻存液，分装至 2mL 冻存管里，将冻存管放入充满异丙醇的程序降温盒中，之后转入-80℃度冰箱过夜，第二天再转至液氮。

### 五、细胞复苏

- 1、将恒温水浴锅中的水预热到 37℃。
- 2、准备一支 15mL 离心管，加入 5mL 完全培养基，放入 37℃水浴锅中预热。
- 3、戴上护目镜，厚毛线手套后，从液氮罐中取出要复苏的细胞，尽快转入 37℃恒温水浴锅中复温晃动冻存管以提高复温速率。
- 4、将融化了的冻存管中的细胞吸入事先准备的离心管中，混匀后，1000rpm 离心 5min。
- 5、准备一个 T-25 培养瓶，写上细胞名称、日期，再加入 4mL 完全培养基。
- 6、离心完成后弃去上清，用 1mL 完全培养基重悬细胞后，转入 T-25 细胞培养中，混匀后转入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养静置。

### 六、运输和保存

- 1、T25 瓶复苏的存活细胞常温发货，收到细胞后请镜下观察细胞生长状态，如铺瓶率超过 85%请立即进行传代操作，如悬浮的细胞较多，请将培养瓶至于培养箱中静置过夜以帮助未死亡的悬浮细胞能够再次贴壁。
- 2、1mL 冻存细胞悬液装于 1.8mL 的冻存管中，置于装满干冰的泡沫保温盒中进行运输；收到细胞后请尽快解冻复苏细胞进行培养，如无法立刻进行复苏操作，冻存细胞可在-80℃的条件下保存 1 个月。