

LoxP-STOP-loxP-EGFP HeLa Cells

产品编号	产品名称	包装
C7996	LoxP-STOP-loxP-EGFP HeLa Cells	1支/瓶

产品简介:

- LoxP-STOP-loxP-EGFP HeLa Cells, 即LoxP-STOP-loxP-EGFP HeLa细胞, 简称LSL-EGFP HeLa Cells或LSL-EGFP HeLa细胞, 是碧云天通过把含有loxP-STOP-loxP-EGFP元件和G418抗性的质粒转染HeLa细胞, 经G418筛选最终获得的单克隆细胞株。本细胞株可以用于检测Cre重组酶的活性, 也可以用于检测能表达Cre重组酶的质粒或病毒的效果。
- LoxP (locus of X (cross)-over in P1)位点是一段34bp的DNA序列, 其两端为两个13bp的反向重复序列(inverted repeats), 中间是8bp的间隔区(图1)。Cre重组酶是来源于大肠杆菌噬菌体P1的一种类型I的拓扑异构酶(Type I topoisomerase), 也是一种酪氨酸重组酶(tyrosine recombinase), 它可识别34bp的loxP位点并催化loxP位点之间的DNA发生重组; 重组产物根据loxP位点的位置和相对方向的不同而不同, 两个含单个loxP位点的DNA将发生融合: 两个正向重复的loxP位点间的DNA将以环状形式被切割, 而两个反向loxP位点间的DNA序列将被翻转(图2) [1,2]。

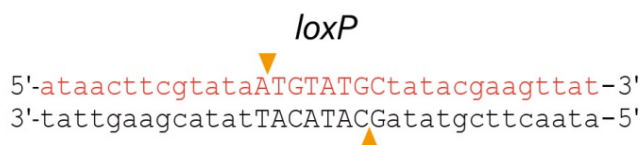


图1. loxP位点序列图。Cre重组酶与两端13bp反向重复序列(小写字母)结合, 中间是8bp不对称中心间隔区(大写字母), 箭头所示为Cre重组酶的酶切位点。

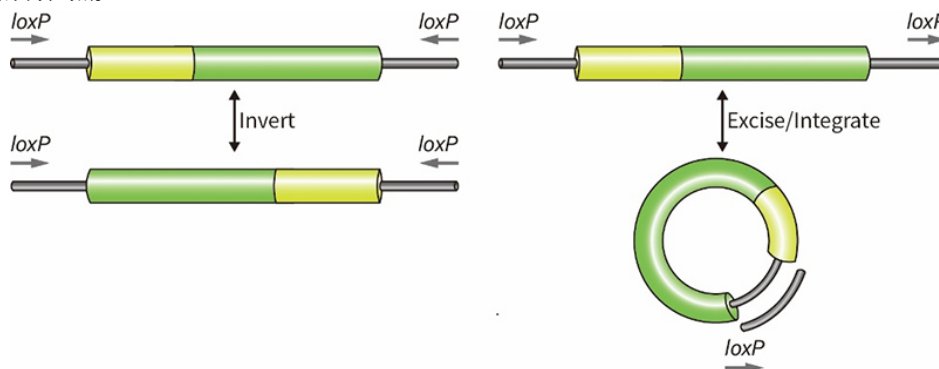


图2. Cre-loxP位点特异性重组示意图。

- 本细胞株中含有loxP-STOP-loxP-EGFP元件, 在没有Cre重组酶存在的情况下, EGFP的表达会被阻断, 观察不到绿色荧光。在细胞中转染表达Cre重组酶的质粒(例如D2607 pCMV-Cre-mCherry)、与可以直接穿透细胞膜的D0512 TAT-Cre Recombinase孵育、或直接转染Cre重组酶(例如D0509 Cre Recombinase)时, Cre重组酶可以剪切并重组loxP位点, 去除两个loxP位点之间的3×SV40 poly(A)这个STOP元件, 从而激活EGFP的表达, 随后可以通过荧光显微镜等荧光检测设备进行观察和检测。
- 本细胞株中的loxP-STOP-loxP-EGFP元件通过PCR扩增和测序验证。
- 本细胞株经过支原体检测(Mycoplasma Test), 检测结果为阴性。
- 本单克隆细胞株构建之前通过STR (short tandem repeats)鉴定。
- Cre重组酶(Cre Recombinase)作用于本细胞株后, 细胞的明场和荧光图片请参考图3。

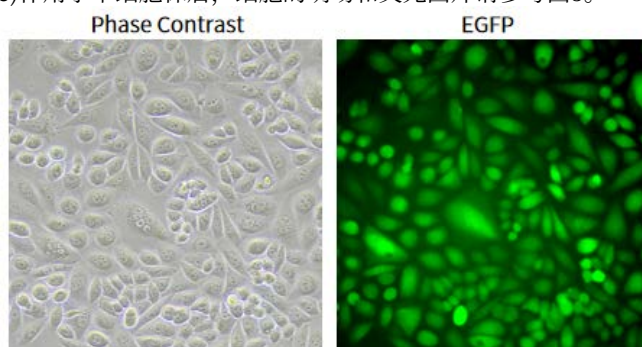


图3. 碧云天LoxP-STOP-loxP-EGFP HeLa Cells (C7996)功能鉴定图。按照每孔约10万LoxP-STOP-loxP-EGFP HeLa Cells接种到24孔板进行培养过夜，使细胞密度能达到约60%。每孔用 PBS洗一次，每孔加入0.5ml含4μM TAT-Cre Recombinase的完全培养液(含有血清和链霉素\青霉素)。继续培养6h后，更换为不含TAT-Cre Recombinase (D0512)的完全培养液，24h后通过荧光显微镜下可以观察到细胞内绿色荧光。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- 本细胞株的培养条件可以参考HeLa细胞的培养条件，可以同时培养液中添加终浓度为200μg/ml的G418，以维持适当的筛选压力。进行Cre重组酶测试时，可以考虑去除G418，以减少G418可能产生的干扰。

➤ HeLa细胞的基本信息如下:

Organism	Tissue	Morphology	Culture Properties
Homo sapiens (Human)	Cervix	Epithelial	Adherent

➤ HeLa细胞的详细信息如下:

General Information	
Cell Line Name	HeLa (Human Cervical Cancer Cells)
Synonyms	HELA; Hela; He La; He-La; Henrietta Lacks cells; Helacyton gartleri
Organism	Homo sapiens (Human)
Tissue	Cervix
Cell Type	Epithelial
Morphology	Epithelial
Disease	Denocarcinoma
Strain	—
Biosafety Level*	2 [Cells contain human papilloma virus]
Age at Sampling	31 years adult
Gender	Female
Genetics	—
Ethnicity	Black
Applications	These cells are a suitable transfection host. This cell line can be used to screen for Escherichia coli strains with invasive potential.
Category	Cancer cell line

* Biosafety classification is based on U.S. Public Health Service Guidelines, it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country.

Characteristics	
Karyotype	Modal number = 82; range = 70 to 164. There is a small telocentric chromosome in 98% of the cells. 100% aneuploidy in 1385 cells examined. Four typical HeLa marker chromosomes have been reported in the literature. HeLa Marker Chromosomes: One copy of M1, one copy of M2, four-five copies of M3, and two copies of M4 as revealed by G-banding patterns. M1 is a rearranged long arm and centromere of chromosome 1 and the long arm of chromosome 3. M2 is a combination of short arm of chromosome 3 and long arm of chromosome 5. M3 is an isochromosome of the short arm of chromosome 5. M4 consists of the long arm of chromosome 11 and an arm of chromosome 19. Note: Cytogenetic information is based on initial seed stock at ATCC. Cytogenetic instability has been reported in the literature for some cell lines.
Virus Susceptibility	Human adenovirus 3 Encephalomyocarditis virus Human poliovirus 1 Human poliovirus 2 Human poliovirus 3
Derivation	—
Clinical Data	31 years; Black; female
Antigen Expression	—
Receptor Expression	—
Oncogene	—

Genes Expressed	Ysophosphatidylcholine (lyso-PC) induces AP-1 activity and c-jun N-terminal kinase activity (JNK1) by a protein kinase C-independent pathway. The cells are positive for keratin by immunoperoxidase staining.
Gene expression databases	ArrayExpress: E-MTAB-2706; E-MTAB-3610; GEO: GSM113863; GSM226739; GSM226875; GSM253298; GSM436128; GSM436129; GSM723055; GSM723056; GSM1088663; GSM1088664; GSM1088665; GSM1088666; GSM1374528; GSM1669875
Metastasis	—
Tumorigenic	—
Effects	—
Comments	The cells are positive for keratin by immunoperoxidase staining. HeLa cells have been reported to contain human papilloma virus 18 (HPV-18) sequences. P53 expression was reported to be low, and normal levels of pRB (retinoblastoma suppressor) were found.

Culture Method	
Doubling Time	31~48 hrs
Methods for Passages	Wash by PBS once then 0.25% trypsin-EDTA solution and incubate at room temperature (or at 37°C), observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 1 to 5 minutes)
Medium	MEM+10% FBS
Special Remarks	—
Medium Renewal	2 to 3 times per week
Subcultivation Ratio	1:2 to 1:6
Growth Condition	95% air+ 5% CO ₂ , 37°C
Freeze medium	DMEM (high glucose)+20% FBS+10% DMSO, 也可以订购碧云天的细胞冻存液(C0210)。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C7996	LoxP-STOP-loxP-EGFP HeLa Cells	1支/瓶
—	说明书	1份

保存条件：

对于细胞培养瓶或离心管运输的活细胞，室温3-5天有效。对于干冰运输的冻存细胞，液氮保存，长期有效；-80°C保存，2个月有效。

注意事项：

- 本细胞株未经碧云天书面许可不得用于任何商业用途，也不得移交给订货人所在实验室外的任何个人或单位。使用者在发表研究论文或结果时，应注明细胞株的来源。
- 本细胞株相关资料参考ATCC (American Type Culture Collection)、DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)、JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank)、Cellosaurus (Swiss Institute of Bioinformatics)等网站信息，并结合碧云天实际培养信息综合而成。由于细胞培养的条件、代数等因素，实际细胞可能与本说明书提供的信息有一定的差异，具体以实际细胞为准。
- STR结果可以与ATCC、DSMZ及中国国家实验细胞资源共享平台等网站的数据库进行比对，匹配度80%以上即可认为该细胞系正确。
- 本产品会根据细胞是否正在培养、目的地距离等因素确定运输方式：冷冻的细胞冻存管(干冰)、一小瓶贴壁培养的细胞或一小瓶/管悬浮培养的细胞(常温)。为了更好地耐受长途运输和环境温度等变化，对于正常贴壁培养的细胞，也可能会以悬浮的形式培养在细胞培养瓶或离心管中进行运输。
- 对于干冰运输的冻存细胞，若干冰已经完全融化，请立即将细胞复苏培养，切勿再次低温冻存；若尚留有干冰，请直接复苏培养或立即将含有细胞的冻存管放入液氮中保存待用，切不可将细胞置于高温环境。
- 收到冻存的细胞后请尽快复苏细胞进行培养，以确认细胞活力、状态并保种。如暂时不进行复苏操作，冻存细胞可在-80°C条件下保存2个月。
- 每支冻存管约含1×10⁶个细胞，体积为0.5-1ml，预期存活率60-90%，建议复苏至1个6cm培养皿中。如果复苏后存活率较低，可以消化后转移至3.5cm培养皿中，这样细胞生长会更好。
- 如果本产品是常温运输，并且是培养瓶中充满完全培养液的贴壁细胞，收到细胞后请在显微镜下观察细胞生长状态，如果细胞密度超过85%请尽快进行传代操作；如果悬浮的细胞较多，请将培养瓶置于培养箱中静置过夜以使悬浮的细胞再次贴壁。如果收到

的是常温运输的离心管装的悬浮细胞，可以直接取出转移至培养皿或培养瓶中培养。若培养液颜色正常则保留培养液继续培养，并且在首次更换培养液时，保留一半原培养液，并加入一半新鲜培养液，这样可以尽量避免由于培养液或血清差异导致细胞生长的不适应，确保细胞良好的生长状态。

- 细胞培养请在生物安全柜台中进行操作，并严格遵守无菌操作。
- 请在培养液中加入适量青霉素-链霉素溶液以防止可能的细菌污染，如碧云天的青霉素-链霉素溶液(100X) (C0222)。
- 理论上永生化细胞可无限传代，但为了保证细胞的良好状态，建议最早培养的几代细胞就冻存一批，并每培养一段时间后复苏早期冻存的细胞进行培养。
- 接收、处理、保存、丢弃及使用细胞的时候要遵守相关法律法规，充分考虑可能存在的风险和责任，采取适当的安全和处理措施尽量降低对健康或环境的危害。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 细胞株的复苏

- 将冻存管在37°C水浴锅中迅速完全融化(保持冻存管的盖子在液面以上以防止污染)，并适当轻轻摇晃促融，切勿vortex。快速、完全融化可以提高细胞的复苏效果。
- 打开冻存管前时用70%酒精擦拭细胞冻存管外壁，注意某些记号笔不耐酒精，小心标注的记号被擦拭掉。
- 将完全融化的细胞直接离心，或者转移至无菌1.5ml或其它合适无菌离心管中，500g离心2-5min，吸除上清，注意不要吸走细胞沉淀，然后用新鲜完全培养液重悬后转移至培养器皿，混匀，置于CO₂培养箱37°C培养。
- 第二天视贴壁或生长状态，更换培养液。

2. 贴壁细胞的常规传代流程

- 将细胞培养液、PBS等放入37°C水浴锅内预热。
- 以10cm细胞培养皿为例。吸出原培养皿中的培养液，用2-5ml无菌PBS润洗细胞1-2次以去除残留的血清(如果细胞贴壁较差，润洗时要轻柔以避免细胞飘起)，然后加1-2ml胰酶细胞消化液(含EDTA)室温消化，注意消化时间，通常为1-5分钟。如果细胞比较难消化，可以置于37°C细胞培养箱一定时间以加速消化。**注意：**消化时间过长，会导致传代后细胞出现生长状态不良的情况。
- 每30秒-1分钟用显微镜观察细胞消化情况，贴壁细胞明显收缩、细胞间间隙变大、细胞趋于圆形但还未漂起，并用移液器吹打细胞发现细胞刚好可以被吹打下来时，吸除胰酶细胞消化液，再加入1-2ml新鲜完全培养液，适当晃动细胞皿以终止胰酶作用，用移液器轻轻吹打贴壁的细胞，获取细胞悬液。吹打时需控制力度，避免产生大量气泡，将细胞悬液分别接种到另外的2~5个细胞培养皿内，加入新鲜培养液，置于CO₂培养箱37°C培养，第2天观察细胞贴壁生长情况。
- 也可以在消化后，加3-5ml完全培养液终止消化，用移液器轻轻吹打细胞悬液，尽量把细胞全部吹落、吹散，然后将全部细胞悬液500g离心2-5min，离心后去上清，再用完全培养液重悬后转移到新的培养皿中，添加适量完全培养液，于CO₂培养箱37°C培养。
- 注意培养液的酚红颜色变化或根据细胞的换液要求定期换液，待细胞密度达到80-90%时需要传代或者冻存。如果没有及时传代导致细胞过密，传代后细胞容易出现生长状态不良的情况。

3. 悬浮细胞的常规传代流程

- 将细胞悬液转移到无菌离心管内，500g离心2-5min，弃去上清，加入新鲜的培养液，用吸管小心吹散沉淀，获取细胞悬液，将细胞悬液分别接种到另外的2-5个细胞瓶内，加入新鲜完全培养液，置于CO₂培养箱37°C培养。
- 也可以取少量悬浮细胞直接转移到新的培养瓶中，添加适当的新鲜完全培养液，置于CO₂培养箱37°C培养。
- 注意培养液的酚红颜色变化或根据细胞的换液要求定期换液，待细胞密度达到80-90%时可以考虑传代或者冻存。

4. 半贴壁半悬浮细胞的培养

- 若悬浮细胞较多且折光率良好，可离心收集，继续培养。
- 若仅有少量细胞悬浮，也可不用收集，传代操作按常规贴壁细胞操作流程处理。
- 若悬浮细胞较多，离心收集，原瓶中贴壁细胞按照常规贴壁细胞操作流程进行消化、终止消化、吹打，并与之前收集的悬浮细胞混合，接种到新的细胞培养皿中。

5. 细胞株的冻存

- 按照细胞传代方法收集细胞。
- 细胞计数：一般要求冻存的细胞，每毫升的细胞数量为 1×10^6 - 10^7 个细胞。
- 取适当细胞悬液，500g离心2-5min，弃上清，加入细胞冻存液，重悬，转移到冻存管中，用记号笔标记好细胞株名称、冻存日期、代数等信息，并记录在相应表格中以便管理和快速查找细胞位置。
- 将冻存管放入专用的细胞冻存盒中，-80°C过夜，然后转移至液氮罐中保存。如果没有专用的细胞冻存盒，可以按下面程序进行冻存：4°C 1h，-20°C 2h，-80°C过夜，然后转移至液氮罐中保存。冻存细胞储存在-80°C中通常不建议超过半年，时间太长会影响复苏效率。推荐使用碧云天的BeyoCool™细胞冻存盒(FCFC012)。
- 为保持细胞的良好状态，每隔1年，取出1-2支冻存的细胞复苏一次，并冻存新的细胞。

6. 本细胞株的检测

- 对于细胞株中正常情况下被阻断表达的EGFP荧光蛋白，可以通过在细胞中转染表达Cre重组酶的质粒(例如D2607 pCMV-Cre-mCherry)或直接转染Cre重组酶(例如D0509 Cre Recombinase)，以剪切并重组loxP位点，从而激活EGFP的表达，随

后可以通过荧光显微镜等荧光检测设备进行观察和检测。

- b. 对于细胞株中是否存在loxP-STOP-loxP-EGFP元件相应的DNA序列的检测，可以通过抽提细胞基因组DNA后，使用5’ - CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3’ 和5’ -CTCCTCGCCCTTGCTCACCAT-3’ 作为引物，通过PCR扩增插入到基因组中的相应DNA序列，PCR扩增产物长度约1085bp，并对PCR扩增产物进行直接测序或插入到T载体中后进行测序鉴定。推荐使用无需基因组DNA抽提的碧云天生产的D7281 动物组织直接PCR试剂盒或D7285 Easy-Load™ Blood Direct PCR Master Mix (2X)进行PCR扩增。

参考文献：

1. Pinkney JN, Zawadzki P, Mazuryk J, Arciszewska L K, Sherratt D J, Kapanidis A N. Proc Natl Acad Sci USA. 2012. 109(51):20871-6.
2. Kühn R, Torres R M. Methods Mol Biol. 2002. 180:175-204.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0201-100ml	胰酶细胞消化液(0.25%胰酶)	100ml
C0201-500ml	胰酶细胞消化液(0.25%胰酶)	500ml
C0202	胰酶细胞消化液(0.05%胰酶)	100ml
C0203-100ml	胰酶细胞消化液(0.25%胰酶, 含酚红)	100ml
C0203-500ml	胰酶细胞消化液(0.25%胰酶, 含酚红)	500ml
C0204	胰酶细胞消化液(0.05%胰酶, 含酚红)	100ml
C0205	胰酶细胞消化液(0.25%胰酶, 不含EDTA)	100ml
C0207	胰酶细胞消化液(0.25%胰酶, 含酚红, 不含EDTA)	100ml
C0210	细胞冻存液	50ml
C0212	L-Glutamine (100X)	100ml
C0218	Hanks' Balanced Salt Solution	500ml
C0219	Hanks' Balanced Salt Solution (with Ca ²⁺ & Mg ²⁺)	500ml
C0220	7.5% NaHCO ₃ 溶液	100ml
C0221A	PBS	500ml
C0221D	D-PBS	500ml
C0221G	D-PBS (with Ca ²⁺ & Mg ²⁺)	500ml
C0222	青霉素-链霉素溶液(100X)	100ml
C0225	胎牛血清(AusgeneX原装, 优级)	500ml
C0226	胎牛血清(Biowest原装, 产地南美)	500ml
C0227	胎牛血清(AusgeneX原装, 特级)	500ml
C0230	胎牛血清(Bovogen原装, 产地南美)	500ml
C0232	胎牛血清(Gibco原装, 产地南美)	500ml
C0234	胎牛血清(Gibco分装, 产地澳洲)	50ml
C0235	胎牛血清(Gibco原装, 产地澳洲)	500ml
C0251	胎牛血清(产地南美)	50ml
C0252	胎牛血清(产地南美)	500ml
C0258	新生牛血清(产地新西兰)	50ml
C0262	马血清(产地新西兰)	50ml
C0265	山羊血清	50ml
C0288S	支原体清除试剂	20mg
C0288M	支原体清除试剂	100mg
C0290S	支原体清除试剂Plus	10mg
C0290M	支原体清除试剂Plus	50mg
C0296	支原体染色检测试剂盒	>100次
FBX081	81孔液氮罐专用冻存盒	1个/包
FBX082	100孔液氮罐专用冻存盒	1个/包
FCD035	BeyoGold™ 35mm细胞培养皿	10个/袋, 20袋/箱
FCD060	BeyoGold™ 60mm细胞培养皿	10个/袋, 20袋/箱
FCD100	BeyoGold™ 100mm细胞培养皿	10个/袋, 20袋/箱
FCFC012	BeyoCool™细胞冻存盒	1个/盒

FCN110	10毫升移液管(无菌, CORNING原装)	50个/包
FCN125	25毫升移液管(无菌, CORNING原装)	25个/包
FCP060	BeyoGold™ 6孔细胞培养板	50个/箱
FCP126	BeyoGold™ 12孔细胞培养板	50个/箱
FCP243	BeyoGold™ 24孔细胞培养板	50个/箱
FCP485	BeyoGold™ 48孔细胞培养板	50个/箱
FCP962	BeyoGold™ 96孔细胞培养板	50个/箱
FCP966-320pcs	BeyoGold™全黑96孔细胞培养板 (平底带盖, 独立包装)	80个/盒, 320个/箱
FCP966-80pcs	BeyoGold™全黑96孔细胞培养板 (平底带盖, 独立包装)	80个/盒
FCP968-320pcs	BeyoGold™全白96孔细胞培养板 (平底带盖, 独立包装)	80个/盒, 320个/箱
FCP968-80pcs	BeyoGold™全白96孔细胞培养板 (平底带盖, 独立包装)	80个/盒
FFLK021	BeyoGold™ 25cm ² 透气盖细胞培养瓶	10个/包, 200个/箱
FFLK023	BeyoGold™ 25cm ² 密封盖细胞培养瓶	10个/包, 200个/箱
FFLK075	BeyoGold™ 75cm ² 透气盖细胞培养瓶	5个/包, 100个/箱
FFLK077	BeyoGold™ 75cm ² 密封盖细胞培养瓶	5个/包, 100个/箱
FFLK176	BeyoGold™ 175cm ² 透气盖细胞培养瓶	5个/包, 40个/箱
FFLK178	BeyoGold™ 175cm ² 密封盖细胞培养瓶	5个/包, 40个/箱
FLFT021	BeyoGold™ 21cm细胞铲(独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FPIP105	BeyoGold™ 5毫升移液管(无菌, 独立纸塑包装)	50个/包, 4包/箱
FPIP110	BeyoGold™ 10毫升移液管(无菌, 独立纸塑包装)	50个/包, 4包/箱
FPIP125	BeyoGold™ 25毫升移液管(无菌, 独立纸塑包装)	25个/包, 8包/箱
FSCP023	BeyoGold™ 23cm细胞刮(独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FSCP029	BeyoGold™ 29cm细胞刮(独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FSTR040	BeyoGold™细胞过滤器(40μm孔径, 独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FSTR070	BeyoGold™细胞过滤器(70μm孔径, 独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FSTR100	BeyoGold™细胞过滤器(100μm孔径, 独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FTIP610	BeyoGold™无菌盒装吸头(0.1-10μl, 无色)	96个/盒, 50盒/箱
FTIP616	BeyoGold™无菌盒装低吸附吸头(0.1-10μl, 无色)	96个/盒, 50盒/箱
FTIP620	BeyoGold™无菌盒装吸头(1-200μl, 黄色)	96个/盒, 50盒/箱
FTIP628	BeyoGold™无菌盒装吸头(100-1000μl, 蓝色加长)	96个/盒, 50盒/箱
FTUB306	BeyoGold™ 1.5毫升离心管(无色, Nuclease free)	500个/盒, 10盒/箱
FTUB515	BeyoGold™ 15毫升锥形离心管	25个/包, 20包/箱
FTUB550	BeyoGold™ 50毫升锥形离心管	25个/包, 20包/箱
ST083	L-Glutamine	100g
ST476	PBS (10X)	500ml
ST875-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (细胞培养级)	100ml
ST875-500ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (细胞培养级)	500ml
ST081-1ml	G418 (遗传霉素)	50mg/ml×1ml
ST081-5ml	G418 (遗传霉素)	50mg/ml×5ml
ST081-1g	G418 (遗传霉素)	1g
ST081-5g	G418 (遗传霉素)	5g
D0509S	Cre Recombinase	50U
D0509M	Cre Recombinase	250U
D0509L	Cre Recombinase	1000U
D2607-1μg	pCMV-Cre-mCherry	1μg
D2607-100μg	pCMV-Cre-mCherry	100μg

Version 2022.05.20