

## 产品手册

### Cynomolgus\_NT5E(CD73) CHO-K1 Cell Line

### Cynomolgus\_NT5E(CD73) CHO-K1 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.8

## 目录

一、	产品基本信息及组分.....	3
二、	包装、运输及储存.....	3
三、	材料准备.....	3
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	3
2.	试剂耗材准备.....	3
四、	细胞培养、复苏、冻存.....	4
1.	Cynomolgus_NT5E(CD73) CHO-K1 Cell Line 细胞复苏.....	4
2.	Cynomolgus_NT5E(CD73) CHO-K1 Cell Line 细胞传代.....	4
3.	Cynomolgus_NT5E(CD73) CHO-K1 Cell Line 细胞冻存.....	5
五、	验证结果.....	6
1.	流式检测蛋白表达.....	6
	使用许可协议: .....	7
	附录 1 Cynomolgus_NT5E(CD73)氨基酸序列 (A0A2K5V5U7-1) .....	8

## 一、产品基本信息及组分

### 基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-C25730	Cynomolgus_NT5E(CD73) CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL

### 组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C25730	Cynomolgus_NT5E(CD73) CHO-K1 Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C

## 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 Assay，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

## 三、材料准备

### 1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

细胞复苏培养基:	F12K+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	F12K+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Puromycin
细胞冻存培养基:	90% FBS+10% DMSO

### 2. 试剂耗材准备

#### 试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	Thermo/10099141
F12K	500 mL	BOSTER/PYG0036
Anti-H_NT5E hIgG1 Antibody	/	Genomeditech/555956

#### 重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
流式细胞仪	贝克曼库尔特国际贸易（上海）有限公司/CytoFLEX

## 四、 细胞培养、复苏、冻存

### 1. Cynomolgus\_NT5E(CD73) CHO-K1 Cell Line 细胞复苏

- 细胞冻存密度为  $5 \times 10^6$  cells/mL，冻存管分装 1 mL。
- 在 37°C 水浴锅预热培养基，加入预热完全培养基 5 mL 到 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存的细胞并迅速放入 37°C 恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化。
- 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预先加有预热好的 15 mL 离心管中，轻轻混匀，1000 rpm，离心 5 min 使细胞沉淀，弃上清。
- 冻存细胞离心后收集沉淀，使用 1 mL 完全培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，活细胞大于  $3 \times 10^6$  cells/mL。
- 通过补加完全培养基的形式，调整活细胞密度到  $2-3 \times 10^5$  cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中，参考体系：10 cm 皿（8-10 mL 悬液）；6 cm 皿/T25 瓶（5 mL 悬液）。后续细胞传代可根据培养皿中细胞聚合度调整。

### 2. Cynomolgus\_NT5E(CD73) CHO-K1 Cell Line 细胞传代

- 放入 37°C 恒温培养箱中孵育 24 h，镜下观察细胞贴壁情况。如已贴壁，根据细胞密度，小心更换培养基或进行细胞传代。当细胞密度大于 60% 时，即可进行传代。如未贴壁，继续孵育观察。
- 细胞消化液：0.25% Trypsin-EDTA，消化时间为：2-3 min。
- 贴壁细胞按细胞密度（汇合度）进行传代，推荐细胞传代比例为 1:4-1:5，2-3 天传代传代。
- 将皿或培养瓶中的培养基用移液管或吸管弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- 弃 PBS，加 1 mL 消化液润洗一遍，吸弃，再次吸取 1 mL 消化液，37°C 消化 2-3 min，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。
- 加 2 mL 左右完全培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，1000 rpm 室温离心 3 min。

- g) 弃上清，细胞沉淀用完全培养基重悬，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 20-30%）。

	培养基	面积	接种细胞量	汇合度 100%
35mm Dish	2 mL	9.6 cm <sup>2</sup>	0.3 × 10 <sup>6</sup>	1.2 × 10 <sup>6</sup>
60 mm Dish	5 mL	28 cm <sup>2</sup>	0.8 × 10 <sup>6</sup>	3.2 × 10 <sup>6</sup>
100 mm Dish	10 mL	78 cm <sup>2</sup>	2.2 × 10 <sup>6</sup>	8.8 × 10 <sup>6</sup>
T-25 Flask	5 mL	25 cm <sup>2</sup>	0.7 × 10 <sup>6</sup>	2.8 × 10 <sup>6</sup>
T-75 Flask	10 mL	75 cm <sup>2</sup>	2.1 × 10 <sup>6</sup>	8.4 × 10 <sup>6</sup>

### 3. Cynomolgus\_NT5E(CD73) CHO-K1 Cell Line 细胞冻存

- 细胞冻存液：90% FBS+10% DMSO。
  - 使用 1000 rpm，3 min 离心收集细胞。
  - 使用预冷细胞冻存液重悬细胞，细胞密度调整为 5 × 10<sup>6</sup> cells/mL。
  - 每管 1 mL 分装到细胞冻存管中，冻存体积为 1 mL，冻存密度为 5 × 10<sup>6</sup> cells/mL。
- 拧紧盖子，适当标记后，将细胞冻存管置于梯度降温盒中，在-80℃下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

## 五、 验证结果

### 1. 流式检测蛋白表达

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐Cynomolgus\_NT5E(CD73) CHO-K1 Cell Line细胞量为 $2 \times 10^5$  cells/管。操作步骤如下：

- a) 实验前，需等待细胞生长速率稳定，约需要3-5 d。
- b) 实验当天，消化Cynomolgus\_NT5E(CD73) CHO-K1 cell line，取100  $\mu$ L细胞悬液（细胞计数后用PBS调整浓度为 $2 \times 10^6$  cells/mL），加入适量的表面抗体（Anti-H\_NT5E hIgG1 Antibody），4°C避光孵育1 h。
- c) 加入1-2 mL PBS冲洗，重复此步骤。
- d) 加入荧光标记的二抗，4°C避光孵育30 min。
- e) 1000 rpm离心5 min，去除上清，用300  $\mu$ L PBS重悬。
- f) 立即上机检测。
- g) 验证结果。

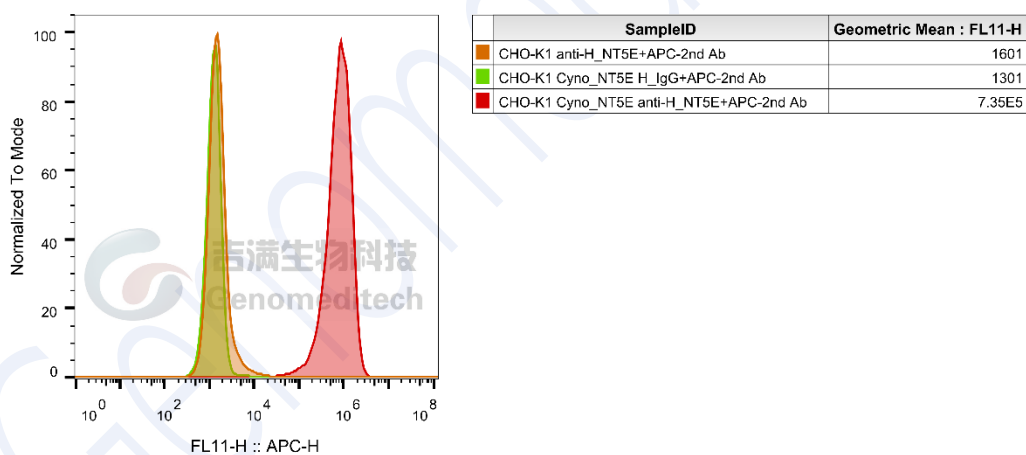


Fig.流式验证结果

## 使用许可协议:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech

## 附录 1 Cynomolgus\_NT5E(CD73)氨基酸序列

(A0A2K5V5U7-1)

MCPRAARAPATLLLA VGALLWSAAGAWELTILHTNDVHSRLEQTSSESSKCVNASRCM  
GGVARLFTKVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGAEV AHFMNALRYDAMAL  
GNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVV GIVGY  
TSKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKCLKTLNVNKIIALGHSGFETDKLIAQKVRGVD  
VVVGGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVQAYAFGKYLGYLKIEFDER  
GNVISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECN  
MGNLICDAMINNNLRHADEMFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFG  
GTFDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKP GDRVVKLDVLC T  
KCRVPSYDPLKMDEIYKVILPNFLANGGDFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKV  
IYPAVEGRIKFSTGSHCHGSFSLIFLSFCAVIFVLYQ