

## mCherry-p65 NIH/3T3 Cells

产品编号	产品名称	包装
C8010	mCherry-p65 NIH/3T3 Cells	1支/瓶

### 产品简介:

Transgene	Organism	Tissue	Morphology	Culture Properties
mCherry-p65	<i>Mus musculus</i> (Mouse)	Embryo	Fibroblast	Adherent

- mCherry-p65 NIH/3T3 Cells, 即mCherry-p65 NIH/3T3细胞, 是一种可以通过CMV启动子组成型表达mCherry-p65融合蛋白的多克隆NIH/3T3稳定细胞株(Polyclonal NIH/3T3 stable cell line), 主要适用于通过荧光显微镜等观察和分析NF- $\kappa$ B中的p65亚基的细胞内定位, 从而确定pNF- $\kappa$ B信号通路的激活和抑制。本细胞株带有通过EF1 $\alpha$ 启动子表达的嘌呤霉素(Puromycin)抗性筛选基因, 建议使用2 $\mu$ g/ml Puromycin (ST551)维持稳定细胞株中相应基因的表达。
- NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, 中文名为激活的B细胞核因子kappa-轻链增强子, 是细胞内重要的核转录因子, 参与细胞对外界刺激的响应、炎症反应、免疫应答等过程, 几乎存在于所有类型的动物细胞中。NF- $\kappa$ B作为转录因子蛋白家族, 包括5个亚单位: p50 (NF- $\kappa$ B1)、p52 (NF- $\kappa$ B2)、p65 (REL-associated protein, Rel-A)、Rel-B和c-Rel, 它们的N端都具有高度保守的RHD (REL homology domain); 5个亚单位根据C端结构域的不同被分为两类, 第一类为p50、p52, 其C端具有ankyrin重复结构域具有转录抑制活性(Transrepression activity)和招募IKK (Inhibitory  $\kappa$ B kinase)的致死结构域(Dead domain); 第二类为p65、Rel-B和c-Rel, 其C端具有转录所必需的转录激活结构域(Transactivation domain, TAD) [1]。
- NF- $\kappa$ B在静息状态或失活状态(Resting state or inactive state)下, 其高度保守的RHD中的核定位信号(Nuclear localization sequence, NLS)与抑制因子I $\kappa$ B (Inhibitor of NF- $\kappa$ B)结合形成非活性复合物, NF- $\kappa$ B以失活状态存在于细胞质中。虽然I $\kappa$ B蛋白掩盖了p65的NLS信号, 但没有掩盖p50的NLS信号, 因此静息状态下NF- $\kappa$ B可以持续在细胞核和细胞质之间穿梭(Shuttle)维持很低水平的活性[2]。
- NF- $\kappa$ B的激活存在两条途径, 即经典途径和非经典途径。**经典途径:** 在促炎信号(如炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1、病原体和病毒双链RNA等)刺激后, 使细胞中的IKK复合物被招募并激活, IKK复合物由IKK $\alpha$ 和/或IKK $\beta$ 催化亚基以和NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator, 亦称IKK $\gamma$ )组成, IKK复合物使I $\kappa$ B被磷酸化, 磷酸化的I $\kappa$ B随后发生泛素化被蛋白酶体降解, 使得NF- $\kappa$ B的核定位信号暴露从而进入细胞核激活靶基因; **非经典途径:** 该途径由NF- $\kappa$ B抑制激酶NIK (NF- $\kappa$ B inhibitory kinase)介导, NIK磷酸化并激活IKK的亚基IKK $\alpha$ , 磷酸化的IKK $\alpha$ 再使p100磷酸化, 导致加工和释放有活性的p52和RelB同源二聚体转移至细胞核并激活靶标基因, 这一过程发生在淋巴器官发育期间, 淋巴器官负责产生B淋巴细胞和T淋巴细胞[2]。
- 本细胞株通过荧光显微镜观察, 静息状态下mCherry-p65均匀分布在细胞质中, NF- $\kappa$ B被激活后mCherry-p65向细胞核内转移, 效果如图1所示。需要注意的是, 通常情况下终浓度为20ng/ml的TNF- $\alpha$  (P5320)能够有效刺激mCherry-p65进入细胞核, 但随着时间的延长mCherry-p65会出核并再次回到细胞质中, 因此加入TNF- $\alpha$ 后观察mCherry-p65进入细胞核理想的时间为15-60分钟之间(图1, 第2行); 为方便观察mCherry-p65的核转运所代表的NF- $\kappa$ B信号通路的激活, 可以加入终浓度为5nM的Leptomycin B (S1726), Leptomycin B是一种不饱和支链脂肪酸, 可以通透细胞, 抑制细胞核向细胞浆的蛋白转运, 在不影响mCherry-p65进入细胞核的前提下(图1, 第3行), 可以延长TNF- $\alpha$ 有效刺激mCherry-p65进入细胞核的滞留时间(图1, 第4行)。

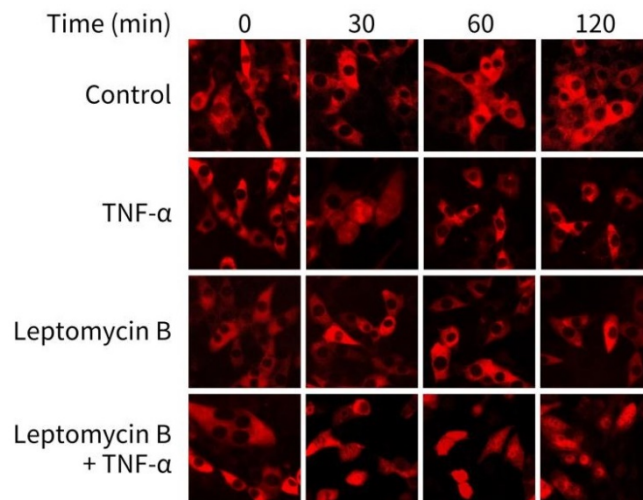


图1. 碧云天mCherry-p65 NIH/3T3 Cells (C8010)经TNF- $\alpha$ 激活NF- $\kappa$ B信号通路诱导核转运的效果图。稳定表达mCherry-p65的NIH/3T3细胞，加入或不加入终浓度为20ng/ml的TNF- $\alpha$  (P5320)和5nM的Leptomycin B (S1726)，分别在0、30、60和120分钟用荧光显微镜进行拍照。可见在静息状态(Inactive state)下，mCherry-p65均匀分布在细胞质中(第1行)；加入TNF- $\alpha$ 刺激后，激活状态(Active state)下mCherry-p65进入细胞核内(第2行，30分钟)，但是随着时间的延长mCherry-p65会出核再次回到细胞质中(第2行，120分钟)；终浓度为5nM的Leptomycin B不会导致mCherry-p65进入细胞核(第3行)，用Leptomycin B和TNF- $\alpha$ 一起处理细胞可以延长mCherry-p65进入细胞核的滞留时间，方便观察NF- $\kappa$ B的核转运(第4行)。实际效果会因实验仪器、检测条件等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

➤ 本细胞株详细信息如下:

General Information	
Cell Line Name	mCherry-p65 NIH/3T3 Cells
Transgene	CMV-mCherry-p65-EF1 $\alpha$ -Puro
Synonyms	/
Organism	<i>Mus musculus</i> (Mouse)
Tissue	Embryo
Cell Type	Polyclonal Stable Cell Line
Morphology	Fibroblast
Disease	—
Strain	NIH/Swiss
Biosafety Level*	1
Age at Sampling	Embryo
Gender	Male
Genetics	Whole embryo
Ethnicity	—
Applications	Stable cell lines with specific gene over-expression or knock-down are very helpful in gene function analysis, target discovery, target validation, assay development, and compound screening.
Category	—

\* 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	—
Virus Susceptibility	Murine leukemia virus
Derivation	—
Clinical Data	—
Antigen Expression	—
Receptor Expression	—
Oncogene	—
Genes Expressed	—
Gene expression databases	GEO: GSM1014177
Metastasis	—
Tumorigenic	—
Effects	—
Comments	Tested and found negative for ectromelia virus (mousepox).

Culture Method	
Doubling Time	~20 hrs
Methods for Passages	Wash by PBS once then 0.05% 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	90% DMEM (high glucose) + 10% FBS + 2 $\mu$ g/ml Puromycin
Special Remarks	—
Medium Renewal	Twice per week.DO NOT ALLOW THE CELLS TO BECOME CONFLUENT.
Subcultivation Ratio	3~5 $\times$ 10 <sup>3</sup> cells/cm <sup>2</sup>

Growth Condition	95% air + 5% CO <sub>2</sub> , 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)。

➤ 本细胞株经过支原体检测(Mycoplasma Test), 检测结果为阴性。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C8010	mCherry-p65 NIH/3T3 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 $1 \times 10^6$ 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

- a. 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。
- b. 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。
- c. 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, 500×g离心2-5分钟, 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CO<sub>2</sub>培养箱37°C培养。
- d. 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

- a. 将细胞培养液、PBS等放入37°C水浴锅内预热。
- b. 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:** 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。

- c. 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CO<sub>2</sub>培养箱37°C培养，第2天观察细胞贴壁生长情况。
- d. 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500×g离心2-5分钟，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CO<sub>2</sub>培养箱37°C培养。
- e. 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

- a. 将细胞悬液转移到无菌离心管内，500×g离心2-5分钟，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CO<sub>2</sub>培养箱37°C培养。
- b. 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CO<sub>2</sub>培养箱37°C培养。
- c. 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

- a. 若悬浮细胞较多且折光率良好，可离心收集，继续培养。
- b. 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。
- c. 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

- a. 按照细胞传代方法收集细胞。
- b. 细胞计数：一般要求冻存的细胞，每毫升的细胞数量为 $1 \times 10^6$ - $10^7$ 个细胞。
- c. 取适当细胞悬液，500×g离心2-5分钟，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。
- d. 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 1小时，-20°C 2小时，-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)。
- e. 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。

### 参考文献：

1. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. Sig Transduct Target Ther. 2017. 2:e17023.
2. Giridharan S, Srinivasan M. J Inflamm Res. 2018. 11:407-419.

### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C8001	EGFP-p65 HeLa Cells	1支/瓶
C8005	mCherry-p65 HeLa Cells	1支/瓶
C8007	EGFP-p65 NIH/3T3 Cells	1支/瓶
C8010	mCherry-p65 NIH/3T3 Cells	1支/瓶
D2820-1μg	pCMV-EGFP-p65	1μg
D2820-100μg	pCMV-EGFP-p65	100μg
D2821-1μg	pCMV-mCherry-p65	1μg
D2821-100μg	pCMV-mCherry-p65	100μg
C4003-100μl	Lenti-CMV-EGFP-p65-EF1α-Puro (10 <sup>9</sup> TU/ml)	100μl
C4005-100μl	Lenti-CMV-mCherry-p65-EF1α-Puro (10 <sup>9</sup> TU/ml)	100μl

Version 2022.06.23