

TOPFlash-Luc-EF1 α -mCherry NIH/3T3 Cells

产品编号	产品名称	包装
C8392	TOPFlash-Luc-EF1 α -mCherry NIH/3T3 Cells	1支/瓶

产品简介:

Transgene	Organism	Tissue	Morphology	Culture Properties
TOPFlash-Luc-EF1 α -mCherry-T2A-Puro	<i>Mus musculus (Mouse)</i>	Embryo	Fibroblast	Adherent

- TOPFlash-Luc-EF1 α -mCherry NIH/3T3 Cells, 即TOPFlash-Luc-EF1 α -mCherry-T2A-Puro NIH/3T3细胞, 是一种细胞基因组中含有多个TOPFlash结合位点的多克隆NIH/3T3稳定细胞株(Polyclonal NIH/3T3 stable cell line), 通过检测萤火虫萤光素酶(Firefly luciferase, Luc)的活性, 可以高灵敏度地检测TOPFlash的激活水平。本细胞株可通过EF1 α 启动子组成型表达mCherry和嘌呤霉素(Puromycin)抗性基因, 建议使用2 μ g/ml Puromycin (ST551)维持稳定细胞株中相应基因的表达。
- 本细胞株的阴性对照为EF1 α -mCherry NIH/3T3 Cells (C8371), 阳性对照为EF1 α -Luc NIH/3T3 Cells (C8395), 原始细胞株为NIH/3T3 (小鼠胚胎成纤维细胞) (C7204)。
- 萤光素、萤光素酶、萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶也经常被称为荧光素、荧光素酶、萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶。萤火虫萤光素酶是一种分子量约为61kD的蛋白, 在ATP、镁离子和氧气存在的条件下, 可以催化Luciferin氧化成Oxyluciferin, 在Luciferin氧化的过程中, 会发出波长为560nm左右的生物萤光(Bioluminescence) [1]。生物萤光可以通过化学发光仪(Luminometer)或液闪测定仪进行测定。通过萤光素和萤光素酶这一生物发光体系, 可以非常灵敏、高效地检测基因的表达。本报告基因稳定细胞株中的萤火虫萤光素酶编码进行了改进, 能更好地在细胞中进行稳定表达。
- EF1 α (EF1 α)启动子是一种来源于延伸因子1 α (Elongation factor 1 alpha, EF1 α) 基因的强哺乳动物表达启动子, 可在多种细胞中稳定驱动其下游基因的组成型表达, 也可以用于干细胞、原代细胞、造血细胞等。
- mCherry是一种来自于蘑菇珊瑚(Mushroom coral)的单体红色荧光蛋白, 最大激发光(Excitation, Ex) 587nm/发射光(Emission, Em) 610nm, 具有卓越的荧光稳定性, 广泛应用于分子标记和细胞组分定位。
- T2A是来源于豚脉扁刺蛾病毒(Thosea asigna virus, TaV), 是2A肽的一种, 编码产生一种具有自我加工能力的短肽, 能够在翻译后进行自我剪切, 可以实现利用一个转录本翻译出多个蛋白质的功能[1]。T2A目前被认为具有最高的‘剪切’效率, 很多情况下接近100%, 所以通常T2A上下游蛋白的表达水平相当, 但上游蛋白的C端会添加一些额外的T2A肽段的残基, 而下游蛋白的N端将会有额外的脯氨酸。本产品表达的萤火虫萤光素酶和嘌呤霉素抗性基因的正常功能均不受额外的氨基酸影响。
- 本细胞株的培养图片如下:

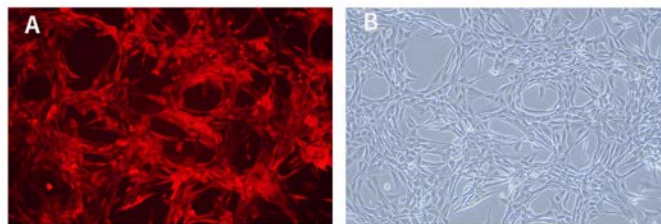


图1. 碧云天TOPFlash-Luc-EF1 α -mCherry NIH/3T3 Cells (C8392) 的荧光显微镜观察图。A为荧光照片, B为明场照片。实际检测效果会因检测仪器、实验条件的不同而存在差异, 本图仅供参考。

➤ 本细胞株详细信息如下:

General Information	
Cell Line Name	TOPFlash-Luc-EF1 α -mCherry NIH/3T3 Cells
Transgene	TOPFlash-Luc-EF1 α -mCherry-T2A-Puro
Synonyms	/
Organism	<i>Mus musculus (Mouse)</i>
Tissue	Embryo
Cell Type	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	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	—
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 hours
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 + 2µg/ml Puromycin
Special Remarks	—
Medium Renewal	Twice per week. DO NOT ALLOW THE CELLS TO BECOME CONFLUENT.
Subcultivation Ratio	3~5×10 ³ cells/cm ²
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)或 BeyoAOF™无血清细胞冻存液(C0210B)。

➤ 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
C8392	TOPFlash-Luc-EF1α-mCherry 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。本细胞株的STR结果请参考原始细胞株。
- 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 1×10^6 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， $500 \times g$ 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：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 $500 \times g$ 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，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1×10⁶-10⁷个细胞。
- 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。
- 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)。
- 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：

- Li J, Chen L, Du L, Li M. Chem Soc Rev. 2013. 42(2):662-76.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0191-100ml/500ml	BeyoTryp™ Express Enzyme (1X, 含酚红, AOF)	100ml/500ml
C0192-100ml/500ml	BeyoTryp™ Express Enzyme (1X, 不含酚红, AOF)	100ml/500ml
C0193-100ml	BeyoTryp™ Express Enzyme (10X, 含酚红, AOF)	100ml
C0194-100ml	BeyoTryp™ Express Enzyme (10X, 不含酚红, AOF)	100ml
C0196-100ml/500ml	0.5M EDTA, pH8.0 (Sterile, Cell Culture Grade)	100ml/500ml
C0198-100ml	BeyoAOF™ 0.02% EDTA细胞解离液(Versene溶液)	100ml
C0201-100ml/500ml	胰酶细胞消化液(0.25%胰酶)	100ml/500ml
C0202	胰酶细胞消化液(0.05%胰酶)	100ml
C0203-100ml/500ml	胰酶细胞消化液(0.25%胰酶, 含酚红)	100ml/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
C0208-100ml/500ml	BeyoAOF™重组胰酶细胞消化液(含酚红)	100ml/500ml
C0209-100ml/500ml	BeyoAOF™重组胰酶细胞消化液(不含酚红)	100ml/500ml
C0210	细胞冻存液	50ml
C0210B-50ml/200ml	BeyoAOF™无血清细胞冻存液	50ml/200ml
C0211-100ml	L-Ala-Gln (100X)	100ml
C0212	L-Glutamine (100X)	100ml
C0215-100ml/500ml	HEPES Solution (1M, pH7.3, 细胞培养用)	100ml/500ml
C0217-100ml/500ml	HEPES Solution (1M, pH7.5, 细胞培养用)	100ml/500ml
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
C0223-100ml	青霉素-链霉素-庆大霉素溶液(100X)	100ml
C0224-100ml	青霉素-链霉素-两性霉素B溶液(100X)	100ml
C0226	胎牛血清(Biowest原装, 产地南美)	500ml

C0226S	胎牛血清(Biowest分装, 产地南美)	50ml
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
C0236	胎牛血清(原装, 产地澳洲)	500ml
C0237	胎牛血清(Gibco原装, 产地澳洲)	500ml
C0238	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
C0265	山羊血清	50ml
C0280S/M/L	Myco-Zero™支原体去除试剂	5次/20次/100次
C0283-500ml/2L	Myco-Zero™支原体去除喷雾剂	500ml/2L
C0285S/M/L	Myco-Zero™ Plus支原体去除试剂	50次/250次/1000次
C0288S/M	支原体清除试剂	20mg/100mg
C0290S/M	支原体清除试剂Plus	10mg/50mg
C0292-2ml/10ml	支原体预防去除试剂I	2ml/10ml
C0293-2ml/10ml	支原体预防去除试剂II	2ml/10ml
C0296	支原体染色检测试剂盒	>100次
C0297S/M	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(低灵敏度仪器用)	20次/100次
C0298S/M	Myco-Lumi™发光法支原体检测试剂盒(高灵敏度仪器用)	20次/100次
C0299S	Myco-Lumi™发光法支原体检测阳性对照	20次
C0301S	支原体PCR检测试剂盒	250次
C0303S/M	BeyoDirect™支原体qPCR检测试剂盒	100次/500次
ST857-100ml/500ml	BeyoClean™细胞培养箱用水抑菌剂(500X)	100ml/500ml
ST875-100ml/500ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (细胞培养级)	100ml/500ml

Version 2023.11.03