NRF2-Luc 293T 产品说明书

NRF2-Luc 293T报告基因细胞系采用慢病毒转导法构建，携带受ARE调控的荧光素酶报告元件。加入KEAP1/NRF2通路激活剂（如TBHQ、Sulforaphane等）后，内源NRF2入核并结合ARE，驱动荧光素酶表达，可通过荧光素酶信号变化定量反映KEAP1/NRF2通路激活强度。

产品基本信息

细胞名称	NRF2-Luc 293T 报告基因细胞系	**稳定表达基因**	ARE-luciferase
产品货号	YRC-Luc-001	**产品分类**	Luc 报告基因细胞系
细胞形态	上皮样，贴壁细胞	**传代比例**	1:3~1:6
支原体检测	阴性	**储存条件**	液氮
培养体系	90%DMEM+10% FBS 源井细胞培养未加双抗，客户可视实际情况选择添加	**发货形式**	活细胞：常温运输；冻存管：干冰运输
质量控制	所有细胞均经检测，不含细菌、病毒、支原体及其他毒素。	**检测方法**	荧光素酶检测（化学发光法）
半药浓度	Puromycin=0.5μg/mL 注意：为了维持 Luciferase 荧光素酶基因表达量的稳定，细胞状态良好时加药培养		
应用领域	NRF2/ARE 信号通路研究；药物高通量筛选；抗氧化、抗炎与组织保护药理评价		
应用说明	本产品仅供进一步科研使用，不得用于诊断治疗、临床及其他用途。		

注意：如收到为活细胞，原瓶罐装培养基仅含 5%血清，需额外补充血清或更换新的完全培养基进行培养。

电话：400-688-9033
邮箱：info@ubigene.com
地址：广州市黄埔区瑞吉二街45号京广协同2号楼A栋12楼

公众号 红棉系统

产品背景

氧化应激参与细胞内促氧化与抗氧化稳态的调控，与神经退行性疾病、炎症损伤、肿瘤及代谢性疾病密切相关。KEAP1/NRF2 通路是经典的氧化应激响应信号通路，NRF2（Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2）是调控细胞氧化应激防御系统的核心转录因子，可结合抗氧化反应元件（Antioxidant Response Element，ARE），启动下游靶基因的转录。

在正常生理状态下，NRF2 位于细胞质中，抑制蛋白 KEAP1（Kelch-like ECH-associated protein 1）与 NRF2 结合，依赖 E3 泛素连接酶泛素化降解 NRF2，以维持 NRF2 活性的基本稳态水平。发生氧化应激时，KEAP1 的构象发生变化，NRF2 从 KEAP1 释放并入核，与小肌腱膜纤维肉瘤蛋白 sMAF 形成异源二聚体，结合 ARE，从而激活 ARE 介导的基因表达，保护细胞免受氧化损伤。

产品应用

1、NRF2 信号通路研究

结合基因编辑等手段，解析基因、蛋白及翻译后修饰对 NRF2 转录活性的调控。

2、氧化应激与细胞保护机制研究

可用于氧化应激、铁死亡、线粒体功能障碍等方向中 NRF2 通路激活动力学与调控机制的研究。例如构建外源氧化应激损伤模型，检测 NRF2 通路应答变化，评价受试物的抗氧化损伤保护作用。

3、小分子高通量筛选

可筛选 NRF2 通路激动剂、抑制剂，评价小分子、天然产物及中药提取物。

4、药物毒理与安全性评价

NRF2 通路是外源物诱导氧化损伤的核心响应通路。本产品可用于药物的氧化应激潜能评估及安全性评价。

细胞培养方法

- **细胞接收**

  1）冻存细胞：如果是干冰运输的冻存细胞，收到后请立即转入液氮储存或短暂（24h）放至-80℃ 冰箱保存，或直接进行细胞复苏。

  2）活细胞：如果是 T25 瓶活细胞运输，收到后用 75%的酒精对 T25 瓶外表面进行消毒，之后放在 5%CO2、

37℃的细胞培养箱静置 2h，静置后取出细胞瓶在显微镜下观察细胞贴壁情况和细胞汇合度，分别在 100×和 40×下各拍 2 个不同视野的细胞拍照记录。如果汇合度达到 80%以上的传代密度，可以进行传代操作，如果细胞汇合度没有达 80%以上不够传代，弃掉瓶内培养基，更换新鲜完全培养基。（灌满细胞培养基不能正常用来培养细胞。）

注意：收到细胞后，活细胞首先观察细胞瓶是否完好，培养液是否漏液、浑浊等现象。冻存细胞若发现干冰已挥发完、冻存管瓶盖脱落、破损等异常情况，请务必拍照保留，并于收货 24h 内与我们联系（电话：400-6889033；https://www.ubigene.com）

- **细胞复苏**

1）准备工作：将完全培养液置 37℃水浴锅预热 30 分钟，随后将冻存的细胞从液氮中取出，转移到-80℃冰箱，放置数分钟让残余液氮挥发；

2）在超净台内用吸管吸取 6-7mL 完全培养液至 15mL 离心管中；

3）将细胞从-80℃冰箱取出暂时放置于干冰里，复苏时稍稍甩动，去除残留的干冰和液氮，再迅速用镊子夹住盖子放入 37℃水浴中快速晃动（注意：水不能没过盖子），使其在 1 分钟左右完全融化；

4）在超净台内，用酒精棉球擦拭冻存管外壁消毒，稍稍晾干。用单道移液器将所有融化的细胞悬液转至提前准备好的完全培养液中，盖上盖子，1100rpm 室温离心 4 分钟收集细胞；

5）超净台内小心吸弃上清，用单道移液器吸取 1mL 新鲜完全培养液重悬细胞至单细胞悬液，再转移至装有 4mL 完全培养液的 T25 cm2 培养瓶（或者 6cm 的皿） 中，写上细胞名称、复苏日期、代次，放置 37℃、5%CO2 饱和湿度培养箱内培养。

注意：请勿直接复苏到 T75cm2 瓶或 10cm 的皿

- **细胞传代**

1）常规细胞长至 80%-90%汇合度即可传代。在超净台内把培养瓶里的培养液倒至废液缸，用 1×PBS（T25 cm2 培养瓶添加约 2~3mL，T75cm2 培养瓶约 4~5mL）洗涤细胞 1~2 次，以去除残余的培养液和血清（血清含有胰酶的抑制因子）；

2）加入相应体积的胰酶溶液，具体参考附表 1，轻轻晃动瓶子并使胰酶完全浸过细胞，将培养瓶放入培养箱孵育 1~2 分钟（若细胞难以消化，可适当延长孵育时间），待在显微镜下观察到大部分细胞变圆不贴壁，轻轻晃动和敲击培养瓶两侧有大量细胞脱离时，立即终止消化；

3）加入 2 倍胰酶体积的完全培养液终止消化，并轻吹打细胞数次，使所有细胞彻底脱壁；（注意：吹散细胞

时注意要轻柔，尽量不产生气泡或尽可能产生少量气泡。）；

4) 用 10mL 移液管转移细胞悬液到一支 50mL 离心管中，同一批次的细胞可以合并收集在一起，视情况用适量 PBS 将培养瓶里的残余细胞洗下来，一起加到 50mL 离心管中。盖上盖子，做好标记；

5) 1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子弃上清，加 2mL 完全培养基重悬细胞；

6) 细胞按照一定的接种比例传代，首次按照 1：3 进行传代，若细胞在两天内长满可增加传代比例，若细胞生长三四天还未长满，可适当缩小传代比例。

表 1 不同规格培养物加入胰酶体积列表

培养物规格	胰酶体积
6 孔板	0.5 mL
T25	1 mL
T75	2-3 mL
T175	3-4 mL

注意：为了维持 Luciferase 荧光素酶基因表达量的稳定，细胞状态良好时加入半药浓度的筛选抗生素（Puromycin=0.5μg/mL）进行培养

- **细胞冻存**

1) 按细胞传代的方法，在超净台内把培养瓶里的细胞进行消化至单细胞悬液，加入培养基终止反应。所有液体转移到一支 50mL 离心管中；

2) 用移液管吹打混合均匀，取 20μL 进行细胞计数；

3) 1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子倒去上清，用 1~2mL 4℃预冷的冻存液重悬细胞，随后加入冻存液调整至密度为 1×106-1×107 个细胞/mL。

4) 将细胞悬液按 1mL/管平均分装至冻存管中，旋紧盖子，冻存管应提前贴好细胞名称、细胞代次、数量、冻存日期；

5) 将冻存管放置于 4℃预冷的程序降温盒中，并在冻存结束的 15 分钟之内将程序降温盒放置超低温冰箱内；

6) 过夜后，将冻存细胞转移至液氮罐内保存。

质量控制

功能验证

以 TBHQ 作为阳性激活剂，检测细胞的响应效果，评估该细胞系的灵敏度与功能性

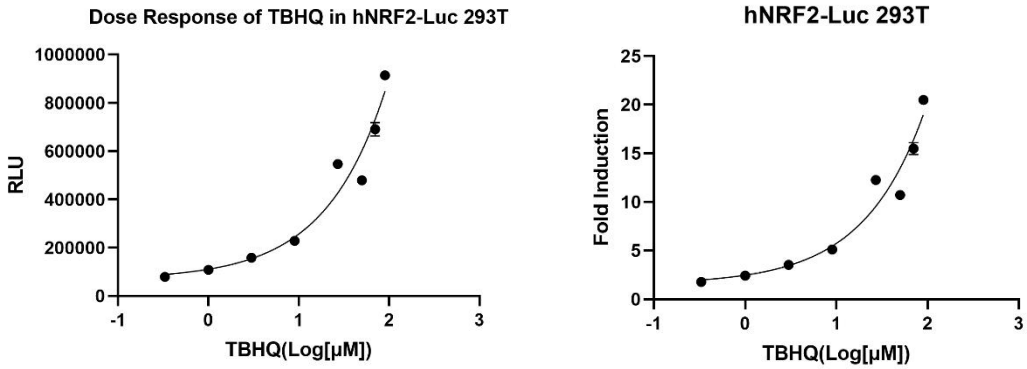

图 1 hNRF2-Luc 293T 报告基因细胞系对 TBHQ 的响应结果

左图：剂量-反应曲线：检测不同浓度 TBHQ 处理 16h 后细胞的荧光素酶活性（RLU）；右图：诱导倍数-效应曲线：展示不同浓度 TBHQ 处理 16h 后荧光素酶信号相对于对照组（无药物处理）的诱导倍数

注意事项

1、使用通路阳性激活剂处理细胞，若荧光素酶报告基因诱导倍数≥5 倍，提示细胞系 NRF2- ARE 通路响应灵敏，可满足化合物筛选与通路活性评价实验需求。

2、产品放行检测中，荧光素酶诱导倍数受细胞代次、汇合度、血清批次、阳性激活剂批次、检测试剂及仪器状态等因素影响，不同批次、不同时间的实测结果存在一定波动，属正常现象。

3、TBHQ 存在浓度依赖性细胞毒性，请勿直接使用过高浓度。建议进行预实验优化细胞接种密度、TBHQ 浓度以及刺激时间（刺激时间 16-20h 为建议值），避免毒性带来的实验偏差。

4、使用 DMSO 溶解化合物时，为避免溶剂本身带来细胞毒性，终浓度建议不超过 0.1% 。

5、本说明书仅供参考，使用者需结合自身实验体系对具体实验条件进行优化调整。