

Клетки NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 | 500672**Обща информация****Description**

Клетъчната линия NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 е клонова стабилна клетъчна линия, получена от нормални плъши бъбречни клетки (NRK) чрез трансфекция на кръгов плазмид. Този плазмид съдържа генетични конструкции, кодиращи четири тандемни повторения на ламбда N22 РНК-свързващи места и три тандемни повторения на mEGFP (мономерен подобрен зелен флуоресцентен протеин), слети със сигнала за ядрена локализация M9. След трансфекцията клетките се подлагат на селекция за лекарствена устойчивост, за да се гарантира стабилността на генетичните модификации.

Приблизително 50 % от клетките в тази клонова стабилна линия експресират флуоресцентния маркер 4xλN22-3xmEGFP-M9, което показва успешно включване на плаزمид. Експресията на този маркер позволява визуализация на вътреклетъчните процеси в реално време, улеснена от силния флуоресцентен сигнал на mEGFP. Сигналят за ядрена локализация на M9 гарантира, че експресираните фюжън протеини се транспортират до ядрото, което прави тази клетъчна линия особено полезна за изучаване на ядрено-цитоплазмения транспорт, динамиката на РНК и регулирането на генната експресия.

Тази клетъчна линия NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 е ценна за изследователи, които се фокусират върху взаимодействията между РНК-свързващи протеини, метаболизма на РНК и механизмите, които са в основата на ядрения внос и износ. Наличието на маркера mEGFP позволява използването на усъвършенствани техники за визуализация, като конфокална микроскопия и визуализация на живи клетки, което осигурява подробен поглед върху пространствената и времевата динамика на клетъчните компоненти. Въпреки варирането, клетъчната линия остава мощен инструмент за разчленяване на сложни молекулярни пътища и разбиране на клетъчните функции на по-дълбоко ниво.

Organism Плъх**Tissue** Бъбреци**Synonyms** NRK 4xλN22-3xmEGFP-M9**Характеристики****Breed/Subspecies** OsborneMendel**Morphology** Фибробластоподобни клетки с фузиформена форма**Growth properties** Монослой, прилепнал**Регулаторни данни****Citation** NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 (каталожен номер 500672 на Cytion)

Клетки NRK-4λN22-3xmEGFP-M9 | 500672

Biosafety level	1
NCBI_TaxID	10116
CellosaurusAccession	CVCL_AV97
Depositor	Лабораторията на Елънбърг (EMBL)

Биомолекулярни данни

Receptors expressed	Епидермален растежен фактор (EGF), стимулираща мултипликацията активност (MSA)
Protein expression	4λN22-3xmEGFP-M9: Местоположение/ген: 937..1009, 1066..1138, 1194..1261, 1323..1390 / lambda пептид, 1462..2176, 2179..2890, 2896..3612 / mEGFP, 3612..3815 / M9-His, 5090..5884 / KanR/NeoR, 7195..584 / Pcmv
Products	M9-His таг между BsrG1/HindIII, неомицин, фосфотрансфераза, CMV промотор

Работа с

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L глюкоза, w: 4 mM L-глутамин, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM натриев пируват (номер на изделието на Cytion 820300a)
Supplements	Допълнете средата с 10% FBS, 0,5 mg/ml G418

Dissociation Reagent	Accutase
-----------------------------	----------

Subculturing Изхвърлете старата среда и промийте клетките с PBS. Добавете прясно приготвен 0,025% разтвор на трипсин/0,02% EDTA, загрят до 37 градуса по Целзий, и изчакайте, докато клетките се отделят, което обикновено отнема около 5 минути. Неутрализирайте трипсина, като добавите прясна среда, след което прехвърлете клетъчната смес в епруветка и центрофугирайте. След центрофугирането отстранете супернатантата, ресуспендирайте клетъчната пелета в прясна хранителна среда и прехвърлете суспензията в нови колби. Включете G418 в хранителната среда, за да достигнете крайна концентрация от 0,5 mg/ml

Split ratio	Препоръчва се съотношение от 1:3 до 1:4
--------------------	---

Seeding density	2 до 4 x 10 ⁴ клетки/cm ²
------------------------	---

Fluid renewal	2 до 3 пъти седмично
----------------------	----------------------

Клетки NRK-4λλN22-3xλEGFP-M9 | 500672**Freeze medium**

Като среда за криоконсервация използваме пълна среда за растеж (включително FBS) + 10% DMSO за адекватна жизнеспособност след размразяване или CM-1 (каталожен номер 800100 на Cytion), която включва оптимизирани осмопротектори и метаболитни стабилизатори за подобряване на възстановяването и намаляване на криоиндуцирания стрес.

Thawing and Culturing Cells

1. Уверете се, че флаконът остава дълбоко замразен при доставката, тъй като клетките се транспортират със сух лед, за да се поддържат оптимални температури по време на транспортирането.
2. При получаване или съхранявайте незабавно криовиолата при температури под $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, за да осигурите запазване на клетъчната цялост, или преминете към стъпка 3, ако е необходимо незабавно култивиране.
3. За незабавно култивиране бързо размразете флакона, като го потопите във водна баня с чиста вода и антимикуробен агент с температура $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, като разбърквате внимателно в продължение на 40-60 секунди, докато остане малка ледена бучка.
4. Извършвайте всички следващи стъпки при стерилни условия в аспиратор, като преди отваряне дезинфекцирате криовиолата със 70% етанол.
5. Внимателно отворете дезинфекцирания флакон и прехвърлете клетъчната суспензия в 15 ml центрофужна епруветка, съдържаща 8 ml хранителна среда със стайна температура, като разбърквате внимателно.
6. Центрофугирайте сместа при $300 \times g$ в продължение на 3 минути, за да отделите клетките, и внимателно изхвърлете супернатантата, съдържаща остатъчна замразяваща среда.
7. Внимателно ресуспендирайте клетъчната пелета в 10 ml прясна хранителна среда. За адхезивни клетки разделете суспензията между две колби T25; за суспензионни култури прехвърлете цялата среда в една колба T25, за да стимулирате ефективното взаимодействие и растеж на клетките.
8. Придържайте се към установените протоколи за субкултивиране за непрекъснат растеж и поддържане на клетъчната линия, като гарантирате надеждни експериментални резултати.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , овлажнена атмосфера.

Flask Coating

Няма

