

Buňky HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657**Obecné informace****Description**

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP je geneticky modifikovaná buněčná linie HeLa Kyoto. Využívá technologii CRISPR/Cas9 k integraci mEGFP (monomerního zesíleného zeleného fluorescenčního proteinu) do lokusu Nup188. Nup188 je klíčový nukleoporinový protein zapojený do komplexu jaderných pórů, který je nezbytný pro transport molekul mezi jádrem a cytoplazmou. Značení mEGFP umožňuje vizualizaci Nup188 v reálném čase, což pomáhá při studiu dynamiky a funkce komplexu jaderných pórů.

Tato buněčná linie je obzvláště užitečná pro výzkumníky zaměřené na jaderný transport a biologii komplexu jaderných pórů. Její fluorescenční značení umožňuje pozorovat Nup188 za různých podmínek, včetně léčby léky a genetických modifikací. Aplikace zahrnují vysokoobsahový screening, zobrazování živých buněk a další techniky založené na fluorescenci, které poskytují cenné poznatky o nukleocytoplazmatickém transportu a integritě jaderného obalu.

Organism

Člověk

Tissue

Endocervix

Disease

Adenokarcinom

Metastatic site

Neplatí (derivát HeLa Kyoto; primární ložisko nádoru se nachází v endocervixu)

Applications

Biologie komplexu jaderných pórů (NPC); transport mezi jádrem a cytoplazmou; dynamika a funkce proteinu Nup188; fluorescenční zobrazování jaderné membrány v živých buňkách; screening s vysokým obsahem dat; validační studie knock-in pomocí CRISPR; hodnocení inhibitorů jaderného transportu

Charakteristika**Age**

30 let

Gender

Ženy

Ethnicity

Afroameričan

Morphology

Buňky podobné epitelu s mozaikovitým tvarem kamínků

Cell type

Epitelové buňky

Growth properties

Adherentní

Regulační údaje

Buňky HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

Citation	HK-CRISPR-Nup188-mEGFP (katalogové číslo Cytion 300657)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Není přiřazeno (HK-CRISPR-Nup188-mEGFP je derivát buněk HeLa Kyoto modifikovaný pomocí CRISPR; původní kmen HeLa Kyoto CVCL_1922)
Depositor	Ellenbergova laboratoř (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Tato linie HeLa Kyoto obsahuje CRISPR knock-in mEGFP v lokusu Nup188, což umožňuje vizualizaci dynamiky jaderného pórového lešení. Tato klasifikace platí pouze v Německu a jinde se může lišit.

Biomolekulární data

Protein expression	Nup188, mEGFP-tag
---------------------------	-------------------

Zpracování

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutaminu, w: 3,7 g/l NaHCO ₃ , w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)
Supplements	Doplňte médium o 10% FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstředte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpustte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.
Freeze medium	Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryo.

Buňky HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

Thawing and Culturing Cells

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkumavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředujte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělte suspenzi mezi dvě kultivační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkultivační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žádný

Freezing Procedure

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

Shipping Conditions

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

Buňky HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

Storage Conditions

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Kontrola kvality a molekulární analýza

Sterility

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuálnímu kontrolám.