

Buňky HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575**Obecné informace****Description**

Buněčná linie HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 je geneticky upravený derivát buněk HeLa Kyoto, které jsou známé svou robustností a širokým využitím ve vědeckém výzkumu. Tato buněčná linie byla upravena pomocí technologie CRISPR-Cas9 tak, aby exprimovala mEGFP (monomerní zesílený zelený fluorescenční protein) značený Nup358, který je klíčovou součástí komplexu jaderných pórů (NPC). Nup358, známý také jako RanBP2, hraje významnou roli v nukleocytoplazmatickém transportu, sestavování mitotického vřetenka a dalších buněčných procesech. Značka mEGFP umožňuje vizualizaci Nup358, což usnadňuje pozorování jeho dynamiky a interakcí v buňce v reálném čase.

Buňky HeLa Kyoto, podlinie původních buněk HeLa, se vyznačují přizpůsobivostí a stabilním růstem v kultuře. Systém CRISPR-Cas9 v této buněčné linii umožňuje přesnou úpravu genomu a zajišťuje přesné spojení značky mEGFP s proteinem Nup358, aniž by byla narušena jeho funkce. Díky tomu je buněčná linie HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 cenným nástrojem pro studium strukturních a funkčních aspektů komplexu jaderných pórů. Výzkumníci mohou tuto buněčnou linii využít k získání poznatků o mechanismech, jimiž se řídí nukleocytoplazmatický transport, a o úloze Nup358 v buněčné homeostáze a chorobných stavech, jako je rakovina a virové infekce.

Organism

Člověk

Tissue

Endocervix

Disease

Adenokarcinom

Charakteristika**Age**

30 let

Gender

Ženy

Ethnicity

Afroameričan

Morphology

Buňky podobné epitelu s mozaikovitým tvarem kamínků

Growth properties

Adherentní

Regulační údaje**Citation**

HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 (katalogové číslo Cytion 301575)

Biosafety level

1

Buňky HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575

NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B7FS
Depositor	Ellenbergova laboratoř (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Tato linie HeLa Kyoto obsahuje CRISPR-integrovanou značku mEGFP v lokusu RanBP2/Nup358, která umožňuje vizualizaci cytoplazmatických filamentů jaderného póru. Tato klasifikace platí pouze v Německu a jinde se může lišit.

Biomolekulární data

Products	EGFP (zesílený zelený fluorescenční protein)
-----------------	--

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 rozpusťte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.
Split ratio	Doporučuje se poměr 1:3
Fluid renewal	2 až 3krát týdně
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-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575**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-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575

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 / Genetický profil / HLA

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 vizuálním kontrolám.