Product sheet

Κύτταρα NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 | 500672

Γενικές πληροφορίες

Description	Η κυτταρική σειρά NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 είναι μια κλωνική σταθερή κυτταρική σειρά που προέρχεται από κύτταρα φυσιολογικών νεφρών αρουραίου (NRK) μέσω της διαμόλυνσης ενός κυκλικού πλασμιδίου. Αυτό το πλασμίδιο περιέχει γενετικές κατασκευές που κωδικοποιούν τέσσερις επαναλήψεις tandem των θέσεων πρόσδεσης RNA του lambda N22 και τρεις επαναλήψεις tandem των ετικετών mEGFP (μονομερής ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη), συγχωνευμένες με το σήμα πυρηνικού εντοπισμού M9. Μετά τη μεταμόσχευση, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επιλογή ανθεκτικότητας σε φάρμακα για να εξασφαλιστεί η σταθερότητα των γενετικών τροποποιήσεων. Περίπου το 50% των κυττάρων αυτής της σταθερής κλωνικής σειράς εκφράζουν τον φθορίζοντα δείκτη 4xλN22-3xmEGFP-M9, υποδεικνύοντας την επιτυχή ενσωμάτωση του πλασμιδίου. Η έκφραση αυτού του δείκτη επιτρέπει την οπτικοποίηση σε πραγματικό χρόνο των ενδοκυτταρικών διεργασιών, η οποία διευκολύνεται από το ισχυρό φθορίζον σήμα του mEGFP. Το σήμα πυρηνικού εντοπισμού M9 εξασφαλίζει ότι οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες σύντηξης μεταφέρονται στον πυρήνα, καθιστώντας αυτή την κυτταρική σειρά ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη της πυρηνικής-κυτταροπλασματικής μεταφοράς, της δυναμικής του RNA και της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Αυτή η κυτταρική σειρά NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 είναι πολύτιμη για ερευνητές που εστιάζουν στις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών που δεσμεύουν RNA, στον μεταβολισμό του RNA και στους μηχανισμούς που διέπουν την πυρηνική εισαγωγή και εξαγωγή. Η παρουσία του δείκτη mEGFP επιτρέπει προηγμένες τεχνικές απεικόνισης, όπως η συνεστιακή μικροσκοπία και η απεικόνιση ζωντανών κυττάρων, παρέχοντας λεπτομερή εικόνα της χωρικής και χρονικής δυναμικής των κυτταρικών συστατικών. Παρά την ποικιλομορφία, η κυτταρική σειρά παραμένει ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση πολύπλοκων μοριακών μονοπατιών και την κατανόηση των κυτταρικών λειτουργιών σε βαθύτερο επίπεδο.
Organism	Αρουραίος
Tissue	Νεφρός
Synonyms	NRK 4xlN22-3xmEGFP-M9

Χαρακτηριστικά

Breed/Subspecies	OsborneMendel
Morphology	Κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες και έχουν φουσκοειδές σχήμα
Growth properties	Μονοστρωματική, προσκολλημένη

Ρυθμιστικά δεδομένα

Citation	NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 (αριθμός καταλόγου Cytion 500672)

Κύτταρα NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 | 500672

Biosafety level	1
NCBI_TaxID	10116
CellosaurusAccession	CVCL_AV97
Depositor	Εργαστήριο Ellenberg (EMBL)

Βιομοριακά δεδομένα

Receptors expressed	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), δραστηριότητα διέγερσης του πολλαπλασιασμού (MSA)
Protein expression	4xλN22-3xmEGFP-M9: Θέση/Γονίδιο: 937..1009, 1066..1138, 1194..1261, 1323..1390 / πεπτίδιο λάμδα, 1462..2176, 2179..2890, 2896..3612 / mEGFP, 3612..3815 / M9-His, 5090..5884 / KanR/NeoR, 7195..584 / Pcmv
Products	M9-His tag μεταξύ BsrG1/HindIII, νεομυκίνη, φωσφοτρανσφεράση, CMV Promotor

Χειρισμός

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L γλυκόζη, w: 4 mM L-γλουταμίνη, w: 3,7 g/L NaHCO3, w: 1,0 mM πυρουβικό νάτριο (αριθμός άρθρου Cytion 820300a)
Supplements	Συμπληρώστε το μέσο με 10% FBS, 0,5 mg/mL G418
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Απορρίψτε το παλιό μέσο και πλύνετε τα κύτταρα με PBS. Προσθέστε ένα φρεσκοπαρασκευασμένο διάλυμα θρυψίνης 0,025%/0,02% EDTA θερμαινόμενο στους 37 βαθμούς Κελσίου και περιμένετε μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα, το οποίο συνήθως διαρκεί περίπου 5 λεπτά. Εξουδετερώστε τη θρυψίνη προσθέτοντας φρέσκο μέσο, στη συνέχεια μεταφέρετε το μείγμα κυττάρων σε ένα σωληνάριο και φυγοκεντρίστε. Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρέστε το υπερκείμενο υγρό, ανασυσταθείτε το κυτταρικό σφαιρίδιο σε φρέσκο μέσο καλλιέργειας και μεταφέρετε το εναιώρημα σε νέες φιάλες. Ενσωματώστε το G418 στο μέσο καλλιέργειας ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml
Seeding density	2 έως 4 x 10^4 κύτταρα/cm^2
Fluid renewal	2 έως 3 φορές την εβδομάδα

Κύτταρα NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 | 500672

Freeze medium	Ως μέσο κρυοσυντήρησης, χρησιμοποιούμε πλήρες μέσο ανάπτυξης (συμπεριλαμβανομένου του FBS) + 10% DMSO για επαρκή βιωσιμότητα μετά την απόψυξη, ή CM-1 (αριθμός καταλόγου Cytion 800100), το οποίο περιλαμβάνει βελτιστοποιημένα ωσμοπροστατευτικά και μεταβολικούς σταθεροποιητές για την ενίσχυση της ανάκαμψης και τη μείωση του στρες που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση.

Thawing and Culturing Cells

1. Επιβεβαιώστε ότι το φιαλίδιο παραμένει βαθιά παγωμένο κατά την παράδοση, καθώς τα κύτταρα αποστέλλονται σε ξηρό πάγο για να διατηρούνται οι βέλτιστες θερμοκρασίες κατά τη μεταφορά.

2. Κατά την παραλαβή, είτε αποθηκεύστε το κρυοφιαλίδιο αμέσως σε θερμοκρασίες κάτω των -150°C για να διασφαλίσετε τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας, είτε προχωρήστε στο βήμα 3 εάν απαιτείται άμεση καλλιέργεια.

3. Για άμεση καλλιέργεια, αποψύξτε γρήγορα το φιαλίδιο βυθίζοντάς το σε υδατόλουτρο 37°C με καθαρό νερό και αντιμικροβιακό παράγοντα, αναδεύοντας απαλά για 40-60 δευτερόλεπτα μέχρι να παραμείνει ένα μικρό σβόλο πάγου.

4. Εκτελέστε όλα τα επόμενα βήματα υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε απορροφητήρα ροής, απολυμαίνοντας το κρυοφιαλίδιο με 70% αιθανόλη πριν από το άνοιγμα.

5. Ανοίξτε προσεκτικά το απολυμασμένο φιαλίδιο και μεταφέρετε το εναιώρημα των κυττάρων σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης των 15 ml που περιέχει 8 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε θερμοκρασία δωματίου, αναμειγνύοντας απαλά.

6. Φυγοκεντρίστε το μείγμα στα 300 x g για 3 λεπτά για να διαχωριστούν τα κύτταρα και απορρίψτε προσεκτικά το υπερκείμενο που περιέχει το υπόλοιπο μέσο κατάψυξης.

7. Επανασυσσωματώστε απαλά το κυτταρικό σφαιρίδιο σε 10 ml φρέσκου μέσου καλλιέργειας. Για προσκολλημένα κύτταρα, μοιράστε το εναιώρημα σε δύο φιάλες καλλιέργειας T25- για καλλιέργειες εναιωρήματος, μεταφέρετε όλο το μέσο σε μία φιάλη T25 για να προωθήσετε την αποτελεσματική αλληλεπίδραση και ανάπτυξη των κυττάρων.

8. Τηρείτε τα καθιερωμένα πρωτόκολλα υποκαλλιέργειας για τη συνεχή ανάπτυξη και διατήρηση της κυτταρικής σειράς, εξασφαλίζοντας αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα.

Incubation Atmosphere	37°C, 5%$_{CO2}$, υγροποιημένη ατμόσφαιρα.

Flask Coating

Για βέλτιστη προσκόλληση και βιωσιμότητα μετά την απόψυξη, συνιστούμε τη χρήση **φιαλών ή πλακών με επικάλυψη κολλαγόνου**.

Κύτταρα NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 | 500672

Freezing Procedure	Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78 °C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.
Shipping Conditions	Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78 °C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.
Storage Conditions	Για μακροχρόνια συντήρηση, τοποθετήστε τα φιαλίδια σε υγρό άζωτο σε φάση ατμών σε θερμοκρασία περίπου -150 έως -196 °C. Η αποθήκευση στους -80 °C είναι αποδεκτή μόνο ως σύντομο ενδιάμεσο βήμα πριν από τη μεταφορά σε υγρό άζωτο.

Ποιοτικός έλεγχος / Γενετικό προφίλ / HLA

Sterility	Η μόλυνση από μυκόπλασμα αποκλείεται με τη χρήση τόσο των δοκιμασιών που βασίζονται στην PCR όσο και των μεθόδων ανίχνευσης μυκοπλάσματος με βάση τη φωταύγεια. Για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει μόλυνση από βακτήρια, μύκητες ή ζύμες, οι κυτταροκαλλιέργειες υποβάλλονται σε καθημερινές οπτικές επιθεωρήσεις.