Product sheet

Κύτταρα HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

Γενικές πληροφορίες

Description	Η HK-CRISPR-Nup188-mEGFP είναι μια γενετικά τροποποιημένη κυτταρική σειρά Hela Kyoto. Χρησιμοποιεί την τεχνολογία CRISPR/Cas9 για την ενσωμάτωση της mEGFP (μονομερής ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) στον τόπο Nup188. Η Nup188 είναι μια βασική πρωτεΐνη νουκλεοπορίνης που συμμετέχει στο σύμπλοκο του πυρηνικού πόρου, απαραίτητη για τη μεταφορά μορίων μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Η σήμανση mEGFP επιτρέπει την οπτικοποίηση της Nup188 σε πραγματικό χρόνο, βοηθώντας στη μελέτη της δυναμικής και της λειτουργίας του συμπλόκου του πυρηνικού πόρου. Αυτή η κυτταρική σειρά είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για ερευνητές που εστιάζουν στη βιολογία της πυρηνικής μεταφοράς και του συμπλόκου των πυρηνικών πόρων. Η φθορίζουσα επισήμανσή της επιτρέπει την παρατήρηση του Nup188 υπό διάφορες συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των φαρμακευτικών θεραπειών και των γενετικών τροποποιήσεων. Οι εφαρμογές περιλαμβάνουν διαλογή υψηλού περιεχομένου, απεικόνιση ζωντανών κυττάρων και άλλες τεχνικές που βασίζονται στον φθορισμό, παρέχοντας πολύτιμες γνώσεις σχετικά με την πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά και την ακεραιότητα του πυρηνικού φακέλου.
Organism	Ανθρώπινο
Tissue	Ενδοτράχηλος
Disease	Αδενοκαρκίνωμα
Metastatic site	Δεν ισχύει (παράγωγο HeLa Kyoto· η θέση του πρωτογενούς όγκου είναι ο ενδοτράχηλος)
Applications	Βιολογία του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων (NPC)· πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά· δυναμική και λειτουργία του Nup188· απεικόνιση του πυρηνικού περιβλήματος με φθορισμό σε ζωντανά κύτταρα· διαλογή υψηλής ανάλυσης· μελέτες επικύρωσης της μεθόδου CRISPR knock-in· αξιολόγηση αναστολέων της πυρηνικής μεταφοράς

Χαρακτηριστικά

Age	30 χρόνια
Gender	Γυναίκα
Ethnicity	Αφροαμερικανός
Morphology	Επιθηλιακά κύτταρα με ψηφιδωτό σχήμα πέτρας
Cell type	Επιθηλιακά κύτταρα
Growth properties	Προσκολλημένο

Κύτταρα HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

Ρυθμιστικά δεδομένα

Citation	HK-CRISPR-Nup188-mEGFP (αριθμός καταλόγου Cytion 300657)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Δεν έχει αποδοθεί (το HK-CRISPR-Nup188-mEGFP είναι ένα παράγωγο του HeLa Kyoto που έχει τροποποιηθεί με CRISPR· γονικό στέλεχος: HeLa Kyoto CVCL_1922)
Depositor	Εργαστήριο Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Αυτή η γραμμή HeLa Kyoto περιέχει ένα CRISPR knock-in του mEGFP στον τόπο Nup188, επιτρέποντας την οπτικοποίηση της δυναμικής του ικριώματος του πυρηνικού πόρου. Η ταξινόμηση αυτή ισχύει μόνο εντός της Γερμανίας και ενδέχεται να διαφέρει αλλού.

Βιομοριακά δεδομένα

Protein expression	Nup188, ετικέτα mEGFP

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
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Αφαιρέστε το παλιό μέσο από τα προσκολλημένα κύτταρα και πλύντε τα με PBS που δεν περιέχει ασβέστιο και μαγνήσιο. Για φιάλες T25, χρησιμοποιήστε 3-5 ml PBS και για φιάλες T75, χρησιμοποιήστε 5-10 ml. Στη συνέχεια, καλύψτε πλήρως τα κύτταρα με Accutase, χρησιμοποιώντας 1-2 ml για φιάλες T25 και 2,5 ml για φιάλες T75. Αφήστε τα κύτταρα να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 8-10 λεπτά για να αποκολληθούν. Μετά την επώαση, αναμείξτε απαλά τα κύτταρα με 10 ml μέσου για να ανασυσταθούν και, στη συνέχεια, φυγοκεντρίστε στα 300xg για 3 λεπτά. Απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό, ανασυστάστε τα κύτταρα σε φρέσκο μέσο και μεταφέρετέ τα σε νέες φιάλες που περιέχουν ήδη φρέσκο μέσο.

Κύτταρα HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

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	Κανένα

Κύτταρα HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

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.

Έλεγχος ποιότητας και μοριακή ανάλυση

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.