

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

Üldine teave

Description

HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 rakuliin on geneetiliselt muundatud tuletis HeLa Kyoto rakkudest, mis on tuntud oma vastupidavuse ja laialdase kasutuse poolest teadusuuringutes. Seda rakuliini on muudetud CRISPR-Cas9-tehnoloogia abil, et ekspresseerida mEGFP (monomeeriline töhustatud roheline fluorestseeruv valk) märgistatud Nup358, mis on tuumapoorikompleksi (NPC) oluline komponent. Nup358, tuntud ka kui RanBP2, mängib olulist rolli nukleotsütoplasma transpordis, mitoetilise spindli kokkupanekus ja muudes rakulistes protsessides. MEGFP-märgis võimaldab Nup358 visualiseerida, hõlbustades selle rakusiseses dünaamika ja interaktsioonide jälgimist reaajas.

HeLa Kyoto rakke, mis on esialgse HeLa rakkude alamliin, iseloomustab nende kohanemisvõime ja stabiilne kasv kultuuris. CRISPR-Cas9-süsteem võimaldab selles rakuliinis täpset genoomi redigeerimist, tagades, et mEGFP-märgis on täpselt fusioonitud Nup358 valgule külge, ilma et see häiriks selle funktsiooni. See muudab rakuliini HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 väärtuslikuks vahendiks tuumapoorikompleksi struktuuriliste ja funktsionaalsete aspektide uurimiseks. Teadlased saavad seda rakuliini kasutada, et saada teadmisi tuumasütoplasma transporti reguleerivatest mehhanismidest ja Nup358 rollist raku homöostaasis ja haigusseisundites, nagu vähk ja viirusinfektsioonid.

Organism Inimene

Tissue Endocervix

Disease Adenokartsinoom

Omadused

Age 30 aastat

Gender Naised

Ethnicity Afroameeriklane

Morphology Epiteelilaadsed rakud, millel on mosaiikne kivikuju

Growth properties Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

Citation HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 (Cytioni katalooginumber 301575)

Biosafety level 1

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

NCBI_TaxID 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B7FS**Depositor** Ellenbergi labor (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: See HeLa Kyoto liin sisaldab CRISPR-integreeritud mEGFP-märgistust RanBP2/Nup358 lokaalis, mis võimaldab visualiseerida tuumapori tsütoplasmafilamente. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.**Biomolekulaarsed andmed****Products** EGFP (tõhustatud roheline fluorestseeruv valk)**Töötlemine****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L glükoosi, w: 4 mM L-glutamiini, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM naatriumpüruvaati (Cytioni artikli number 820300a)**Supplements** Täiendada söötme 10% FBS-ga**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Eemaldage kleepunud rakkudelt vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspenseerida, seejärel tsentrifugeerige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.**Fluid renewal** 2 kuni 3 korda nädalas**Freeze medium** Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 rakud | 301575**Thawing and
Culturing Cells**

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viali kiiresti, kastes selle $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud viali ettevaatlikult ja viige raku suspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu $300 \times g$ juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

**Incubation
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , niisutatud atmosfäär.

Flask Coating

Puudub

**Freezing
Procedure**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

**Shipping
Conditions**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

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

Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA

Sterility

Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminesentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.