

NRK-EGFP3-Seh1-solut | 500731

Yleisiä tietoja

Description

NRK-EGFP3-Seh1-solulinja on normaaleista rotan munuaissoluista (NRK) peräisin oleva vakaa klooninen linja. Tämä solulinja luotiin transfektoimalla EGFP3-Seh1-fuusioproteiinia koodaava ympyrämuotoinen plasmidi. Transfektion jälkeen solut valittiin lääkeresistenssin varalta, jotta varmistettiin haluttua konstruktia ilmentävän vakaan populaation muodostuminen.

Noin 50 prosenttia tämän populaation soluista ilmentää EGFP3-Seh1:tä, joka on fuusioproteiini, jossa yhdistyvät tehostettu vihreä fluoresoiva proteiini (EGFP) ja Seh1, joka on ydinhuokoskompleksin proteiinikompleksi. EGFP:n läsnäolo helpottaa fuusioproteiinin visualisointia ja seurantaa soluissa, minkä ansiosta tutkijat voivat tutkia Seh1:n dynamiikkaa ja toimintaa eri soluprosesseissa. EGFP3-Seh1:n ilmentymisessä tässä solulinjassa on kuitenkin jonkin verran vaihtelua, mikä viittaa ilmentymistasojen vaihteluun populaation yksittäisten solujen välillä.

Tämä solulinja on erityisen hyödyllinen tutkimuksissa, jotka koskevat ydinhuokoskompleksin kokoamista, nukleosytoplasmista kuljetusta ja Seh1:n roolia näissä prosesseissa. EGFP:n tuottama fluoresenssi mahdollistaa elävien solujen kuvantamisen ja proteiinien lokalisoinnin ja vuorovaikutusten reaaliaikaisen analysoinnin, mikä tekee NRK-EGFP3-Seh1:stä arvokkaan välineen solubiologian ja molekyyli­tutkimuksen käyttöön.

Organism

Rotta

Tissue

Munuaiset

Synonyms

NRK EGFP3-Seh1

Ominaisuudet

Breed/Subspecies

OsborneMendel

Morphology

Fibroblastin kaltaiset solut, joilla on fusiforminen muoto

Growth properties

Yksikerroksinen, tarttuva

Säätelytiedot

Citation

NRK-EGFP3-Seh1 (Cytionin luettelonumero 500731)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

10116

NRK-EGFP3-Seh1-solut | 500731

CellosaurusAccession CVCL_AV94

Depositor Ellenbergin laboratorio (EMBL)

Biomolekyylitiedot

Receptors expressed Epiderminen kasvutekijä (EGF), lisääntymistä stimuloiva aktiivisuus (MSA)

Protein expression EGFP3-Seh1

Products Seh1 (SEH1:n kaltainen nukleoporiini)

Käsittely

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glukoosia, w: 4 mM L-glutamiinia, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM natriumpyruvaattia (Cytionin artikkelinumero 820300a)

Supplements Täydennetään elatusainetta 10 % FBS:llä, 0,5 mg/ml G418:lla

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreeseen väliaineeseen ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliainetta.

Split ratio Suositeltava suhde on 1:3–1:4

Seeding density $2-4 \times 10^4$ solua/cm²

Fluid renewal 2-3 kertaa viikossa

Freeze medium Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotektantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

NRK-EGFP3-Seh1-solut | 500731

**Thawing and
Culturing Cells**

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanottaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja mikrobilääkettä, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisella etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvia, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , kostutettu ilmakehä.

Flask Coating

Ei mitään

**Freezing
Procedure**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

**Shipping
Conditions**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

NRK-EGFP3-Seh1-solut | 500731

Storage Conditions

Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

Laadunvalvonta ja molekyylianalyysi

Sterility

Mykoplasmakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrittelyillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.