

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP-solut | 300657

Yleisiä tietoja

Description

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP on geneettisesti muunnettu HeLa Kyoto -solulinja. Siinä käytetään CRISPR/Cas9-tekniikkaa mEGFP:n (monomeerinen parannettu vihreä fluoresoiva proteiini) integroimiseksi Nup188-paikannukseen. Nup188 on keskeinen nukleoporiiniproteiini, joka osallistuu ydinhuokoskompleksiin, joka on välttämätön molekyylien kuljettamisessa tuman ja sytoplasman välillä. MEGFP-merkintä mahdollistaa Nup188:n reaaliaikaisen visualisoinnin, mikä auttaa ydinhuokoskompleksin dynamiikan ja toiminnan tutkimisessa.

Tämä solulinja on erityisen hyödyllinen tutkijoille, jotka keskittyvät ydinkuljetukseen ja ydinhuokoskompleksin biologiaan. Sen fluoresoiva merkintä mahdollistaa Nup188:n havainnoinnin erilaisissa olosuhteissa, mukaan lukien lääkehoidot ja geneettiset muutokset. Sovelluksia ovat muun muassa korkean sisällön seulonta, elävien solujen kuvantaminen ja muut fluoresenssiin perustuvat tekniikat, jotka tarjoavat arvokasta tietoa nukleosytolasman kuljetuksesta ja ydinkuoren eheydestä.

Organism

Ihminen

Tissue

Endocervix

Disease

Adenokarsinooma

Metastatic site

Ei sovelleta (HeLa Kyoto -johdannainen; primaarikasvaimen sijainti on kohdunkaulan sisäosa)

Applications

Ydinporokompleksin (NPC) biologia; ydin-syttoplasmakuljetus; Nup188:n dynamiikka ja toiminta; ydinvaipan fluoresenssikuvantaminen elävissä soluissa; high-content-seulonta; CRISPR-knock-in-validointitutkimukset; ydinkuljetuksen estäjien arviointi

Ominaisuudet

Age

30 vuotta

Gender

Nainen

Ethnicity

Afroamerikkalainen

Morphology

Epiteelin kaltaiset solut, joilla on mosaiikkimaisen kiven muotoinen rakenne

Cell type

Epiteelisolut

Growth properties

Tarttuva

Sääntelytiedot

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP-solut | 300657

Citation	HK-CRISPR-Nup188-mEGFP (Cytionin luettelonumero 300657)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Ei määritelty (HK-CRISPR-Nup188-mEGFP on CRISPR-muunnettu HeLa Kyoto -johdannainen; emokanta HeLa Kyoto CVCL_1922)
Depositor	Ellenbergin laboratorio (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Tämä HeLa Kyoto -linja sisältää CRISPR-kopioinnin mEGFP:stä Nup188-lokukseen, mikä mahdollistaa ydinhuokosten telineen dynamiikan visualisoinnin. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

Biomolekyyli tiedot

Protein expression	Nup188, mEGFP-tag
---------------------------	-------------------

Käsittely

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/l glukoosia, w: 4 mM L-glutamiinia, w: 3,7 g/l NaHCO ₃ , w: 1,0 mM natriumpyruvaattia (Cytionin artikkelinumero 820300a)
Supplements	Täydennetään elatusainetta 10 %:lla FBS:llä
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.
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.

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP-solut | 300657**Thawing and
Culturing Cells**

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädettynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanotettaessa 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.

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP-solut | 300657

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.