

Cellule NRK-EGFP3-Seh1 | 500731

Informazioni generali

Description

La linea cellulare NRK-EGFP3-Seh1 è una linea clonale stabile derivata da cellule di rene normale di ratto (NRK). Questa linea cellulare è stata generata mediante la trasfezione di un plasmide circolare che codifica la proteina di fusione EGFP3-Seh1. Dopo la trasfezione, le cellule sono state selezionate per la resistenza ai farmaci, assicurando la creazione di una popolazione stabile che esprime il costrutto desiderato.

Circa il 50% delle cellule di questa popolazione esprime EGFP3-Seh1, una proteina di fusione che combina la proteina fluorescente verde potenziata (EGFP) con Seh1, una proteina componente del complesso del poro nucleare. La presenza di EGFP facilita la visualizzazione e il tracciamento della proteina di fusione all'interno delle cellule, consentendo ai ricercatori di studiare la dinamica e la funzione di Seh1 in vari processi cellulari. Tuttavia, l'espressione di EGFP3-Seh1 in questa linea cellulare presenta una certa variegatura, indicando una variabilità nei livelli di espressione tra le singole cellule della popolazione.

Questa linea cellulare è particolarmente utile per studi che riguardano l'assemblaggio del complesso del poro nucleare, il trasporto nucleocitoplasmatico e il ruolo di Seh1 in questi processi. La fluorescenza fornita da EGFP consente l'imaging di cellule vive e l'analisi in tempo reale della localizzazione e delle interazioni delle proteine, rendendo NRK-EGFP3-Seh1 uno strumento prezioso per la biologia cellulare e la ricerca molecolare.

Organism Ratto**Tissue** Rene**Synonyms** NRK EGFP3-Seh1

Caratteristiche

Breed/Subspecies OsborneMendel**Morphology** Cellule simili a fibroblasti con forma fusiforme**Growth properties** Monostrato, aderente

Dati normativi

Citation NRK-EGFP3-Seh1 (catalogo Cytion numero 500731)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 10116

Cellule NRK-EGFP3-Seh1 | 500731

CellosaurusAccession CVCL_AV94

Depositor Il laboratorio Ellenberg (EMBL)

Dati biomolecolari

Receptors expressed Fattore di crescita epidermico (EGF), attività stimolante la moltiplicazione (MSA)

Protein expression EGFP3-Seh1

Products Seh1 (Nucleoporina simile a SEH1)

Manipolazione

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/L di glucosio, w: 4 mM di L-Glutammina, w: 3,7 g/L di NaHCO₃, w: 1,0 mM di piruvato di sodio (articolo Cytion numero 820300a)

Supplements Integrare il terreno di coltura con 10% FBS, 0,5 mg/mL G418

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Rimuovere il vecchio terreno dalle cellule aderenti e lavarle con PBS privo di calcio e magnesio. Per le fiasche T25, utilizzare 3-5 ml di PBS e per le fiasche T75, 5-10 ml. Quindi, coprire completamente le cellule con Accutase, utilizzando 1-2 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75. Lasciare incubare le cellule a temperatura ambiente per 8-10 minuti per staccarle. Dopo l'incubazione, mescolare delicatamente le cellule con 10 ml di terreno per risospenderle, quindi centrifugare a 300xg per 3 minuti. Scartare il surnatante, risospendere le cellule in terreno fresco e trasferirle in nuove fiasche contenenti terreno fresco.

Split ratio Si raccomanda un rapporto da 1:3 a 1:4

Seeding density Da 2 a 4×10^4 cellule/cm²

Fluid renewal da 2 a 3 volte alla settimana

Freeze medium Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo (incluso FBS) + 10% DMSO per un'adeguata vitalità post-scongelo, o CM-1 (numero di catalogo Cytion 800100), che include osmoprotettori e stabilizzatori metabolici ottimizzati per migliorare il recupero e ridurre lo stress crio-indotto.

Cellule NRK-EGFP3-Seh1 | 500731

Thawing and Culturing Cells

1. Verificare che la fiala rimanga profondamente congelata al momento della consegna, poiché le cellule vengono spedite con ghiaccio secco per mantenere le temperature ottimali durante il trasporto.
2. Al ricevimento, conservare immediatamente la criovial a temperature inferiori a -150°C per garantire la conservazione dell'integrità cellulare, oppure procedere al punto 3 se è necessaria una coltura immediata.
3. Per la coltura immediata, scongelare rapidamente la fiala immergendola in un bagno d'acqua a 37°C con acqua pulita e un agente antimicrobico, agitando delicatamente per 40-60 secondi finché non rimane un piccolo grumo di ghiaccio.
4. Eseguire tutte le fasi successive in condizioni di sterilità in una cappa a flusso, disinfettando la criovial con etanolo al 70% prima dell'apertura.
5. Aprire con cautela la fiala disinfettata e trasferire la sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente 8 ml di terreno di coltura a temperatura ambiente, mescolando delicatamente.
6. Centrifugare la miscela a 300 x g per 3 minuti per separare le cellule e scartare con cura il surnatante contenente il terreno di coltura residuo.
7. Risospendere delicatamente il pellet cellulare in 10 ml di terreno di coltura fresco. Per le cellule aderenti, dividere la sospensione tra due fiasche di coltura T25; per le colture in sospensione, trasferire tutto il terreno in una fiasca T25 per promuovere l'interazione e la crescita delle cellule.
8. Attenersi ai protocolli di subcoltura stabiliti per la crescita e il mantenimento continui della linea cellulare, garantendo risultati sperimentali affidabili.

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO_2 , atmosfera umidificata.

Flask Coating

Nessuno

Freezing Procedure

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Shipping Conditions

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Cellule NRK-EGFP3-Seh1 | 500731

Storage Conditions

Per la conservazione a lungo termine, porre le fiale in azoto liquido in fase vapore a una temperatura compresa tra -150 e -196 °C circa. La conservazione a -80 °C è accettabile solo come breve fase intermedia prima del trasferimento in azoto liquido.

Controllo qualità e analisi molecolare

Sterility

La contaminazione da micoplasma viene esclusa utilizzando sia saggi basati sulla PCR sia metodi di rilevamento del micoplasma basati sulla luminescenza.

Per garantire l'assenza di contaminazione batterica, fungina o da lieviti, le colture cellulari sono sottoposte a ispezioni visive quotidiane.