

Cellule NRK-EGFP2-Nup50 | 500726**Informazioni generali****Description**

La linea cellulare NRK-EGFP2-Nup50 è una linea cellulare clonale stabile derivata da cellule di rene normale di ratto (NRK). Questa linea cellulare è stata generata attraverso la trasfezione di un plasmide circolare contenente il gene che codifica la proteina di fusione di Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) e Nucleoporin 50 (Nup50), seguita dalla selezione della resistenza ai farmaci. Di conseguenza, circa il 50% delle cellule esprime la proteina di fusione EGFP3-Nup50, che consente la visualizzazione e il tracciamento di Nup50 nell'ambiente cellulare.

Nup50 è un componente critico del complesso del poro nucleare, responsabile della regolazione del trasporto di molecole tra il nucleo e il citoplasma. Il tag EGFP3 consente l'imaging di cellule vive e altre tecniche basate sulla fluorescenza per studiare la localizzazione, la dinamica e le interazioni di Nup50. Pur essendo una linea cellulare stabile, le cellule NRK-EGFP2-Nup50 presentano una certa variegatura, che indica la variabilità dei livelli di espressione della proteina di fusione EGFP3-Nup50 tra le cellule.

Questa linea cellulare è particolarmente preziosa per la ricerca sul trasporto nucleocitoplasmatico, sulla dinamica del complesso del poro nucleare e sul ruolo funzionale di Nup50 in vari processi cellulari. Le cellule NRK-EGFP2-Nup50 sono adatte a una serie di approcci sperimentali, tra cui il recupero della fluorescenza dopo il photobleaching (FRAP), la spettroscopia di correlazione della fluorescenza (FCS) e altre tecniche avanzate di microscopia. Questi studi possono fornire approfondimenti sui meccanismi molecolari del trasporto nucleare e contribuire alla comprensione delle malattie associate a disfunzioni del trasporto nucleare, come alcuni tumori e disturbi neurodegenerativi.

Organism Ratto**Tissue** Rene**Synonyms** NRK EGFP2-Nup50**Caratteristiche****Breed/Subspecies** OsborneMendel**Morphology** Cellule simili a fibroblasti con forma fusiforme**Growth properties** Monostrato, aderente**Dati normativi****Citation** NRK-EGFP2-Nup50 (numero di catalogo Cytion 500726)**Biosafety level** 1

Cellule NRK-EGFP2-Nup50 | 500726

NCBI_TaxID 10116**CellosaurusAccession** CVCL_AV93**Depositor** Il laboratorio Ellenberg (EMBL)

Dati biomolecolari

Receptors expressed Fattore di crescita epidermico (EGF), attività stimolante la moltiplicazione (MSA)**Protein expression** EGFP3-Nup50**Products** NUP50 (Nucleoporina 50)

Manipolazione

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/L di glucosio, w: 4 mM di L-Glutamina, 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** Eliminare il vecchio terreno e lavare le cellule con PBS. Aggiungere una soluzione di tripsina 0,025%/0,02% EDTA appena preparata e riscaldata a 37 gradi Celsius e attendere che le cellule si stacchino, il che di solito richiede circa 5 minuti. Neutralizzare la tripsina aggiungendo terreno fresco, quindi trasferire la miscela di cellule in una provetta e centrifugare. Dopo la centrifugazione, rimuovere il surnatante, risospesione il pellet di cellule in terreno di coltura fresco e trasferire la sospensione in nuove fiasche. Incorporare G418 nel terreno di coltura per ottenere una concentrazione finale di 0,5 mg/ml**Split ratio** Si raccomanda un rapporto da 1:3 a 1:4**Seeding density** Da 2 a 4 x 10⁴ 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-EGFP2-Nup50 | 500726

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%_{CO2}, 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-EGFP2-Nup50 | 500726

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 di qualità / Profilo genetico / HLA

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.