

Cellule HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657**Informazioni generali****Description**

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP è una linea cellulare HeLa Kyoto geneticamente modificata. Utilizza la tecnologia CRISPR/Cas9 per integrare mEGFP (monomeric Enhanced Green Fluorescent Protein) nel locus Nup188. Nup188 è una proteina nucleoporina chiave coinvolta nel complesso del poro nucleare, essenziale per il trasporto di molecole tra il nucleo e il citoplasma. Il tagging mEGFP consente la visualizzazione in tempo reale di Nup188, favorendo lo studio della dinamica e della funzione del complesso del poro nucleare.

Questa linea cellulare è particolarmente utile per i ricercatori che si concentrano sul trasporto nucleare e sulla biologia del complesso dei pori nucleari. La sua marcatura fluorescente consente di osservare Nup188 in varie condizioni, compresi i trattamenti farmacologici e le modifiche genetiche. Le applicazioni includono lo screening ad alto contenuto, l'imaging di cellule vive e altre tecniche basate sulla fluorescenza, fornendo preziose informazioni sul trasporto nucleocitoplasmatico e sull'integrità dell'involucro nucleare.

Organism

Umano

Tissue

Endocervice

Disease

Adenocarcinoma

Metastatic site

Non applicabile (derivato HeLa Kyoto; sede primaria del tumore: endocervice)

Applications

Biologia del complesso dei pori nucleari (NPC); trasporto nucleocitoplasmatico; dinamica e funzione di Nup188; imaging a fluorescenza su cellule vive dell'involucro nucleare; screening ad alto contenuto; studi di validazione del knock-in con CRISPR; valutazione degli inibitori del trasporto nucleare

Caratteristiche**Age**

30 anni

Gender

Donna

Ethnicity

Afroamericano

Morphology

Cellule simili a quelle epiteliali con forma di pietra a mosaico

Cell type

Cellule epiteliali

Growth properties

Aderente

Dati normativi

Cellule HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

Citation	HK-CRISPR-Nup188-mEGFP (numero di catalogo Cytion 300657)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Non assegnato (HK-CRISPR-Nup188-mEGFP è un derivato di HeLa Kyoto modificato con CRISPR; ceppo parentale: HeLa Kyoto CVCL_1922)
Depositor	Il laboratorio Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: questa linea HeLa Kyoto contiene un knock-in CRISPR di mEGFP nel locus Nup188, che consente di visualizzare le dinamiche dell'impalcatura del poro nucleare. Questa classificazione si applica solo in Germania e può variare altrove.

Dati biomolecolari

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

Manipolazione

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

Supplements	Integrare il terreno di coltura con il 10% di FBS
--------------------	---

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.
---------------------	---

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 HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

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 HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

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.