

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP ląstelės | 300657

Bendra informacija

Description

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP yra genetiškai modifikuota Hela Kyoto ląstelių linija. Joje naudojama CRISPR/Cas9 technologija, kad į Nup188 lokusą būtų integruotas mEGFP (monomerinis sustiprintas žaliasis fluorescencinis baltymas). Nup188 yra pagrindinis nukleoporino baltymas, dalyvaujantis branduolio porų komplekse, kuris būtinas molekulių pernešimui tarp branduolio ir citoplazmos. MEGFP žymėjimas leidžia realiuoju laiku vizualizuoti Nup188, o tai padeda tirti branduolio porų komplekso dinamiką ir funkciją.

Ši ląstelių linija ypač naudinga mokslininkams, tyrinėjantiems branduolio pernešimą ir branduolio porų komplekso biologiją. Fluorescencinis žymėjimas leidžia stebėti Nup188 įvairiomis sąlygomis, įskaitant gydymą vaistais ir genetines modifikacijas. Taikomi didelio turinio tyrimai, gyvų ląstelių vaizdavimas ir kiti fluorescencija pagrįsti metodai, suteikiantys vertingų įžvalgų apie nukleocitoplazminį pernešimą ir branduolio apvalkalo vientisumą.

Organism

Žmogus

Tissue

Endocervix

Disease

Adenokarcinoma

Metastatic site

Netaikoma (HeLa Kyoto atmaina; pirminė naviko lokalizacija – gimdos kaklelio vidinė dalis)

Applications

Branduolio porų komplekso (NPC) biologija; branduolio ir citoplazmos transportas; Nup188 dinamika ir funkcija; branduolio apvalkalo fluorescencinis vaizdavimas gyvose ląstelėse; didelio apimties atranka; CRISPR „knock-in“ metodikos patvirtinimo tyrimai; branduolio transporto inhibitorių vertinimas

Charakteristikos

Age

30 metų

Gender

Moteris

Ethnicity

Afroamerikietis

Morphology

Į epitelį panašios ląstelės su mozaikos formos akmenukais

Cell type

Epitelio ląstelės

Growth properties

Priglundęs

Reguliavimo duomenys

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP ląstelės | 300657

Citation	HK-CRISPR-Nup188-mEGFP (Cytion katalogo numeris 300657)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Nepaskirtas (HK-CRISPR-Nup188-mEGFP yra CRISPR metodu modifikuota „HeLa Kyoto“ atmaina; pirminė „HeLa Kyoto“ atmaina – CVCL_1922)
Depositor	Ellenbergo laboratorija (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Šioje HeLa Kyoto linijoje yra CRISPR mEGFP nukabinimas Nup188 lokuse, leidžiantis vizualizuoti branduolio porų pastolių dinamiką. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir gali skirtis kitose šalyse.

Biomolekuliniai duomenys

Protein expression	Nup188, mEGFP žymė
---------------------------	--------------------

Tvarkymas

Culture Medium	DMEM, š: 4,5 g/l gliukozės, š: 4 mM L-glutamino, š: 3,7 g/l NaHCO ₃ , š: 1,0 mM natrio piruvato (Cytion gaminio numeris 820300a)
Supplements	Papildykite terpę 10 % FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Pašalinkite seną terpę nuo prilipusių ląstelių ir nuplaukite jas PBS, kuriame nėra kalcio ir magnio. T25 kolboms naudokite 3-5 ml PBS, o T75 kolboms - 5-10 ml. Tuomet visiškai užpildykite ląsteles "Accutase", naudodami 1-2 ml T25 kolboms ir 2,5 ml T75 kolboms. Leiskite ląstelėms inkubuotis kambario temperatūroje 8-10 minučių, kad jos atsiskirtų. Po inkubacijos atsargiai sumaišykite ląsteles su 10 ml terpės, kad jos vėl suspenduotų, tada 3 minutes centrifuguokite 300xg greičiu. Išmeskite supernatantą, vėl sutirpinkite ląsteles šviežioje terpėje ir perkelti jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.
Freeze medium	Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę (įskaitant FBS) + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo, arba CM-1 (Cytion katalogo numeris 800100), kurioje yra optimizuotų osmoprotektorių ir medžiagų apykaitos stabilizatorių, kad būtų pagerintas atsigavimas ir sumažintas kriokonservavimo sukeltas stresas.

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

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei -150°C temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į 37°C temperatūros vandens vonelę su švriu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite $300 \times g$ greičiu 3 minutes, kad atsiskirtų ląstelės, ir atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpės likučiais.
7. Švelniai resuspenduokite ląstelių granules 10 ml šviežios mitybinės terpės. Jei ląstelės yra prigludusios, suspensiją padalykite į dvi T25 kolbas; jei tai suspensinės kultūros, visą terpę perkelti į vieną T25 kolbą, kad paskatintumėte veiksmingą ląstelių sąveiką ir augimą.
8. Laikykitės nustatytų subkultūrų protokolų, kad ląstelių linija nuolat augtų ir būtų palaikoma, taip užtikrinant patikimus eksperimentų rezultatus.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5 % CO_2 , drėkintoje atmosferoje.

Flask Coating

Nėra

**Freezing
Procedure**

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug -78°C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

**Shipping
Conditions**

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug -78°C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP ląstelės | 300657

Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug -150-196 °C temperatūroje. Laikymas -80 °C temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeliant į skystąjį azotą.

Kokybės kontrolė ir molekulinė analizė

Sterility

Mikoplazmos užterštumas atmetamas taikant PGR pagrįstus tyrimus ir liuminescencinius mikoplazmos aptikimo metodus.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų užteršimo bakterijomis, grybeliais ar mielėmis, ląstelių kultūros kasdien vizualiai tikrinamos.