

HK-CRISPR-NUP205-mEGFP šūnas | 301574

Vispārīga informācija

Description

HK-CRISPR-NUP205-mEGFP šūnu līnija ir ģenētiski modificēta cilvēka šūnu līnija, kas izveidota, lai pētītu nukleoporīnu 205 (NUP205) un tā lomu kodolporu kompleksā. Modificēta ar CRISPR-Cas9, lai NUP205 marķētu ar monomēru pastiprinātu zaļo fluorescējošo proteīnu (mEGFP), tā ļauj vizualizēt un izsekot NUP205 dzīvās šūnās, palīdzot pētīt kodola transporta mehānismus un kodola poru kompleksa dinamiku.

NUP205 ir būtiska kodola poru kompleksa sastāvdaļa, kas regulē molekulu transportu starp kodolu un citoplazmu. NUP205 marķēšana ar mEGFP ļauj pētniekiem novērot tā lokalizāciju un uzvedību reāllaikā ar fluorescences mikroskopu, padarot šo šūnu līniju īpaši noderīgu, lai pētītu kodola poru kompleksu strukturālos un funkcionālos aspektus un to lomu gēnu ekspresijā, RNS apstrādē un šūnu ciklā.

HK-CRISPR-NUP205-mEGFP šūnu līnija ir spēcīgs rīks, lai pētītu nukleocitoplazmas transporta mehānismus un kodola poru kompleksa lomu šūnu homeostāzē. Tā ir arī vērtīga, lai izpētītu, kā traucējumi kodola poru darbībā veicina tādas slimības kā vēzis un neirodeģeneratīvie traucējumi, piedāvājot spēcīgu modeli, lai uzlabotu mūsu izpratni par kodola transportu un tā ietekmi uz cilvēka veselību.

Organism Cilvēks

Tissue Endocervix

Disease Adenokarcinoma

Metastatic site Primārā audzēja lokalizācija (endocervix)

Applications Kodola poru kompleksa (NPC) skeleta bioloģija; NUP205 skeleta nukleoporīna attēlveidošana; mEGFP dzīvo šūnu vizualizācija; superizšķirtspējas mikroskopija; CRISPR „knock-in” validācija; kodola un citoplazmas transports; NPC strukturālā organizācija

Synonyms HK-CRISPR-NUP205-mEGFP #81

Raksturojums

Age 30 gadi

Gender Sievietes

Ethnicity Afroamerikānis

Morphology Epitēlijveidīgas šūnas ar mozaikveida akmens formu

Cell type Epitēlija šūnas

HK-CRISPR-NUP205-mEGFP šūnas | 301574

Growth properties Adherent

Normatīvie dati

Citation HK-CRISPR-NUP205-mEGFP (Cytion kataloga numurs 301574)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_UR49

Depositor Ellenberga laboratorija (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Šī HeLa Kyoto līnija satur ar CRISPR inženierijas palīdzību izveidotu mEGFP fūziju NUP205 lokusā, kas paredzēta kodolporu pētījumiem. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un var atšķirties citur.

Biomolekulārie dati

Products EGFP (uzlabots zaļais fluorescējošais proteīns)

Darbs ar

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glikozes, w: 4 mM L-glutamīna, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM nātrija piruvāta (Cytion izstrādājuma numurs 820300a)

Supplements Papildināt barotni ar 10% FBS

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Noņemt veco barotni no pielipušajām šūnām un mazgāt tās ar PBS, kurā nav kalcija un magnija. T25 kolbām izmantojiet 3-5 ml PBS, bet T75 kolbām - 5-10 ml. Pēc tam pilnībā pārklājiet šūnas ar Accutase, izmantojot 1-2 ml T25 kolbām un 2,5 ml T75 kolbām. Ļaujiet šūnām inkubēties istabas temperatūrā 8-10 minūtes, lai tās atdalītos. Pēc inkubācijas uzmanīgi samaisiet šūnas ar 10 ml barotnes, lai tās atkārtoti suspendētu, pēc tam centrifugējiet 3 minūtes ar 300xg. Izmetiet supernatantu, atkārtoti suspendējiet šūnas svaigā barotnē un pārvietojiet tās jaunās kolbās, kurās jau ir svaiga barotne.

Fluid renewal 2 līdz 3 reizes nedēļā

HK-CRISPR-NUP205-mEGFP šūnas | 301574**Freeze medium**

Kā kriokonservēšanas barotni mēs izmantojam pilnvērtīgu augšanas barotni (ieskaitot FBS) + 10 % DMSO, lai nodrošinātu pietiekamu dzīvotspēju pēc atkausēšanas, vai CM-1 (Cytion kataloga numurs 800100), kas ietver optimizētus osmoprotektorus un metaboliskos stabilizatorus, lai uzlabotu atveseļošanos un samazinātu krioinducēto stresu.

Thawing and Culturing Cells

1. Pārliecinieties, ka pēc piegādes flakons paliek dziļi sasaldēts, jo šūnas tiek sūtītas uz sausā ledus, lai pārvadāšanas laikā saglabātu optimālu temperatūru.
2. Pēc saņemšanas vai nu nekavējoties uzglabāt kriovialu temperatūrā, kas zemāka par $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, lai nodrošinātu šūnu integritātes saglabāšanu, vai arī turpināt 3. posmu, ja nepieciešama tūlītēja kultivēšana.
3. Tūlītējas kultivēšanas gadījumā ātri atkausējiet flakonu, iegremdējot to 37°C ūdens vannā ar tīru ūdeni un antibakteriālu līdzekli, viegli maisot 40-60 sekundes, līdz paliek neliels ledus gabaliņš.
4. Visas turpmākās darbības veiciet sterilos apstākļos plūsmas nosūcējā, pirms atvēršanas dezinficējot kriovialu ar 70% etanolu.
5. Uzmanīgi atveriet dezinficēto flakonu un pārnesiet šūnu suspensiju 15 ml centrifūgas mēģenē, kurā ir 8 ml istabas temperatūras barotnes, uzmanīgi samaisot.
6. Centrifugējiet maisījumu ar $300 \times g$ 3 minūtes, lai atdalītu šūnas, un uzmanīgi izmetiet virskārtu, kas satur saldēšanas barotnes atlikumus.
7. Viegli resuspendēt šūnu granulas 10 ml svaigas barotnes. Adhēzijas šūnu gadījumā suspensiju sadalīt divās T25 kolbās; suspensijas kultūrām visu barotni pārnest vienā T25 kolbā, lai veicinātu efektīvu šūnu mijiedarbību un augšanu.
8. Ievērojiet noteiktos subkultūru protokolus, lai nodrošinātu nepārtrauktu šūnu līnijas augšanu un uzturēšanu, tādējādi nodrošinot uzticamus eksperimentu rezultātus.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , mitrināta atmosfēra.

Flask Coating

Neviens

Freezing Procedure

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

HK-CRISPR-NUP205-mEGFP šūnas | 301574

Shipping Conditions

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

Storage Conditions

Ilgstošai uzglabāšanai flakonus ievietojiet šķidrā slāpekļī ar tvaika fāzi aptuveni -150 līdz -196 °C temperatūrā. Uzglabāšana -80 °C temperatūrā ir pieļaujama tikai kā īss starposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

Kvalitātes kontrole / Ģenētiskais profils / HLA

Sterility

Mikoplazmas piesārņojums tiek izslēgts, izmantojot gan uz PCR balstītus testus, gan uz luminiscenci balstītas mikoplazmas noteikšanas metodes.

Lai pārlicinātos, ka nav baktēriju, sēnīšu vai rauga piesārņojuma, šūnu kultūras katru dienu vizuāli pārbauda.