

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP šūnas | 300657

Vispārīga informācija

Description

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP ir ģenētiski modificēta Hela Kyoto šūnu līnija. Tā izmanto CRISPR/Cas9 tehnoloģiju, lai integrētu mEGFP (monomēru uzlaboto zaļo fluorescējošo proteīnu) Nup188 lokusā. Nup188 ir galvenais nukleoporīna proteīns, kas iesaistīts kodola poru kompleksā, kurš ir būtisks molekulu transportam starp kodolu un citoplazmu. mEGFP marķējums ļauj reāllaikā vizualizēt Nup188, palīdzot pētīt kodola poru kompleksa dinamiku un funkcijas.

Šī šūnu līnija ir īpaši noderīga pētniekiem, kas pievēršas kodola transporta un kodola poru kompleksa bioloģijai. Tās fluorescējošais marķējums ļauj novērot Nup188 dažādos apstākļos, tostarp ārstējot ar zālēm un veicot ģenētiskas modifikācijas. Pielietojums ietver augsta satura skrīningu, dzīvu šūnu attēlveidošanu un citus uz fluorescenci balstītus paņēmienus, kas sniedz vērtīgu ieskatu par nukleocitoplazmas transportu un kodola apvalka integritāti.

Organism

Cilvēks

Tissue

Endocervix

Disease

Adenokarcinoma

Metastatic site

Neattiecas (HeLa Kyoto atvasinājums; primārā audzēja lokalizācija ir endocervikā)

Applications

Kodola poru kompleksa (NPC) bioloģija; kodola un citoplazmas transports; Nup188 dinamika un funkcija; kodola apvalka fluorescences attēlveidošana dzīvajās šūnās; augstas izšķirtspējas skrīnings; CRISPR „knock-in” validācijas pētījumi; kodola transporta inhibitoru novērtēšana

Raksturojums

Age

30 gadi

Gender

Sievietes

Ethnicity

Afroamerikānis

Morphology

Epitēlijveidīgas šūnas ar mozaikveida akmens formu

Cell type

Epitēlija šūnas

Growth properties

Adherent

Normatīvie dati

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP šūnas | 300657

Citation	HK-CRISPR-Nup188-mEGFP (Cytion kataloga numurs 300657)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Nav piešķirts (HK-CRISPR-Nup188-mEGFP ir CRISPR modificēts HeLa Kyoto atvasinājums; sākotnējais HeLa Kyoto CVCL_1922)
Depositor	Ellenberga laboratorija (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Šī HeLa Kyoto līnija satur CRISPR mEGFP knock-in Nup188 lokusā, kas ļauj vizualizēt kodola poru sastatņu dinamiku. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un var atšķirties citur.

Biomolekulārie dati

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

Darbs ar

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/l glikozes, w: 4 mM L-glutamīna, w: 3,7 g/l NaHCO ₃ , 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 izmantot 3-5 ml PBS, bet T75 kolbām - 5-10 ml. Pēc tam pilnībā pārklājiēt 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.
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.

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP šūnas | 300657**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 °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 pārnēsiet šūnu suspensiju 15 ml centrifūgas mēģenē, kurā ir 8 ml istabas temperatūras barotnes, uzmanīgi samaisot.
6. Centrifugējiet maisījumu ar 300 x 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 pārnēsāt 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 šķidruma daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP šūnas | 300657

Shipping Conditions

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidruma 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 un molekulārā analīze

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.