

NRK-EGFP2-Nup50-cellen | 500726

Algemene informatie

Description

De NRK-EGFP2-Nup50 cellijn is een klonale stabiele cellijn afgeleid van normale rattencellen (NRK). Deze cellijn werd gegenereerd door transfectie van een circulair plasmide dat het gen bevat dat codeert voor het fusie-eiwit van Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) en Nucleoporine 50 (Nup50), gevolgd door selectie op resistentie tegen geneesmiddelen. Als gevolg hiervan brengt ongeveer 50% van de cellen het fusie-eiwit EGFP3-Nup50 tot expressie, waardoor Nup50 in de cellulaire omgeving kan worden gevisualiseerd en gevolgd.

Nup50 is een essentieel onderdeel van het nucleaire porecomplex, dat verantwoordelijk is voor het reguleren van het transport van moleculen tussen de kern en het cytoplasma. De EGFP3-tag maakt live-cell imaging en andere op fluorescentie gebaseerde technieken mogelijk om de lokalisatie, dynamiek en interacties van Nup50 te bestuderen. Ondanks het feit dat het een stabiele cellijn is, vertonen de NRK-EGFP2-Nup50 cellen enige variatie, wat duidt op variabiliteit in de expressieniveaus van het fusie-eiwit EGFP3-Nup50 tussen de cellen.

Deze cellijn is bijzonder waardevol voor onderzoek gericht op nucleocytoplasmatisch transport, dynamica van het nucleaire porecomplex en de functionele rol van Nup50 in verschillende cellulaire processen. De NRK-EGFP2-Nup50-cellen zijn geschikt voor een reeks experimentele benaderingen, waaronder fluorescentieherstel na fotobleaching (FRAP), fluorescentiecorrelatiespectroscopie (FCS) en andere geavanceerde microscopietechnieken. Deze studies kunnen inzicht verschaffen in de moleculaire mechanismen van nucleair transport en bijdragen aan het begrip van ziekten die geassocieerd worden met disfunctioneren van nucleair transport, zoals bepaalde vormen van kanker en neurodegeneratieve aandoeningen.

Organism Rat

Tissue Nieren

Synonyms NRK EGFP2-Nup50

Kenmerken

Breed/Subspecies OsborneMendel

Morphology Fibroblast-achtige cellen met spoelvormige vorm

Growth properties Monolaag, adherent

Regelgevende gegevens

Citation NRK-EGFP2-Nup50 (Cytion catalogusnummer 500726)

Biosafety level 1

NRK-EGFP2-Nup50-cellen | 500726

NCBI_TaxID 10116**CellosaurusAccession** CVCL_AV93**Depositor** Het Ellenberg Lab (EMBL)**Biomoleculaire gegevens****Receptors expressed** Epidermale groeifactor (EGF), vermeerderingsstimulerende activiteit (MSA)**Protein expression** EGFP3-Nup50**Products** NUP50 (Nucleoporine 50)**Omgaan met****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L Glucose, w: 4 mM L-Glutamine, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM Natriumpyruvaat (Cytion artikelnummer 820300a)**Supplements** Vul het medium aan met 10% FBS, 0,5 mg/mL G418**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Gooi het oude medium weg en was de cellen met PBS. Voeg een vers bereide 0,025% trypsine/0,02% EDTA-oplossing verwarmd tot 37 graden Celsius toe en wacht tot de cellen loskomen, wat meestal ongeveer 5 minuten duurt. Neutraliseer de trypsine door vers medium toe te voegen, breng het celmengsel over naar een buis en centrifugeer. Verwijder na het centrifugeren het supernatant, resuspendeer de celpellet in vers kweekmedium en breng de suspensie over naar nieuwe kolven. Voeg G418 toe aan het kweekmedium om een eindconcentratie van 0,5 mg/ml te bereiken**Split ratio** Een verhouding van 1:3 tot 1:4 wordt aanbevolen**Seeding density** 2 tot 4 x 10⁴ cellen/cm²**Fluid renewal** 2 tot 3 keer per week

NRK-EGFP2-Nup50-cellen | 500726

Freeze medium

Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimeidium (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij $300 \times g$ om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , bevochtigde atmosfeer.

Flask Coating

Geen

Freezing Procedure

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

NRK-EGFP2-Nup50-cellen | 500726

Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer -78 °C te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Kwaliteitscontrole / Genetisch profiel / HLA

Sterility

Mycoplasmacontaminatie wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasma detectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.