

Komórki NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 | 500672**Informacje ogólne****Description**

Linia komórkowa NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 jest klonalną, stabilną linią komórkową uzyskaną z normalnych komórek nerki szczura (NRK) poprzez transfekcję kolistego plazmidu. Plazmid ten zawiera konstrukty genetyczne kodujące cztery tandemowe powtórzenia miejsc wiązania RNA lambda N22 i trzy tandemowe powtórzenia znaczników mEGFP (monomeryczne wzmocnione zielone białko fluorescencyjne) połączone z sygnałem lokalizacji jądrowej M9. Po transfekcji komórki poddano selekcji odporności na leki, aby zapewnić stabilność modyfikacji genetycznych.

Około 50% komórek w tej stabilnej linii klonalnej wykazuje ekspresję markera fluorescencyjnego 4xλN22-3xmEGFP-M9, co wskazuje na udaną inkorporację plazmidu. Ekspresja tego markera pozwala na wizualizację procesów wewnątrzkomórkowych w czasie rzeczywistym, ułatwioną przez silny sygnał fluorescencyjny mEGFP. Sygnał lokalizacji jądrowej M9 zapewnia, że wyrażone białka fuzyjne są transportowane do jądra, dzięki czemu ta linia komórkowa jest szczególnie przydatna do badania transportu jądrowo-cytoplazmatycznego, dynamiki RNA i regulacji ekspresji genów.

Ta linia komórkowa NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 jest cenna dla badaczy koncentrujących się na interakcjach białek wiążących RNA, metabolizmie RNA oraz mechanizmach leżących u podstaw importu i eksportu jądrowego. Obecność markera mEGFP umożliwia zaawansowane techniki obrazowania, takie jak mikroskopia konfokalna i obrazowanie żywych komórek, zapewniając szczegółowy wgląd w przestrzenną i czasową dynamikę składników komórkowych. Pomimo zróżnicowania, linia komórkowa pozostaje potężnym narzędziem do badania złożonych szlaków molekularnych i zrozumienia funkcji komórkowych na głębszym poziomie.

Organism Szczur**Tissue** Nerka**Synonyms** NRK 4xλN22-3xmEGFP-M9**Charakterystyka****Breed/Subspecies** OsborneMendel**Morphology** Komórki podobne do fibroblastów o wrzecionowatym kształcie**Growth properties** Monowarstwa, przylegająca**Dane regulacyjne****Citation** NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 (numer katalogowy Cytion 500672)

Komórki NRK-4xλN22-3xmEGFP-M9 | 500672

Biosafety level	1
NCBI_TaxID	10116
CellosaurusAccession	CVCL_AV97
Depositor	Laboratorium Ellenberg (EMBL)

Dane biomolekularne

Receptors expressed	Epidermalny czynnik wzrostu (EGF), aktywność stymulująca namnażanie (MSA)
Protein expression	4xλN22-3xmEGFP-M9: Lokalizacja/gen: 937..1009, 1066..1138, 1194..1261, 1323..1390 / peptyd lambda, 1462..2176, 2179..2890, 2896..3612 / mEGFP, 3612..3815 / M9-His, 5090..5884 / KanR/NeoR, 7195..584 / Pcmv
Products	Znacznik M9-His między BsrG1/HindIII, neomycyna, fosfotransferaza, promotor CMV

Obsługa

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/l glukozy, w: 4 mM L-glutaminy, w: 3,7 g/l NaHCO ₃ , w: 1,0 mM pirogronianu sodu (numer artykułu Cytion 820300a)
Supplements	Uzupełnić podłoże 10% FBS, 0,5 mg/ml G418
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Wyrzucić starą pożywkę i przepłukać komórki PBS. Dodaj świeżo przygotowany 0,025% roztwór trypsyny/0,02% EDTA podgrzany do 37 stopni Celsjusza i poczekaj, aż komórki się odłączą, co zwykle zajmuje około 5 minut. Zneutralizować trypsynę przez dodanie świeżej pożywki, a następnie przenieść mieszaninę komórek do probówki i odwirować. Po odwirowaniu usunąć supernatant, ponownie zawiesić osad komórkowy w świeżej pożywce i przenieść zawiesinę do nowych kolb. Dodać G418 do podłoża hodowlanego, aby osiągnąć końcowe stężenie 0,5 mg/ml
Split ratio	Zalecany jest stosunek 1:3 do 1:4
Seeding density	2 do 4 x 10 ⁴ komórek/cm ²
Fluid renewal	2 do 3 razy w tygodniu

Komórki NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 | 500672**Freeze medium**

Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

Thawing and Culturing Cells

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml próbówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $300 \times g$ przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawiesinowych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Flask Coating

Brak

Komórki NRK-4xlambdaN22-3xmEGFP-M9 | 500672**Freezing Procedure**

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C. Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA**Sterility**

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczone przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.

Profil STR

Rat_D1Wox31: 96,1
Rat_D2Wox37: 150,156
Rat_D19Wox11: 220
Rat_D10Wox8: 266,27
Rat_D4Wox7: 153,157
Rat_D2Wox27: 211,215
Rat_D5Rat33: 122,138
Rat_D10Wox11: 156
Rat_D1Wox23: 210,214
Rat_D12Wox1: 402,406
Rat_D6Wox2: 104,124
Rat_D8Wox7: 185
Rat_D6Cebr1: 223,233
SRY: x,Y