

Komórki NRK-EGFP3-Seh1 | 500731**Informacje ogólne****Description**

Linia komórkowa NRK-EGFP3-Seh1 jest klonalną stabilną linią pochodzącą z normalnych szczurzych komórek nerkowych (NRK). Ta linia komórkowa została wygenerowana poprzez transfekcję kolistego plazmidu kodującego białko fuzyjne EGFP3-Seh1. Po transfekcji komórki zostały wyselekcjonowane pod kątem oporności na leki, zapewniając ustanowienie stabilnej populacji wyrażającej pożądany konstrukt.

Około 50% komórek w tej populacji wyraża EGFP3-Seh1, białko fuzyjne łączące wzmocnione zielone białko fluorescencyjne (EGFP) z Seh1, białkowym składnikiem kompleksu porów jądrowych. Obecność EGFP ułatwia wizualizację i śledzenie białka fuzyjnego w komórkach, umożliwiając naukowcom badanie dynamiki i funkcji Seh1 w różnych procesach komórkowych. Jednak ekspresja EGFP3-Seh1 w tej linii komórkowej wykazuje pewną zmienność, co wskazuje na zmienność poziomów ekspresji między poszczególnymi komórkami w populacji.

Ta linia komórkowa jest szczególnie przydatna do badań obejmujących montaż kompleksu porów jądrowych, transport nukleocytoplazmatyczny i rolę Seh1 w tych procesach. Fluorescencja zapewniana przez EGFP pozwala na obrazowanie żywych komórek i analizę w czasie rzeczywistym lokalizacji i interakcji białek, dzięki czemu NRK-EGFP3-Seh1 jest cennym narzędziem w biologii komórki i badaniach molekularnych.

Organism Szczur**Tissue** Nerka**Synonyms** NRK EGFP3-Seh1**Charakterystyka****Breed/Subspecies** OsborneMendel**Morphology** Komórki podobne do fibroblastów o wrzecionowatym kształcie**Growth properties** Monowarstwa, przylegająca**Dane regulacyjne****Citation** NRK-EGFP3-Seh1 (numer katalogowy Cytion 500731)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 10116**CellosaurusAccession** CVCL_AV94

Komórki NRK-EGFP3-Seh1 | 500731**Depositor** Laboratorium Ellenberg (EMBL)**Dane biomolekularne****Receptors expressed** Epidermalny czynnik wzrostu (EGF), aktywność stymulująca namnażanie (MSA)**Protein expression** EGFP3-Seh1**Products** Seh1 (nukleoporyna podobna do SEH1)**Obsługa****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/l glukozy, w: 4 mM L-glutaminy, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pirogronianu sodu (numer artykułu Cytion 820300a)**Supplements** Uzupelnic podloze 10% FBS, 0,5 mg/ml G418**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.**Split ratio** Zalecany jest stosunek 1:3 do 1:4**Seeding density** 2 do 4 x 10⁴ komórek/cm²**Fluid renewal** 2 do 3 razy w tygodniu**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.

Komórki NRK-EGFP3-Seh1 | 500731**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 probówki 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 zawieszonych, 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

**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 czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Komórki NRK-EGFP3-Seh1 | 500731

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 wykluczane 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.