

Komórki NRK-EGFP2-Nup50 | 500726**Informacje ogólne****Description**

Linia komórkowa NRK-EGFP2-Nup50 jest klonalną stabilną linią komórkową pochodzącą z normalnych szczurzych komórek nerkowych (NRK). Ta linia komórkowa została wygenerowana poprzez transfekcję kolistego plazmidu zawierającego gen kodujący białko fuzyjne Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) i Nucleoporin 50 (Nup50), a następnie selekcję oporności na leki. W rezultacie około 50% komórek wykazuje ekspresję białka fuzyjnego EGFP3-Nup50, co umożliwia wizualizację i śledzenie Nup50 w środowisku komórkowym.

Nup50 jest krytycznym składnikiem kompleksu porów jądrowych, który jest odpowiedzialny za regulację transportu cząsteczek między jądrem a cytoplazmą. Znacznik EGFP3 pozwala na obrazowanie żywych komórek i inne techniki oparte na fluorescencji w celu zbadania lokalizacji, dynamiki i interakcji Nup50. Pomimo tego, że jest to stabilna linia komórkowa, komórki NRK-EGFP2-Nup50 wykazują pewną zmienność, co wskazuje na zmienność poziomów ekspresji białka fuzyjnego EGFP3-Nup50 w komórkach.

Ta linia komórkowa jest szczególnie cenna dla badań koncentrujących się na transporcie nukleocytoplazmatycznym, dynamice kompleksu porów jądrowych i funkcjonalnej roli Nup50 w różnych procesach komórkowych. Komórki NRK-EGFP2-Nup50 są odpowiednie dla szeregu metod eksperymentalnych, w tym odzyskiwania fluorescencji po fotowysłabianiu (FRAP), spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS) i innych zaawansowanych technik mikroskopii. Badania te mogą zapewnić wgląd w molekularne mechanizmy transportu jądrowego i przyczynić się do zrozumienia chorób związanych z dysfunkcją transportu jądrowego, takich jak niektóre nowotwory i zaburzenia neurodegeneracyjne.

Organism Szczur**Tissue** Nerka**Synonyms** NRK EGFP2-Nup50**Charakterystyka****Breed/Subspecies** OsborneMendel**Morphology** Komórki podobne do fibroblastów o wrzecionowatym kształcie**Growth properties** Monowarstwa, przylegająca**Dane regulacyjne****Citation** NRK-EGFP2-Nup50 (numer katalogowy Cytion 500726)**Biosafety level** 1

Komórki NRK-EGFP2-Nup50 | 500726**NCBI_TaxID** 10116**CellosaurusAccession** CVCL_AV93**Depositor** Laboratorium Ellenberg (EMBL)**Dane biomolekularne****Receptors expressed** Epidermalny czynnik wzrostu (EGF), aktywność stymulująca namnażanie (MSA)**Protein expression** EGFP3-Nup50**Products** NUP50 (nukleoporyna 50)**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** Uzuppełnić 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 10⁴ komórek/cm²**Fluid renewal** 2 do 3 razy w tygodniu

Komórki NRK-EGFP2-Nup50 | 500726**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-EGFP2-Nup50 | 500726

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 fiolki 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 fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiolki 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.