

Bunky NRK-EGFP2-Nup50 | 500726**Všeobecné informácie****Description**

Bunková línia NRK-EGFP2-Nup50 je klonálna stabilná bunková línia odvodená z buniek normálnych potkaních obličiek (NRK). Táto bunková línia bola vytvorená transfekciou kruhového plazmidu obsahujúceho gén kódujúci fúzny proteín zosilneného zeleného fluorescenčného proteínu (EGFP) a nukleoporínu 50 (Nup50), po ktorej nasledovala selekcia na liekovú rezistenciu. Výsledkom je, že približne 50 % buniek exprimuje fúzny proteín EGFP3-Nup50, čo umožňuje vizualizáciu a sledovanie Nup50 v bunkovom prostredí.

Nup50 je kritickou zložkou komplexu jadrových pórov, ktorý je zodpovedný za reguláciu prenosu molekúl medzi jadrom a cytoplazmou. Značka EGFP3 umožňuje zobrazovanie živých buniek a iné techniky založené na fluorescencii na štúdium lokalizácie, dynamiky a interakcií Nup50. Napriek tomu, že ide o stabilnú bunkovú líniu, bunky NRK-EGFP2-Nup50 vykazujú určitú variabilitu, čo poukazuje na variabilitu úrovne expresie fúzneho proteínu EGFP3-Nup50 medzi bunkami.

Táto bunková línia je mimoriadne cenná pre výskum zameraný na nukleocytoplazmatický transport, dynamiku komplexu jadrových pórov a funkčnú úlohu Nup50 v rôznych bunkových procesoch. Bunky NRK-EGFP2-Nup50 sú vhodné na celý rad experimentálnych prístupov vrátane obnovy fluorescencie po fotobleachingu (FRAP), fluorescenčnej korelačnej spektroskopie (FCS) a iných pokročilých mikroskopických techník. Tieto štúdie môžu poskytnúť pohľad na molekulárne mechanizmy jadrového transportu a prispieť k pochopeniu ochorení spojených s dysfunkciou jadrového transportu, ako sú niektoré druhy rakoviny a neurodegeneratívne poruchy.

Organism Krisy**Tissue** Obličky**Synonyms** NRK EGFP2-Nup50**Charakteristika****Breed/Subspecies** OsborneMendel**Morphology** Fibroblastom podobné bunky s fusiformným tvarom**Growth properties** Monovrstva, priliehajúca**Regulačné údaje****Citation** NRK-EGFP2-Nup50 (katalógové číslo Cytion 500726)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 10116

Bunky NRK-EGFP2-Nup50 | 500726**CellosaurusAccession** CVCL_AV93**Depositor** Ellenbergova laboratória (EMBL)**Biomolekulárne údaje****Receptors expressed** Epidermálny rastový faktor (EGF), aktivita stimulujúca množenie (MSA)**Protein expression** EGFP3-Nup50**Products** NUP50 (nukleoporín 50)**Spracovanie****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutamínu, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)**Supplements** Doplňte médium o 10 % FBS, 0,5 mg/ml G418**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Staré médium zlikvidujte a bunky premyte PBS. Pridajte čerstvo pripravený 0,025 % roztok trypsínu/0,02 % EDTA zahriaty na 37 °C a počkajte, kým sa bunky neoddelia, čo zvyčajne trvá asi 5 minút. Neutralizujte trypsín pridaním čerstvého média, potom zmes buniek preneste do skúmavky a odstreďte. Po odstredení odstráňte supernatant, resuspendujte bunkovú peletu v čerstvom kultivačnom médiu a suspenziou prelejte do nových fliaš. Do kultivačného média pridajte G418, aby ste dosiahli konečnú koncentráciu 0,5 mg/ml**Split ratio** Odporúča sa pomer 1:3 až 1:4**Seeding density** 2 až 4 x 10⁴ buniek/cm²**Fluid renewal** 2 až 3-krát týždenne**Freeze medium** Ako kryokonzervačné médium používame kompletne rastové médium (vrátane FBS) + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení alebo CM-1 (katalógové číslo 800100 spoločnosti Cytion), ktoré obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory na zlepšenie regenerácie a zníženie stresu spôsobeného kryom.

Bunky NRK-EGFP2-Nup50 | 500726**Thawing and
Culturing Cells**

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako -150 °C, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri 300 x g počas 3 minút, aby sa bunky oddelili, a opatrne zlikvidujte supernatant obsahujúci zvyšky zmrazovacieho média.
7. Pelet buniek jemne resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačného média. V prípade adherentných buniek rozdeľte suspenziu medzi dve kultivačné banky T25; v prípade suspenzných kultúr preneste všetko médium do jednej banky T25, aby ste podporili účinnú interakciu a rast buniek.
8. Dodržiavajte zavedené subkultivačné protokoly na nepretržitý rast a udržiavanie bunkovej línie, čím sa zabezpečia spoľahlivé výsledky experimentov.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žiadne

**Freezing
Procedure**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

**Shipping
Conditions**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Bunky NRK-EGFP2-Nup50 | 500726

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminácia mykoplazmami sa vylučuje pomocou testov založených na PCR a metód detekcie mykoplazmiem založených na luminiscencii.

Aby sa zabezpečilo, že nedošlo ku kontaminácii baktériami, hubami alebo kvasinkami, bunkové kultúry sa denne vizuálne kontrolujú.