

Bunky HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657**Všeobecné informácie****Description**

HK-CRISPR-Nup188-mEGFP je geneticky modifikovaná bunková línia HeLa Kyoto. Využíva technológiu CRISPR/Cas9 na integráciu mEGFP (monomérneho zosilneného zeleného fluorescenčného proteínu) do lokusu Nup188. Nup188 je kľúčový nukleoporínový proteín zapojený do komplexu jadrových pórov, ktorý je nevyhnutný na prenos molekúl medzi jadrom a cytoplazmou. Označenie mEGFP umožňuje vizualizáciu Nup188 v reálnom čase, čo pomáha pri štúdiu dynamiky a funkcie komplexu jadrových pórov.

Táto bunková línia je obzvlášť užitočná pre výskumníkov zameraných na jadrový transport a biológiu komplexu jadrových pórov. Jej fluorescenčné značenie umožňuje pozorovanie Nup188 za rôznych podmienok vrátane liečby liekmi a genetických modifikácií. Aplikácie zahŕňajú skrining s vysokým obsahom, zobrazovanie živých buniek a iné techniky založené na fluorescencii, ktoré poskytujú cenné poznatky o nukleocytoplazmatickom transporte a integrite jadrového obalu.

Organism

Ľudské

Tissue

Endocervix

Disease

Adenokarcinóm

Metastatic site

Neplatí (derivát HeLa Kyoto; primárne ložisko nádoru sa nachádza v endocervikálnej oblasti)

Applications

Biológia komplexu jadrových pórov (NPC); nukleocytoplazmatický transport; dynamika a funkcia proteínu Nup188; fluorescenčné zobrazovanie jadrovej membrány v živých bunkách; skrining s vysokým obsahom; validačné štúdie knock-in metódou CRISPR; hodnotenie inhibítorov jadrového transportu

Charakteristika**Age**

30 rokov

Gender

Ženy

Ethnicity

Afroameričan

Morphology

Epitelové bunky s mozaikovým tvarom kameňa

Cell type

Epitelové bunky

Growth properties

Adherent

Regulačné údaje

Bunky HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

Citation	HK-CRISPR-Nup188-mEGFP (katalógové číslo Cytion 300657)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Nepriadené (HK-CRISPR-Nup188-mEGFP je derivát buniek HeLa Kyoto modifikovaný pomocou CRISPR; rodičovská línia HeLa Kyoto CVCL_1922)
Depositor	Ellenbergova laboratória (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Táto línia HeLa Kyoto obsahuje CRISPR knock-in mEGFP v lokuse Nup188, čo umožňuje vizualizáciu dynamiky jadrového pórového lešenia. Táto klasifikácia platí len v Nemecku a môže sa líšiť v iných krajinách.

Biomolekulárne údaje

Protein expression	Nup188, mEGFP-tag
---------------------------	-------------------

Spracovanie

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutamínu, w: 3,7 g/l NaHCO ₃ , w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)
Supplements	Doplňte médium o 10 % FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Odstráňte staré médium z adherovaných buniek a premyte ich PBS, ktorý neobsahuje vápnik a horčík. Pre banky T25 použite 3 - 5 ml PBS a pre banky T75 použite 5 - 10 ml. Potom bunky úplne pokryte Accutase, pričom použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75. Nechajte bunky inkubovať pri izbovej teplote 8-10 minút, aby sa oddelili. Po inkubácii jemne premiešajte bunky s 10 ml média, aby boli znovu suspendované, a potom ich 3 minúty odstredíte pri 300xg. Supernatant zlikvidujte, bunky znovu rozmiešajte v čerstvom médiu a preneste ich do nových fliaš, ktoré už obsahujú čerstvé médium.
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 obnovy a zníženie stresu spôsobeného kryom.

Bunky HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657**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 HK-CRISPR-Nup188-mEGFP | 300657

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 a molekulárna analýza

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.