

Células HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575**Informações gerais****Description**

A linhagem celular HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 é um derivado geneticamente modificado das células HeLa Kyoto, conhecidas por sua robustez e ampla utilização em pesquisas científicas. Essa linha celular foi modificada utilizando a tecnologia CRISPR-Cas9 para expressar Nup358 marcado com mEGFP (proteína fluorescente verde aprimorada monomérica), um componente crucial do complexo de poros nucleares (NPC). A Nup358, também conhecida como RanBP2, desempenha um papel significativo no transporte nucleocitoplasmático, na montagem do fuso mitótico e em outros processos celulares. A marcação com mEGFP permite a visualização da Nup358, facilitando a observação em tempo real de sua dinâmica e interações dentro da célula.

As células HeLa Kyoto, uma sublinha das células HeLa originais, caracterizam-se por sua adaptabilidade e crescimento estável em cultura. O sistema CRISPR-Cas9 nessa linhagem celular permite a edição genômica precisa, garantindo que a marcação mEGFP seja fusionada com precisão à proteína Nup358 sem comprometer sua função. Isso torna a linhagem celular HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 uma ferramenta valiosa para o estudo dos aspectos estruturais e funcionais do complexo de poros nucleares. Os pesquisadores podem utilizar essa linhagem celular para obter insights sobre os mecanismos que regem o transporte nucleocitoplasmático e o papel da Nup358 na homeostase celular e em estados patológicos, como câncer e infecções virais.

Organism Humano**Tissue** Endocérvix**Disease** Adenocarcinoma**Características****Age** 30 anos**Gender** Mulher**Ethnicity** afro-americano**Morphology** Células de tipo epitelial com formato de pedra em mosaico**Growth properties** Aderente**Dados regulatórios****Citation** HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 (número de catálogo da Cytion 301575)

Células HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B7FS**Depositor** Laboratório Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Esta linhagem HeLa Kyoto contém uma marca mEGFP integrada por CRISPR no locus RanBP2/Nup358, permitindo a visualização dos filamentos citoplasmáticos do poro nuclear. Essa classificação se aplica apenas na Alemanha e pode ser diferente em outros países.**Dados biomoleculares****Products** EGFP (Proteína Fluorescente Verde Aprimorada)**Manuseio****Culture Medium** DMEM, p/v: 4,5 g/L de glicose, p/v: 4 mM de L-glutamina, p/v: 3,7 g/L de NaHCO₃, p/v: 1,0 mM de piruvato de sódio (número de artigo da Cytion 820300a)**Supplements** Adicione 10% de FBS ao meio**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Remova o meio antigo das células aderentes e lave-as com PBS sem cálcio nem magnésio. Para frascos T25, use 3 a 5 ml de PBS; para frascos T75, use 5 a 10 ml. Em seguida, cubra as células completamente com Accutase, utilizando 1 a 2 ml para frascos T25 e 2,5 ml para frascos T75. Deixe as células incubarem à temperatura ambiente por 8 a 10 minutos para que se desprendam. Após a incubação, misture delicadamente as células com 10 ml de meio para ressuspender, depois centrifugue a 300xg por 3 minutos. Descarte o sobrenadante, ressuspenda as células em meio fresco e transfira-as para novos frascos que já contenham meio fresco.**Fluid renewal** 2 a 3 vezes por semana**Freeze medium** Como meio de criopreservação, utilizamos meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% de DMSO para garantir viabilidade adequada após o descongelamento, ou CM-1 (número de catálogo da Cytion 800100), que inclui osmoprotetores e estabilizadores metabólicos otimizados para melhorar a recuperação e reduzir o estresse induzido pela criopreservação.

Células HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575

Thawing and Culturing Cells

1. Verifique se o frasco permanece profundamente congelado no momento da entrega, pois as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após o recebimento, armazene o criovial imediatamente a temperaturas abaixo de -150 °C para garantir a preservação da integridade celular ou prossiga para a etapa 3, caso seja necessária a cultura imediata.
3. Para cultura imediata, descongele rapidamente o frasco imergindo-o em um banho-maria a 37 °C com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente por 40 a 60 segundos até que reste apenas um pequeno pedaço de gelo.
4. Realize todas as etapas subsequentes em condições estéreis em uma cabine de fluxo, desinfetando o criovial com etanol a 70% antes de abri-lo.
5. Abra cuidadosamente o frasco desinfetado e transfira a suspensão celular para um tubo de centrifuga de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando delicadamente.
6. Centrifugue a mistura a 300 x g por 3 minutos para separar as células e descarte cuidadosamente o sobrenadante contendo o meio de congelamento residual.
7. Ressuspender suavemente o sedimento celular em 10 ml de meio de cultura fresco. Para células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; para culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 a fim de promover a interação e o crescimento celular eficazes.
8. Siga os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento contínuo e a manutenção da linhagem celular, garantindo resultados experimentais confiáveis.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5% de CO₂, atmosfera umidificada.

Shipping Conditions

As linhagens celulares criopreservadas são enviadas em gelo seco, em embalagens isoladas e validadas, com refrigerante suficiente para manter a temperatura em aproximadamente -78 °C durante todo o transporte. Ao receber a remessa, inspecione o recipiente imediatamente e transfira os frascos sem demora para o local de armazenamento adequado.

Storage Conditions

Para preservação a longo prazo, coloque os frascos em nitrogênio líquido em fase de vapor a uma temperatura entre aproximadamente -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como uma etapa intermediária de curta duração antes da transferência para o nitrogênio líquido.

Controle de Qualidade e Análise Molecular

Células HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575

Sterility

A contaminação por micoplasma é descartada por meio de ensaios baseados em PCR e de métodos de detecção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não haja contaminação por bactérias, fungos ou leveduras, as culturas celulares são submetidas a inspeções visuais diárias.