Product sheet

Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Обща информация

Description	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 е генетично модифицирана човешка остеосаркомна клетъчна линия, получена от родителския U2OS фон, в която ендогенният локус NUP133 е модифициран чрез CRISPR/Cas9-медиирано редактиране на генома, за да кодира C-терминален SNAPf таг. NUP133 е основен компонент на Y-комплекса (NUP107-160 комплекс), структурен субкомплекс, който е от съществено значение за сглобяването и поддържането на ядрения порен комплекс (NPC). Чрез въвеждането на SNAPf кодиращата последователност в рамката на ендогенния локус, фузионният протеин се експресира под естествен регулаторен контрол, запазвайки физиологичните нива на експресия и субклетъчната локализация. SNAPf тагът е вариант на SNAP-тага за бързо маркиране, инженерно създаден O6-алкилгуанин-ДНК алкилтрансфераза, който ковалентно реагира с бензилгуанин-конюгирани субстрати. Това позволява високоспецифично и гъвкаво флуоресцентно маркиране на Nup133 в живи или фиксирани клетки, използвайки клетъчнопроницаеми или непроницаеми SNAP субстрати. В U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 клетките, фузионният протеин се локализира в ядрената мембрана в характерния за ядрените пори комплекси пунктиран модел. Тъй като маркирането се извършва в ендогенния локус, стехиометрията и архитектурата на NPC са минимално нарушени, което прави този модел подходящ за количествена суперразделителна микроскопия, проследяване на единични молекули и кинетични анализи на сглобяването и обновяването на NPC. Тази клетъчна линия предоставя стабилна платформа за изучаване на ядрения транспорт, динамиката на нуклеоцитоплазмения трафик, биогенезата на NPC по време на интерфазата и постмитотичното ядрено прегрупиране, както и структурната организация на Y-комплекса в рамките на порестата скафолд. Фонът на U2OS предлага плоска морфология и големи ядра, което улеснява високоразделителното изображение. Клетките U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 са особено подходящи за експерименти с маркиране с импулсно проследяване, корелативна светлинна и електронна микроскопия и многоцветни изображения в комбинация с допълнителни ендогенно маркирани нуклеопорини или транспортни фактори.
Organism	Човек
Tissue	Bone
Disease	Остеосарком

Характеристики

Age	15 години
Gender	Жена
Ethnicity	Кавказки
Morphology	Подобни на епител

Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Growth properties	Придържащи се

Регулаторни данни

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (каталожен номер 300666 на Cytion)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Лабораторията на Елънбърг (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Тази човешка клетъчна линия на остеосарком (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) съдържа CRISPR-въведен синтез SNAPf-Nup133, който позволява флуоресцентно маркиране на нуклеопорина Nup133. Вмъкването е стабилно. Тази класификация се прилага само в Германия и може да се различава в други страни.

Биомолекулярни данни

Protein expression	Nup133, SNAPf-таг

Работа с

Culture Medium	McCoys 5a, w: 3,0 g/L глюкоза, w: стабилен глутамин, w: 2,0 mM натриев пируват, w: 2,2 g/L NaHCO3 (номер на статията в Cytion 820200a)
Supplements	Допълнете средата с 10% FBS, 3,0 g/L глюкоза, стабилен глутамин, 2,0 mM натриев пируват, 2,2 g/L NaHCO3, 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Отстранете старата среда от адхезивните клетки и ги промийте с PBS, която не съдържа калций и магнезий. За колби T25 използвайте 3-5 ml PBS, а за колби T75 - 5-10 ml. След това покрийте клетките изцяло с Accutase, като използвате 1-2 ml за колби T25 и 2,5 ml за колби T75. Оставете клетките да се инкубират на стайна температура за 8-10 минути, за да се отделят. След инкубацията внимателно разбъркайте клетките с 10 ml среда, за да ги ресуспендирате, след което центрофугирайте при 300xg за 3 минути. Изхвърлете супернатантата, ресуспендирайте клетките в прясна среда и ги прехвърлете в нови колби, които вече съдържат прясна среда.

Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Freeze medium	Като среда за криоконсервация използваме пълна среда за растеж (включително FBS) + 10% DMSO за адекватна жизнеспособност след размразяване или CM-1 (каталожен номер 800100 на Cytion), която включва оптимизирани осмопротектори и метаболитни стабилизатори за подобряване на възстановяването и намаляване на криоиндуцирания стрес.

Thawing and Culturing Cells

1. Уверете се, че флаконът остава дълбоко замразен при доставката, тъй като клетките се транспортират със сух лед, за да се поддържат оптимални температури по време на транспортирането.

2. При получаване или съхранявайте незабавно криовиолата при температури под -150 °C, за да осигурите запазване на клетъчната цялост, или преминете към стъпка 3, ако е необходимо незабавно култивиране.

3. За незабавно култивиране бързо размразете флакона, като го потопите във водна баня с чиста вода и антимикробен агент с температура 37 °C, като разбърквате внимателно в продължение на 40-60 секунди, докато остане малка ледена бучка.

4. Извършвайте всички следващи стъпки при стерилни условия в аспиратор, като преди отваряне дезинфекцирате криовиолата със 70% етанол.

5. Внимателно отворете дезинфекцирания флакон и прехвърлете клетъчната суспензия в 15 ml центрофужна епруветка, съдържаща 8 ml хранителна среда със стайна температура, като разбъркате внимателно.

6. Центрофугирайте сместа при 300 x g в продължение на 3 минути, за да отделите клетките, и внимателно изхвърлете супернатантата, съдържаща остатъчна замразяваща среда.

7. Внимателно ресуспендирайте клетъчната пелета в 10 ml прясна хранителна среда. За адхезивни клетки разделете суспензията между две колби T25; за суспензионни култури прехвърлете цялата среда в една колба T25, за да стимулирате ефективното взаимодействие и растеж на клетките.

8. Придържайте се към установените протоколи за субкултивиране за непрекъснат растеж и поддържане на клетъчната линия, като гарантирате надеждни експериментални резултати.

Incubation Atmosphere	37°C, 5%$_{CO2}$, овлажнена атмосфера.

Flask Coating

За оптимално прикрепване и жизнеспособност след размразяване препоръчваме да се използват **колби или плаки с колагеново покритие**.

Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Freezing Procedure	Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78 °C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.
Shipping Conditions	Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78 °C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.
Storage Conditions	За дълготрайно съхранение поставете флаконите в течен азот в парна фаза при температура около -150 до -196 °C. Съхранението при -80 °C е приемливо само като кратък междинен етап преди прехвърлянето в течен азот.

Контрол на качеството / Генетичен профил / HLA

Sterility	Замърсяването с микоплазма се изключва както чрез PCR-базирани анализи, така и чрез луминесцентни методи за откриване на микоплазма. За да се гарантира, че няма бактериално, гъбично или дрождево замърсяване, клетъчните култури се подлагат на ежедневни визуални проверки.