

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler | 300666

General information

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 er en genetisk manipuleret human osteosarkomcellelinje afledt af den oprindelige U2OS-baggrund, hvor det endogene NUP133-lokus er blevet modificeret ved hjælp af CRISPR/Cas9-medieret genomredigering for at kode for et C-terminalt SNAPf-tag. NUP133 er en kernekomponent i Y-komplekset (NUP107-160-komplekset), et strukturelt subkompleks, der er essentielt for samling og vedligeholdelse af nukleare porekomplekser (NPC). Ved at indføre SNAPf-kodningssekvensen in-frame på det endogene locus udtrykkes fusionsproteinet under naturlig regulatorisk kontrol, hvilket bevarer fysiologiske ekspressionsniveauer og subcellulær lokalisering.

SNAPf-tagget er en hurtigt mærkende variant af SNAP-tagget, et konstrueret O6-alkylguanin-DNA-alkyltransferase, der reagerer kovalent med benzylguanin-konjugerede substrater. Dette muliggør en meget specifik og alsidig fluorescerende mærkning af Nup133 i levende eller fiksede celler ved hjælp af cellepermeable eller impermeable SNAP-substrater. I U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler lokaliseres fusionsproteinet til kernehinden i et punktformet mønster, der er karakteristisk for kerneporekomplekser. Da mærkningen finder sted på det endogene locus, forstyrres NPC-støkiometrien og -arkitekturen minimalt, hvilket gør denne model velegnet til kvantitativ superopløsningsmikroskopi, sporing af enkeltmolekyler og kinetiske analyser af NPC-samling og -omsætning.

Denne cellelinje udgør en robust platform for studier af nuklear transport, nukleocytoplasmatiske trafikdynamik, NPC-biogenese under interfase og postmitotisk nuklear genopbygning samt strukturel organisering af Y-komplekset inden for porestativet. U2OS-baggrunden tilbyder flad morfologi og store kerner, hvilket letter højopløsningsbilleddannelse. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler er særligt velegnede til puls-chase-mærkningsforsøg, korrelativ lys- og elektronmikroskopi og flerfarvede billedannelsesmetoder i kombination med yderligere endogent mærkede nukleoporiner eller transportfaktorer.

Organism Menneske

Tissue Knogle

Disease Osteosarkom

Karakteristika

Age 15 år

Gender Kvinde

Ethnicity Kaukasisk

Morphology Epitel-lignende

Growth properties Vedhæftende

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler | 300666

Regulatoriske data

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytion katalognummer 300666)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Denne humane osteosarkomcellelinje (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) indeholder en CRISPR-introduceret SNAPf-Nup133-fusion, der muliggør fluorescensmærkning af Nup133-nukleoporinet. Indsatsen er stabilt til stede. Denne klassificering gælder kun i Tyskland og kan variere andre steder.

Biomolekylære data

Protein expression	Nup133, SNAPf-tag
---------------------------	-------------------

Håndtering

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glukose, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytion artikelnummer 820200a)
Supplements	Suppler mediet med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1 % NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Fjern det gamle medium fra de klæbende celler, og vask dem med PBS, der ikke indeholder calcium og magnesium. Brug 3-5 ml PBS til T25-kolber og 5-10 ml til T75-kolber. Dæk derefter cellerne helt med Accutase, brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber. Lad cellerne inkubere ved stuetemperatur i 8-10 minutter for at løsne dem. Efter inkubationen blandes cellerne forsigtigt med 10 ml medium for at resuspendere dem, og centrifugeres derefter ved 300xg i 3 minutter. Kassér supernatanten, resuspendere cellerne i frisk medium, og overfør dem til nye kolber, der allerede indeholder frisk medium.
Freeze medium	Som kryopræservesmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmobeskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryo-induceret stress.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler | 300666

Thawing and Culturing Cells

1. Bekræft, at hætteglasset forbliver dybfrosset ved levering, da cellerne sendes på tøris for at opretholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved modtagelsen skal du enten straks opbevare kryohætteglasset ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at sikre, at cellernes integritet bevares, eller gå videre til trin 3, hvis øjeblikkelig dyrkning er påkrævet.
3. Ved øjeblikkelig dyrkning optøs hætteglasset hurtigt ved at nedsænke det i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vandbad med rent vand og et antimikrobielt middel og røre forsigtigt i 40-60 sekunder, indtil der kun er en lille isklump tilbage.
4. Udfør alle efterfølgende trin under sterile forhold i en flowhætte, og desinficer kryovialet med 70 % ethanol, før det åbnes.
5. Åbn forsigtigt det desinficerede hætteglas, og overfør cellesuspensionen til et 15 ml centrifugerør, der indeholder 8 ml kulturmedium ved stuetemperatur, og bland forsigtigt.
6. Centrifuger blandingen ved $300 \times g$ i 3 minutter for at adskille cellerne, og kassér omhyggeligt supernatanten, der indeholder resterende frysemedium.
7. Resuspender forsigtigt cellepelleten i 10 ml frisk dyrkningsmedium. For klæbende celler deles suspensionen mellem to T25-kulturkolber; for suspensionskulturer overføres alt mediet til en T25-kolbe for at fremme effektiv celleinteraktion og -vækst.
8. Overhold etablerede subkulturprotokoller for fortsat vækst og vedligeholdelse af cellelinjen, hvilket sikrer pålidelige eksperimentelle resultater.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , befugtet atmosfære.

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

Shipping Conditions

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler | 300666

Storage Conditions

For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

Kvalitetskontrol / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder.

For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.