

Κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Γενικές πληροφορίες

Description

Το U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 είναι μια γενετικά τροποποιημένη ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος που προέρχεται από κύτταρα U2OS, στα οποία το ενδογενές γονίδιο SEH1L (SEH1) έχει τροποποιηθεί χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR/Cas9 για να κωδικοποιήσει μια ετικέτα SNAPf εντός πλαισίου. Το SEH1 είναι ένα συστατικό του συμπλέγματος Υ (γνωστού και ως σύμπλεγμα NUP107-160), ενός βασικού δομικού στοιχείου του συμπλέγματος πυρηνικών πόρων (NPC) που συμβάλλει στη συναρμολόγηση και τη σταθερότητα του σκελετού των πόρων. Με την εισαγωγή της αλληλουχίας κωδικοποίησης SNAPf στον ενδογενή τόπο, η σημασμένη πρωτεΐνη SEH1 εκφράζεται υπό φυσιολογικό ρυθμιστικό έλεγχο, διατηρώντας τα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης και ελαχιστοποιώντας τις διαταραχές στη σύνθεση των πυρηνικών πόρων.

Η ετικέτα SNAPf είναι μια τροποποιημένη, ταχείας αντίδρασης παραλλαγή της ετικέτας SNAP που συνδέεται ομοιοπολικά με υποστρώματα συζευγμένα με βενζυλογουανίνη, επιτρέποντας επιλεκτική και σταθερή φθορίζουσα σήμανση σε ζωντανά ή σταθερά κύτταρα. Στα κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1, η πρωτεΐνη σύντηξης εντοπίζεται στο πυρηνικό περίβλημα με ένα χαρακτηριστικό διάσπαρτο μοτίβο που είναι χαρακτηριστικό της κατανομής του NPC. Επειδή η σήμανση πραγματοποιείται σε ενδογενή επίπεδα πρωτεΐνης, αυτό το σύστημα είναι κατάλληλο για ποσοτική φθορίζουσα μικροσκοπία, απεικόνιση υπερ-ανάλυσης και αναλύσεις παρακολούθησης μεμονωμένων σωματιδίων με στόχο την ανάλυση της οργάνωσης και της στοιχειομετρίας των NPC. Η επίπεδη μορφολογία και οι μεγάλοι πυρήνες των κυττάρων U2OS διευκολύνουν περαιτέρω την απεικόνιση υψηλής ανάλυσης των δομών του πυρηνικού περιβλήματος.

Το SEH1 συμμετέχει στη βιογένεση των NPC και έχει επίσης εμπλακεί σε διαδικασίες που σχετίζονται με τον κινητόχορο κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Κατά συνέπεια, αυτή η κυτταρική σειρά παρέχει μια ισχυρή πλατφόρμα για τη διερεύνηση της εξαρτώμενης από τον κυτταρικό κύκλο συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης των NPC, της χωρικής οργάνωσης του συμπλέγματος Υ εντός του πλέγματος των πόρων και των πιθανών διπλών ρόλων του SEH1 στο πυρηνικό περίβλημα και στους μιτωτικούς κινητόχορους. Το U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 επιτρέπει τη διεξαγωγή μηχανιστικών μελετών της αρχιτεκτονικής και της δυναμικής των πυρηνικών πόρων υπό φυσιολογικά σχετικές συνθήκες έκφρασης.

Organism Ανθρώπινο

Tissue Οστά

Disease Οστεοσάρκωμα

Χαρακτηριστικά

Age 15 χρόνια

Gender Γυναίκα

Ethnicity Καυκάσιος

Morphology Επιθηλιοειδής

Κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Growth properties Προσκολλημένο

Ρυθμιστικά δεδομένα

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (αριθμός καταλόγου Cytion 300664)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Εργαστήριο Ellenberg (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Αυτή η ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) περιέχει μια σύντηξη SNAPf-SEH1 με τη μεσολάβηση CRISPR που επιτρέπει την επιλεκτική επισήμανση της νουκλεοπορίνης SEH1. Η τροποποίηση είναι σταθερά παρούσα. Η ταξινόμηση αυτή ισχύει μόνο εντός της Γερμανίας και ενδέχεται να διαφέρει αλλού.

Βιομοριακά δεδομένα

Protein expression SEH1, SNAPf-tag

Χειρισμός

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/L γλυκόζη, w: σταθερή γλουταμίνη, w: 2,0 mM πυρροβικό νάτριο, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (αριθμός άρθρου Cytion 820200a)

Supplements Συμπληρώστε το μέσο με 10% FBS, 3,0 g/L γλυκόζη, σταθερή γλουταμίνη, 2,0 mM πυρροβικό νάτριο, 2,2 g/L NaHCO₃, 1% NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Αφαιρέστε το παλιό μέσο από τα προσκολλημένα κύτταρα και πλύντε τα με PBS που δεν περιέχει ασβέστιο και μαγνήσιο. Για φιάλες T25, χρησιμοποιήστε 3-5 ml PBS και για φιάλες T75, χρησιμοποιήστε 5-10 ml. Στη συνέχεια, καλύψτε πλήρως τα κύτταρα με Accutase, χρησιμοποιώντας 1-2 ml για φιάλες T25 και 2,5 ml για φιάλες T75. Αφήστε τα κύτταρα να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 8-10 λεπτά για να αποκολληθούν. Μετά την επώαση, αναμείξτε απαλά τα κύτταρα με 10 ml μέσου για να ανασυσταθούν και, στη συνέχεια, φυγοκεντρίστε στα 300xg για 3 λεπτά. Απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό, ανασυστάστε τα κύτταρα σε φρέσκο μέσο και μεταφέρετέ τα σε νέες φιάλες που περιέχουν ήδη φρέσκο μέσο.

Κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Freeze medium**

Ως μέσο κρυοσυντήρησης, χρησιμοποιούμε πλήρες μέσο ανάπτυξης (συμπεριλαμβανομένου του FBS) + 10% DMSO για επαρκή βιωσιμότητα μετά την απόψυξη, ή CM-1 (αριθμός καταλόγου Cytion 800100), το οποίο περιλαμβάνει βελτιστοποιημένα ωσμοπροστατευτικά και μεταβολικούς σταθεροποιητές για την ενίσχυση της ανάκαμψης και τη μείωση του στρες που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση.

Thawing and Culturing Cells

1. Επιβεβαιώστε ότι το φιαλίδιο παραμένει βαθιά παγωμένο κατά την παράδοση, καθώς τα κύτταρα αποστέλλονται σε ξηρό πάγο για να διατηρούνται οι βέλτιστες θερμοκρασίες κατά τη μεταφορά.
2. Κατά την παραλαβή, είτε αποθηκεύστε το κρυοφιαλίδιο αμέσως σε θερμοκρασίες κάτω των -150°C για να διασφαλίσετε τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας, είτε προχωρήστε στο βήμα 3 εάν απαιτείται άμεση καλλιέργεια.
3. Για άμεση καλλιέργεια, αποψύξτε γρήγορα το φιαλίδιο βυθίζοντάς το σε υδατόλουτρο 37°C με καθαρό νερό και αντιμικροβιακό παράγοντα, αναδεύοντας απαλά για 40-60 δευτερόλεπτα μέχρι να παραμείνει ένα μικρό σβόλο πάγου.
4. Εκτελέστε όλα τα επόμενα βήματα υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε απορροφητήρα ροής, απολυμαίνοντας το κρυοφιαλίδιο με 70% αιθανόλη πριν από το άνοιγμα.
5. Ανοίξτε προσεκτικά το απολυμασμένο φιαλίδιο και μεταφέρετε το εναιώρημα των κυττάρων σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης των 15 ml που περιέχει 8 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε θερμοκρασία δωματίου, αναμειγνύοντας απαλά.
6. Φυγοκεντρίστε το μείγμα στα $300 \times g$ για 3 λεπτά για να διαχωριστούν τα κύτταρα και απορρίψτε προσεκτικά το υπερκείμενο που περιέχει το υπόλοιπο μέσο κατάψυξης.
7. Επανασυσσωματώστε απαλά το κυτταρικό σφαιρίδιο σε 10 ml φρέσκου μέσου καλλιέργειας. Για προσκολλημένα κύτταρα, μοιράστε το εναιώρημα σε δύο φιάλες καλλιέργειας T25- για καλλιέργειες εναιωρήματος, μεταφέρετε όλο το μέσο σε μία φιάλη T25 για να προωθήσετε την αποτελεσματική αλληλεπίδραση και ανάπτυξη των κυττάρων.
8. Τηρείτε τα καθιερωμένα πρωτόκολλα υποκαλλιέργειας για τη συνεχή ανάπτυξη και διατήρηση της κυτταρικής σειράς, εξασφαλίζοντας αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , υγραποιημένη ατμόσφαιρα.

Flask Coating

Κανένα

Κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Freezing Procedure

Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78°C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

Shipping Conditions

Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78°C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

Storage Conditions

Για μακροχρόνια συντήρηση, τοποθετήστε τα φιαλίδια σε υγρό άζωτο σε φάση ατμών σε θερμοκρασία περίπου -150 έως -196°C . Η αποθήκευση στους -80°C είναι αποδεκτή μόνο ως σύντομο ενδιάμεσο βήμα πριν από τη μεταφορά σε υγρό άζωτο.

Ποιοτικός έλεγχος / Γενετικό προφίλ / HLA

Sterility

Η μόλυνση από μυκόπλασμα αποκλείεται με τη χρήση τόσο των δοκιμασιών που βασίζονται στην PCR όσο και των μεθόδων ανίχνευσης μυκοπλάσματος με βάση τη φωταύγεια.

Για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει μόλυνση από βακτήρια, μύκητες ή ζύμες, οι κυτταροκαλλιέργειες υποβάλλονται σε καθημερινές οπτικές επιθεωρήσεις.