

Κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Γενικές πληροφορίες

Description

Το U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 είναι μια γενετικά τροποποιημένη ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος που προέρχεται από το γονικό υπόβαθρο U2OS, στο οποίο ο ενδογενής τόπος NUP133 έχει τροποποιηθεί χρησιμοποιώντας γονιδιακή επεξεργασία με τη μεσολάβηση CRISPR/Cas9 για την κωδικοποίηση μιας ετικέτας SNAPf C-τερματικού άκρου. Το NUP133 είναι ένα βασικό συστατικό του συμπλέγματος Y (σύμπλεγμα NUP107-160), ενός δομικού υποσυμπλέγματος που είναι απαραίτητο για τη συναρμολόγηση και τη συντήρηση του συμπλέγματος πυρηνικών πόρων (NPC). Με την εισαγωγή της αλληλουχίας κωδικοποίησης SNAPf στο ενδογενές locus, η πρωτεΐνη σύντηξης εκφράζεται υπό φυσιολογικό ρυθμιστικό έλεγχο, διατηρώντας τα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης και την υποκυτταρική εντόπιση.

Η ετικέτα SNAPf είναι μια παραλλαγή ταχείας επισήμανσης της ετικέτας SNAP, μιας μηχανικής O6-αλκυλογουανίνη-DNA αλκυλτρανσφεράσης που αντιδρά ομοιοπολικά με υποστρώματα συζευγμένα με βενζυλογουανίνη. Αυτό επιτρέπει την εξαιρετικά ειδική και ευέλικτη φθορίζουσα επισήμανση του Nup133 σε ζωντανά ή σταθερά κύτταρα χρησιμοποιώντας υποστρώματα SNAP διαπερατά ή αδιαπεράστα από τα κύτταρα. Στα κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, η πρωτεΐνη σύντηξης εντοπίζεται στο πυρηνικό περιβλήμα με ένα χαρακτηριστικό διάστικτο μοτίβο των πυρηνικών πόρων. Επειδή η σήμανση πραγματοποιείται στον ενδογενή τόπο, η στοιχειομετρία και η αρχιτεκτονική των NPC διαταράσσονται ελάχιστα, καθιστώντας αυτό το μοντέλο κατάλληλο για ποσοτική μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης, παρακολούθηση μορίων και κινητικές αναλύσεις της συναρμολόγησης και της ανανέωσης των NPC.

Αυτή η κυτταρική σειρά παρέχει μια ισχυρή πλατφόρμα για τη μελέτη της πυρηνικής μεταφοράς, της δυναμικής της πυρηνικοκυτταρικής κυκλοφορίας, της βιογένεσης NPC κατά τη διάρκεια της μεσοφάσης και της μεταμιτωτικής πυρηνικής ανασυγκρότησης, καθώς και της δομικής οργάνωσης του συμπλέγματος Y εντός του πλέγματος πόρων. Το υπόβαθρο U2OS προσφέρει επίπεδη μορφολογία και μεγάλους πυρήνες, διευκολύνοντας την απεικόνιση υψηλής ανάλυσης. Τα κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για πειράματα σήμανσης pulse-chase, συσχετιστική μικροσκοπία φωτός και ηλεκτρονίων, και προσεγγίσεις πολύχρωμης απεικόνισης σε συνδυασμό με επιπλέον ενδογενώς σημασμένες νουκλεοπρωτεΐνες ή παράγοντες μεταφοράς.

Organism Ανθρώπινο

Tissue Οστά

Disease Οστεοσάρκωμα

Χαρακτηριστικά

Age 15 χρόνια

Gender Γυναίκα

Ethnicity Καυκάσιος

Morphology Επιθηλιοειδής

Κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Growth properties Προσκολλημένο

Ρυθμιστικά δεδομένα

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (αριθμός καταλόγου Cytion 300666)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Εργαστήριο Ellenberg (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Αυτή η ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) περιέχει μια σύντηξη SNAPf-Nup133 που έχει εισαχθεί με CRISPR, επιτρέποντας τη φθορίζουσα σήμανση της νουκλεοπορίνης Nup133. Το ένθεμα είναι σταθερά παρόν. Αυτή η ταξινόμηση ισχύει μόνο εντός της Γερμανίας και ενδέχεται να διαφέρει αλλού.

Βιομοριακά δεδομένα

Protein expression Nup133, 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-Nup133 | 300666**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-Nup133 | 300666

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.