Product sheet

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. Το NUP133 είναι ένα βασικό συστατικό του συμπλέγματος Y (σύμπλεγμα NUP107-160), ενός δομικού υποσυμπλέγματος απαραίτητου 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 εντοπισμό. 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 αδιαπέραστα από τα κύτταρα. Στα κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, η πρωτεΐνη σύντηξης εντοπίζεται στο πυρηνικό περίβλημα 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 μετα-μιτωτικής 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, καθώς και προσεγγίσεις πολύχρωμης απεικόνισης σε συνδυασμό με επιπλέον ενδογενώς σημασμένες νουκλεοπ
Organism	Ανθρώπινο
Tissue	Οστά
Disease	Οστεοσάρκωμα
Metastatic site	Θέση πρωτογενούς όγκου (οστό)
Applications	Βιολογία του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων (NPC)· Αρχιτεκτονική του συμπλέγματος Nup133/Y· βιογένεση του NPC· πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά· μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης (STORM/PALM/STED)· παρακολούθηση μεμονωμένων σωματιδίων· σήμανση SNAP με τη μέθοδο pulse-chase· συσχετιστική οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία· ποσοτική στοιχειομετρία του NPC

Χαρακτηριστικά

Age	15 χρόνια

Κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Gender	Γυναίκα
Ethnicity	Καυκάσιος
Morphology	Επιθηλιοειδής
Cell type	Επιθηλιακά κύτταρα (οστεοσάρκωμα)
Growth properties	Προσκολλημένο

Ρυθμιστικά δεδομένα

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (αριθμός καταλόγου Cytion 300666)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Δεν έχει αποδοθεί (παράγωγο U2OS τροποποιημένο με CRISPR· γονικό U2OS CVCL_0042)
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 πυρουβικό 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 πυρουβικό νάτριο, 2,2 g/L NaHCO3, 1% NEAA

Κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	περίπου 24 έως 36 ώρες
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.
Split ratio	1 έως 3
Seeding density	1 έως 3 × 10^4 κύτταρα/cm^2
Fluid renewal	2 έως 3 φορές την εβδομάδα
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.

Κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

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 x 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%$_{CO2}$, υγροποιημένη ατμόσφαιρα.
Flask Coating	Κανένα
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.

Κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

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.

Έλεγχος ποιότητας και μοριακή ανάλυση

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.