

U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple rakud | 300461

Üldine teave

Description

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple on geneetiliselt muundatud osteosarkoomi rakuliin, mis on saadud inimese U-2 OS rakuliinist, mis on tuntud oma tugevate kasvuomaduste ja kasulikkuse poolest erinevates bioloogilistes uuringutes. Seda konkreetset kloonit on muudetud CRISPR/Cas9 geenitöötlustehnoloogia abil, et lisada NUP96 geenile mMaple, mis on fotokonverteeritav fluorestseeruv valk. Valk mMaple võimaldab kasutada täiustatud pildistamismeetodeid, nagu elusraku pildistamine ja superresolutsioonimikroskopeerimine, andes dünaamilise ülevaate tuumapoorikompleksi (NPC) käitumisest ja raku impordi-ekspordimehhanismidest läbi tuumakesta.

NUP96 geen, mis kodeerib NPC olulist komponenti, on oluline nukleotsütoplasma transpordiks. NUP96 muutmine võib mõjutada mitte ainult transpordimehhanisme, vaid ka üldist tuumaarhitektuuri ja -funktsiooni. Seega on see rakuliin suurepärane mudel NPCga seotud patoloogiate ja tuuma transpordi rolli uurimiseks raku metabolismis ja signaalimisel. mMaple integreerimine NUP96-sse võimaldab NUP96 dünaamika reaalsajas jälgimist ja visualiseerimist in vivo, muutes selle asendamatuks vahendiks rakutuuma uuringutele keskendunud teadlastele ja neile, kes uurivad NPC düsfunktsioonide mõju sellistes haigustes nagu vähk ja viirusinfektsioonid.

Spetsiaalse vahendina toetab U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple kloon nr.16 kõrge eraldusvõimega pildistamist ja annab olulisi andmeid NPC komponentide ruumilise ja ajalise jaotumise kohta. See on eriti väärtuslik katsete jaoks, mis nõuavad geeniekspressiooni, valkude lokaliseerimise ja tuuma transpordi üksikasjalikku analüüsi füsioloogilistes ja patoloogilistes tingimustes, hõlbustades rakuliste protsesside sügavamalt mõistmist molekulaarsel tasandil.

Organism	Inimene
Tissue	Bone
Disease	Osteosarkoom

Omadused

Age	15 aastat
Gender	Naised
Ethnicity	Kaukaasia
Growth properties	Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

Citation	U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple (Cytioni katalooginumber 300461)
-----------------	---

U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple rakud | 300461

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B7FK**Depositor** Ellenbergi labor (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: See inimese osteosarkoomi rakuliin (U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple, kloon 16) sisaldab CRISPR-vahendatud NUP96-mMaple-fusiooni, mis võimaldab tuumapooride struktuuride fotokonverteeritavat märgistamist. Konstruksioon on stabiilselt olemas. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.**Biomolekulaarsed andmed****Protein expression** NUP96-mMaple (endogeenne tuumapoorikompleksi valk 96, mMaple-märgistatud)**Töötlemine****Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/L glükoos, w: stabiilne glutamiin, w: 2,0 mM naatriumpüruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (Cytioni artikli number 820200a)**Supplements** Täiendada söötme 10% FBS-ga, 1% NEAA-ga**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Eemaldage kleepunud rakkudel vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspenseerida, seejärel tsentrifuugige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.**Seeding density** 1×10^4 rakku/cm²**Fluid renewal** 2 kuni 3 korda nädalas**Freeze medium** Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple rakud | 300461**Thawing and
Culturing Cells**

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viali kiiresti, kastes selle $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud viali ettevaatlikult ja viige raku suspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu $300 \times g$ juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

**Incubation
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , niisutatud atmosfäär.

Flask Coating

Puudub

**Freezing
Procedure**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

**Shipping
Conditions**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple rakud | 300461

Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA

Sterility

Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminesentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.