

U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP rakud | 300174

Üldine teave

Description

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP on geneetiliselt muundatud rakuliin, mis on saadud inimese osteosarkoomi U-2 OS vanemliinist. See rakuliin sisaldab monomeerse tõhustatud rohelise fluorestseeruva valguga (mEGFP) sildi sihipärasest sisestamisest NUP96 geeni lokaali, mis saavutati CRISPR-Cas9 geenitöötlustehnoloogia abil. NUP96, mis on osa tuumapoorikompleksist, on oluline tuuma transportimiseks ja selle fusioon mEGFP-ga võimaldab tuumapooride dünaamikat reaajas visualiseerida fluorestseeriva mikroskoopia abil, andes väärtuslikke teadmisi tuuma transpordimehhanismidest ja nukleotsütoplasmlisest liikumisest.

See konkreetne kloon, numbriga 195, on valitud NUP96-mEGFP-fusionivalgu stabiilse ekspressiooni tõttu ja säilitab U-2 OS liinile iseloomulikud omadused, sealhulgas tugeva tsütoskeleti struktuuri, mis on oluline vähirakkude migratsiooni ja metastaasiga seotud uuringutes. CRISPR-tehnoloogia kasutamine tagab täpse geenitöötluste, mis vähendab sihtmärgist kõrvalekaldeid, mis võivad ohustada katsetulemuste terviklikkust. See muudab U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP klooni nr 195 eriti kasulikuks kõrge resolutsiooniga pildistamismeetodite ja üksikasjalike rakuarhitektuuri uuringute jaoks, aidates kaasa rakubioloogia, vähiuuringute ja tuuma transpordi nähtuste kõrgetasemeliste uuringutele.

Organism Inimene

Tissue Bone

Disease Osteosarkoom

Omadused

Age 15 aastat

Gender Naised

Ethnicity Kaukaasia

Morphology Epiteelilaadsed

Growth properties Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

Citation U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP kloon nr 195 (Cytioni katalooginumber 300174)

Biosafety level 1

U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP rakud | 300174

NCBI_TaxID 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B7FJ**Depositor** Ellenbergi labor (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: See inimese osteosarkoomi rakuliin (U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP, kloon 195) sisaldab CRISPR-i abil loodud NUP96-mEGFP-fusiooni, mis on viidud sisse lentiviiruse abil, võimaldades tuumapoorikomplekside fluorestseerivat jälgimist. Modifikatsioon on stabiilselt integreeritud. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

Biomolekulaarsed andmed

Protein expression MEGFP (tuumapoorikompleksi valk 96, mEGFP-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 rakkudelt 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 tsentrifugeerige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.**Seeding density** 2 kuni 3×10^4 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-mEGFP rakud | 300174**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-mEGFP rakud | 300174

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.