

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 rakud | 300666

Üldine teave

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 on geneetiliselt muundatud inimese osteosarkoomi rakuliin, mis on saadud vanemlikust U2OS-taustast, kus endogeenne NUP133-lokus on muundatud CRISPR/Cas9-vahendatud genoomi redigeerimise abil, et kodeerida C-terminaalne SNAPf-märgis. NUP133 on Y-kompleksi (NUP107-160 kompleks) keskne komponent, struktuuriline alakompleks, mis on oluline tuumapooride kompleksi (NPC) kokkupanekuks ja säilitamiseks. SNAPf kodeeriva järjestuse sisseviimisega endogeensesse lokusesse ekspresseeritakse fusioonvalku loomuliku regulatsiooni kontrolli all, säilitades füsioloogilised ekspresioonitasemed ja subtsellulaarse lokaliseerumise.

SNAPf-märgis on SNAP-märgise kiire märgistamise variant, mis on inseneereeritud O6-alküülguanin-DNA alküültransferaas, mis reageerib kovalentselt bentsüülguaniniga konjugeeritud substraatidega. See võimaldab Nup133 väga spetsiifilist ja mitmekülgset fluorestsentsmärgistamist elusates või fikseeritud rakkudes, kasutades rakkudele läbilaskvaid või läbilaskmatuid SNAP-substraate. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 rakkudes lokaliseerub fusioonvalk tuumaümbrise punktide muustrina, mis on iseloomulik tuumapooride kompleksidele. Kuna märgistamine toimub endogeenses lokuses, on NPC stoikiomeetria ja arhitektuur minimaalselt häiritud, mistõttu see mudel sobib kvantitatiivseks superresolutsioonilise mikroskoopia, ühe molekuli jälgimise ja NPC kokkupaneku ja käibe kineetilise analüüsi jaoks.

See rakuliin pakub tugevat platvormi tuuma transpordi, tuuma-tsütoplasma liikumise dünaamika, NPC biogeneesi interfase ja postmitotilise tuuma taaskoostumise ning Y-kompleksi struktuurilise korralduse uurimiseks pooride raamistikus. U2OS taust pakub siledat morfoloogiat ja suuri tuumi, mis hõlbustab kõrge resolutsiooniga pildistamist. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 rakud sobivad eriti hästi impulss-jälgimise märgistamise eksperimentideks, korrelatiivseks valgus- ja elektronmikroskoopiasseks ning mitmevärviliseks pildistamiseks kombinatsioonis täiendavate endogeenselt märgistatud nukleoporiinide või transportfaktoritega.

Organism Inimene

Tissue Bone

Disease Osteosarkoom

Metastatic site Esmane kasvaja asukoht (luu)

Applications Tuumapoorikompleksi (NPC) bioloogia; Nup133/Y-kompleksi arhitektuur; NPC biogenees; tuuma-tsütoplasma transport; ülitäpne mikroskoopia (STORM/PALM/STED); üksikpartikli jälgimine; pulse-chase SNAP-märgistamine; korrelatiivne valgus- ja elektronmikroskoopia; kvantitatiivne NPC stoikiomeetria

Omadused

Age 15 aastat

Gender Naised

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 rakud | 300666

Ethnicity	Kaukaasia
Morphology	Epiteelilaadsed
Cell type	Epiteelrakud (osteosarkoom)
Growth properties	Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytioni katalooginumber 300666)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Määramata (CRISPR-ga modifitseeritud U2OS-derivaat; algne U2OS CVCL_0042)
Depositor	Ellenbergi labor (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: See inimese osteosarkoomi rakuliin (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) sisaldab CRISPR-ga sissetoodud SNAPf-Nup133-fusiooni, mis võimaldab Nup133-nukleoporiini fluorestseerivat märgistamist. Insert on stabiilselt olemas. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

Biomolekulaarsed andmed

Protein expression	Nup133, SNAPf-tag
---------------------------	-------------------

Töötlemine

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L glükoos, w: stabiilne glutamiin, w: 2,0 mM naatriumpüruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytioni artikli number 820200a)
Supplements	Täiendada söötme 10% FBS, 3,0 g/L glükoosi, stabiilse glutamiini, 2,0 mM naatriumpüruvaadi, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1% NEAaga
Dissociation Reagent	Accutase

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 rakud | 300666

Doubling time umbes 24–36 tundi

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.

Split ratio 1-3

Seeding density $1-3 \times 10^4$ 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 katalooginumbriga 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 rakud | 300666**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 vial 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 vial ettevaatlikult ja viige raku suspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifugeerige 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-SNAPf-Nup133 rakud | 300666

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.