

U2OS-CRISPR-TPR-TPR-SNAP-solut | 300667

Yleisiä tietoja

Description

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP on genomini muokattu ihmisen osteosarkoomasolulinja, joka on peräisin U2OS-soluista, joissa endogeeninen TPR-geeni (Translocated Promoter Region) on muokattu CRISPR/Cas9-tekniikalla koodaamaan in-frame SNAP-tagia. TPR on suuri kiertäinen nukleoporiini, joka lokalisoituu ydinporikompleksin (NPC) nukleoplasmisen puolen ydinkoriin. Merkitsemällä TPR:n sen endogeeniseen lokukseen fuusioproteiini ilmaistaan natiivin säätelyn alaisena, säilyttäen fysiologiset ilmentymistasot ja ylläpitäen asianmukaista sisällyttämistä ydinkorirakenteeseen.

SNAP-tag mahdollistaa TPR:n kovalenttisen leimauksen bentsyyliguaninikonjugoitujen fluoresoivien substraattien avulla elävissä tai kiinnitetyissä soluissa, mikä mahdollistaa erittäin spesifisen ja vakaan visualisoinnin. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-soluissa leimattu TPR näyttää tyypillisen pisteellisen rengasmaisen jakautumisen ydinvaipassa, mikä vastaa NPC:hen liittyviä ydinkorin rakenteita. Tämä järjestelmä sopii hyvin kvantitatiiviseen fluoresenssimikroskopiaan, superresoluutioiseen kuvantamiseen, pulssin jäljitysleimaukseen ja ydinkorin kokoonpanon ja kierron dynaamisiin tutkimuksiin. U2OS-solujen tasainen morfologia ja suuret ytimet helpottavat ydinvaipaan liittyvien rakenteiden korkean resoluution kuvantamista.

TPR:llä on tärkeä rooli mRNA:n viennissä, ydinkuljetuksen säätelyssä, kromatiinin organisoinnissa ytimen reuna-alueella ja genomini spatiaalisessa organisoinnissa. TPR on myös mukana ydinkuljetukseen liittyvien alikompartmenttien muodostumisessa ja heterokromatiinin poissulkemisessa ydinporoihin liittyvistä alueista. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP tarjoaa fysiologisesti merkityksellisen mallin ydinkorin rakenteen ja dynamiikan analysoimiseksi, nukleosyttoplasmisen kuljetuksen mekanismien tutkimiseksi ja ydinkoteloon liittyvien kromatiinin vuorovaikutusten tutkimiseksi endogeenisissä ilmentymisolosuhteissa.

Organism Ihminen

Tissue Luu

Disease Osteosarkooma

Ominaisuudet

Age 15 vuotta

Gender Nainen

Ethnicity Kaukasialainen

Morphology Epiteelin kaltainen

Growth properties Tarttuva

Säätelytiedot

U2OS-CRISPR-TPR-TPR-SNAP-solut | 300667

Citation	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytionin luettelonumero 300667)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenbergin laboratorio (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Tämä ihmisen osteosarkoomasolulinja (U2OS-CRISPR-CRISPR-TPR-SNAP) sisältää CRISPR:llä muunnetun TPR-SNAP-fusion, joka mahdollistaa TPR-ydinkoriproteiinin fluoresoivan ja kemiallisen merkinnän. Konstruktio on stabiilisti integroitu. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

Biomolekyyli tiedot

Protein expression	TPR, SNAP-tag
---------------------------	---------------

Käsittely

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukoosia, w: vakaa glutamiini, w: 2,0 mM natriumpyruvaattia, w: 2,2 g/l NaHCO ₃ (Cytionin artikkelinumero 820200a)
Supplements	Täydennetään elatusainetta 10 % FBS:llä, 3,0 g/l glukoosilla, stabiililla glutamiinilla, 2,0 mM natriumpyruvaatilla, 2,2 g/l NaHCO ₃ :lla, 1 % NEAA:lla
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreessa väliaineessa ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliainetta.
Freeze medium	Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotektantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

U2OS-CRISPR-TPR-TPR-SNAP-solut | 300667**Thawing and
Culturing Cells**

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanottaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja antimikrobista ainetta, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisellä etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvaa, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , kostutettu ilmakehä.

Flask Coating

Ei mitään

**Freezing
Procedure**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

**Shipping
Conditions**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

U2OS-CRISPR-TPR-TPR-SNAP-solut | 300667

Storage Conditions

Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

Laadunvalvonta / Geneettinen profiili / HLA

Sterility

Mykoplasmakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrittelyillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.