

U2OS-CRISPR-NUP96-Halo-soluja | 300448

Yleisiä tietoja

Description

U-2 OS-CRISPR-NUP96-Halo on geneettisesti muunnettu solulinja, joka on johdettu ihmisen osteosarkoomasta U-2 OS -soluista. Tämä solulinja on muunnettu CRISPR-Cas9-teknologian avulla siten, että siihen on lisätty HaloTag NUP96-geenin lokukseen. NUP96 on osa ydinhuokoskompleksia, ja sillä on kriittinen rooli ydinkuljetuksessa ja solujen säätelyssä. HaloTagin lisääminen mahdollistaa NUP96:n dynamiikan ja vuorovaikutusten tarkan visualisoinnin ja biokemiallisen karakterisoinnin solun sisällä.

Helpottamalla fluoresoivien ligandien tai muiden koettimien kovalenttista kiinnittämistä HaloTag mahdollistaa reaaliaikaisen kuvantamisen ja tarjoaa tehokkaan välineen ydinkuljetusmekanismien tutkimiseen elävissä soluissa. Tämä kloni, numero 252, on valittu sen vuoksi, että se ilmentää vakaasti HaloTag-merkittyä NUP96:ta, mikä takaa tasaisen suorituskyvyn koejärjestelyissä. Tämän ominaisuuden ansiosta se soveltuu erinomaisesti korkearesoluutioisiin kuvantamistekniikoihin ja molekulaarisiin vuorovaikutustutkimuksiin, mikä tukee solubiologian kehittyneitä tutkimusta erityisesti ydintoiminnan ja geneettisen säätelyn yhteydessä.

Organism

Ihminen

Tissue

Luu

Disease

Osteosarkooma

Ominaisuudet

Age

15 vuotta

Gender

Nainen

Ethnicity

Kaukasialainen

Morphology

Epiteelin kaltainen

Growth properties

Tarttuva

Säätelytiedot

Citation

U-2 OS-CRISPR-NUP96-Halo (Cytionin luettelonumero 300448)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

U2OS-CRISPR-NUP96-Halo-soluja | 300448

CellosaurusAccession CVCL_B7FI**Depositor** Ellenbergin laboratorio (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Tämä ihmisen osteosarkoomasolulinja (U2OS-CRISPR-NUP96-Halo, klooni 252) sisältää CRISPR-muokattua NUP96-Halo-fusion, joka on tuotettu lentiviraalisen siirron avulla, mikä mahdollistaa ydinhuokoskompleksien fluoresenssimerkinnän. Muunnos on vakaasti integroitunut. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.**Biomolekyylitiedot****Protein expression** NUP96-Halo (endogeeninen ydinhuokoskompleksin proteiini 96, Halo-merkitty)**Käsittely****Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukoosia, w: vakaa glutamiini, w: 2,0 mM natriumpyruvaattia, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (Cytionin artikkelinumero 820200a)**Supplements** Täydennetään elatusainetta 10 %:lla FBS:llä**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 väliaineita.**Seeding density** 1×10^4 solua/cm²**Fluid renewal** 2-3 kertaa viikossa**Freeze medium** Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelunumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotektantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

U2OS-CRISPR-NUP96-Halo-soluja | 300448**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 tarttuvia, 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-NUP96-Halo-soluja | 300448

Storage Conditions

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

HLA-alleelit

A*: '02:01:01, '32:01:01

B*: '44:02:01, '44:27:01

C*: '05:01:01, '07:04:01

DRB1*: '09:01:02G, '14:54:01

DQA1*: '01:04:01, '03:02:01

DQB1*: '03:03:02, '05:03:01

DPB1*: '02:01:02, '04:01:01

E: '01:01:01