

U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP-solut | 300444

Yleisiä tietoja

Description

U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP on geneettisesti muunnettu osteosarkoomasolulinja, joka on johdettu ihmisen kantasolulinjasta U-2 OS. Tämä solulinja on muokattu CRISPR/Cas9-välitteisen genomimuokkauksen avulla siten, että se sisältää SNAP-tagin NUP96-geeniin, mikä mahdollistaa ydinhuokoskompleksin dynamiikan visualisoinnin ja tutkimisen. Ydinhuokoskompleksit (Nuclear Pore Complexes, NPC) ovat ratkaisevan tärkeitä nukleosyttoplasmisen kuljetuksen säätelyssä, ja NUP96 on merkittävä osa NPC:tä, ja sillä on keskeinen rooli sen rakenteellisessa eheydessä ja toiminnassa.

U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP-kloonissa nro 33 SNAP-tagin integrointi NUP96-paikalle mahdollistaa fluoresoivien substraattien tai muiden kemiallisten koettimien spesifisen ja kovalenttisen kiinnittymisen, jota voidaan käyttää elävien solujen kuvantamiseen ja muihin biokemiallisiin määrittäksiin. Tämä ominaisuus tekee siitä korvaamattoman arvokkaan välineen, jolla voidaan tutkia nukleosyttoplasmisen kuljetuksen molekyyliidynamiikkaa, ymmärtää NPC:hen liittyviä patologioita ja seuloa terapeuttisia yhdisteitä, jotka vaikuttavat NPC:n toimintaan. Solulinja säilyttää myös vanhemman U-2 OS -linjan ominaisuudet, joihin kuuluvat korkea geneettinen stabiilisuus ja helppo viljeltävyys, joten se soveltuu korkean läpimenon seulontaan ja laajoihin solubiologisiin tutkimuksiin.

NUP96-geenin modifikaation spesifisyyden ansiosta U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP-klooni nro 33 tarjoaa ainutlaatuisen mallin NPC:n komponenttien yksityiskohtaiseen tutkimiseen solujen toiminnan ja toimintahäiriöiden yhteydessä. Tutkijat voivat hyödyntää SNAP-tag-järjestelmää NUP96:n selektiiviseen ja nopeaan merkitsemiseen, mikä helpottaa NPC-dynamiikan reaaliaikaista visualisointia fysiologisissa ja patologisissa olosuhteissa. Tämä erityinen klooni voi toimia vankkana alustana sekä perustutkimukselle että soveltaville biolääketieteellisille tutkimuksille ja edistää merkittävästi solubiologian, genetiikan ja onkologian aloja.

Organism Ihminen

Tissue Luu

Disease Osteosarkooma

Ominaisuudet

Age 15 vuotta

Gender Nainen

Ethnicity Kaukasialainen

Growth properties Tarttuva

Säätelytiedot

U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP-solut | 300444

Citation	U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP (Cytionin luettelonumero 300444)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B7FL
Depositor	Ellenbergin laboratorio (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Tämä ihmisen osteosarkoomasolulinja (U2OS-CRISPR-CRISPR-NUP96-SNAP, klooni 33) sisältää CRISPR-tekniikalla muunnetun NUP96-SNAP-fuusion, joka helpottaa ydinhuokosten kemiallista SNAP-tag-merkintää. Muunnos on vakaasti integroitu. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

Biomolekyyli tiedot

Protein expression	NUP96-SNAP (ydinhuokoskompleksin proteiini 96, 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.
Seeding density	1 x 10 ⁴ solua/cm ²
Fluid renewal	2-3 kertaa viikossa

U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP-solut | 300444**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 osmoprotectantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

Thawing and Culturing Cells

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanotettaessa 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.

U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP-solut | 300444

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.

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

Mykoplasmacontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrityksillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

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