

U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP-solut U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP-solut | 300174

Yleisiä tietoja

Description

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP on geneettisesti muunnettu solulinja, joka on johdettu ihmisen osteosarkooman U-2 OS-alkulinjasta. Tässä solulinjassa on CRISPR-Cas9-geeninmuokkaustekniikan avulla CRISPR-Cas9-geeninmuokkaustekniikalla aikaansaatu monomeerisen tehostetun vihreän fluoresoivan proteiinin (mEGFP) tagin kohdennettu lisäys NUP96-geenin lokukseen. NUP96, joka on osa ydinhuokoskompleksia, on välttämätön ydinkuljetuksen kannalta, ja sen fuusio mEGFP:n kanssa mahdollistaa ydinhuokosten dynamiikan reaaliaikaisen visualisoinnin fluoresenssimikroskopiassa, mikä antaa arvokasta tietoa ydinkuljetusmekanismeista ja nukleosytolasman liikkeistä.

Tämä erityinen kloni, numero 195, on valittu NUP96-mEGFP-fuusioproteiinin vakaan ilmentymisen vuoksi, ja se säilyttää U-2 OS-linjan tyypilliset ominaisuudet, mukaan lukien vankka sytoskelettirakenne, joka on kriittinen syöpäsolujen migraatioon ja metastaasiin liittyvissä tutkimuksissa. CRISPR-tekniikan käyttö takaa tarkan geenieditoinnin, jolloin minimoidaan kohdepisteen ulkopuoliset vaikutukset, jotka voisivat vaarantaa koetulosten eheyden. Tämän vuoksi U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP-kloni nro 195 on erityisen hyödyllinen korkean resoluution kuvantamistekniikoissa ja yksityiskohtaisissa solurakennetutkimuksissa, mikä auttaa solubiologian, syöpätutkimuksen ja ydinkuljetusilmiöiden edistyksellisessä tutkimuksessa.

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-mEGFP-kloni nro 195 (Cytion-tuotenumero 300174)

Biosafety level 1

U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP-solut U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP-solut | 300174

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_B7FJ

Depositor Ellenbergin laboratorio (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Tämä ihmisen osteosarkoomasolulinja (U2OS-CRISPR-CRISPR-NUP96-mEGFP, klooni 195) sisältää CRISPR-tekniikalla kehitettyä NUP96-mEGFP-fuusiota, joka on tuotu lentiviruksen välityksellä, mikä mahdollistaa ydinhuokoskompleksien fluoresoivan seurannan. Muunnos on vakaasti integroitu. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

Biomolekyyli tiedot

Protein expression MEGFP (ydinhuokoskompleksin proteiini 96, mEGFP-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:ää, 1 %:lla NEAA:ta

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 2-3 x 10⁴ 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-mEGFP-solut U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP-solut | 300174

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-NUP96-mEGFP-solut U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP-solut | 300174

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.