

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 solut | 300666

Yleisiä tietoja

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 on geneettisesti muunnettu ihmisen osteosarkoomasolulinja, joka on johdettu vanhemman U2OS-taustan pohjalta ja jossa endogeeninen NUP133-lokus on muunnettu CRISPR/Cas9-välitteisellä genomien muokkauksella koodaamaan C-terminaalinen SNAPf-tunniste. NUP133 on Y-kompleksin (NUP107-160-kompleksi) ydinkomponentti, rakenteellinen alikompleksi, joka on välttämätön ydinporokompleksin (NPC) kokoamiselle ja ylläpitämiselle. Ottamalla SNAPf-koodaussekvenssin endogeeniseen lokukseen, fuusioproteiini ilmaistään natiivin säätelyn alaisena, säilyttäen fysiologiset ilmentymistasot ja subcellulaarisen lokalisoinnin.

SNAPf-tag on SNAP-tagin nopea merkintämuunnos, joka on muokattu O6-alkyyliguanidiini-DNA-alkyyli transferaasi, joka reagoi kovalenttisesti bentsyyliguanidiinikonjugoitujen substraattien kanssa. Tämä mahdollistaa Nup133:n erittäin spesifisen ja monipuolisen fluoresoivan merkinnän elävissä tai kiinnitetyissä soluissa käyttämällä soluja läpäiseviä tai läpäisemättömiä SNAP-substraatteja. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-soluissa fuusioproteiini lokalisoituu ydinvaipaan ydinporakomplekseille tyypillisellä pistekuvioisella tavalla. Koska merkitseminen tapahtuu endogeenisessä lokuksessa, NPC:n stoikiometria ja arkkitehtuuri häiriintyvät minimaalisesti, mikä tekee tästä mallista sopivan kvantitatiiviseen superresoluutiomikroskopiaan, yksittäisten molekyylien seurantaan ja NPC:n kokoonpanon ja kierron kineettisiin analyyseihin.

Tämä solulinja tarjoaa vankan alustan ydinkuljetuksen, nukleosyttoplasmisen liikenteen dynamiikan, NPC:n biogeneesin interfasi- ja postmitotisen ydinkokoonpanon aikana sekä Y-kompleksin rakenteellisen organisoinnin tutkimiseen huokosrakenteessa. U2OS-tausta tarjoaa tasaisen morfologian ja suuret tumat, mikä helpottaa korkean resoluution kuvantamista. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-solut sopivat erityisen hyvin pulssin ja jäljityksen merkintäkokeisiin, korreloivaan valo- ja elektronimikroskopiaan sekä monivärisen kuvantamiseen yhdessä muiden endogeenisesti merkittyjen nukleoporiinien tai kuljetustekijöiden kanssa.

Organism Ihminen

Tissue Luu

Disease Osteosarkooma

Ominaisuudet

Age 15 vuotta

Gender Nainen

Ethnicity Kaukasialainen

Morphology Epiteelin kaltainen

Growth properties Tarttuva

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 solut | 300666

Säätelytiedot

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytionin luettelonumero 300666)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenbergin laboratorio (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Tämä ihmisen osteosarkoomasolulinja (U2OS-CRISPR-CRISPR-SNAPf-Nup133) sisältää CRISPR:llä tuotetun SNAPf-Nup133-fuusion, joka mahdollistaa Nup133-nukleoporiinin fluoresoivan merkinnän. Insertti on vakaasti läsnä. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

Biomolekyyli tiedot

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

Käsittely

Culture Medium	McCoys 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 väliaineita.
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-SNAPf-Nup133 solut | 300666**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-SNAPf-Nup133 solut | 300666

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.