

U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple sejtek | 300461

Általános információk

Description

Az U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple egy genetikailag módosított osteosarcoma sejtvonallal, amely a humán U-2 OS sejtvonalból származik, amely robusztus növekedési jellemzőiről és különböző biológiai vizsgálatokban való hasznosságáról ismert. Ezt a klónt a CRISPR/Cas9 génszerkesztési technológiával módosították, hogy a NUP96 génbe beépítsék az mMaple-t, egy fotokonvertálható fluoresszcens fehérjét. Az mMaple fehérje lehetővé teszi a fejlett képalkotási technikák, például az élő sejtek képalkotása és a szuperfelbontású mikroszkópia alkalmazását, dinamikus betekintést nyújtva a nukleáris póruskomplex (NPC) viselkedésébe és a sejtek import-export mechanizmusába a magburkon keresztül.

A NUP96 gén, amely az NPC egyik kulcsfontosságú komponensét kódolja, létfontosságú a nukleocitoplazmatikus szállításhoz. A NUP96 megváltozása nemcsak a transzportmechanizmusokat, hanem az általános nukleáris architektúrát és funkciót is befolyásolhatja. Ez a sejt vonal így kiváló modellként szolgál a NPC-vel kapcsolatos kórképek, valamint a nukleáris transzportnak a sejtek anyagcseréjében és jelátvitelében játszott szerepének tanulmányozására. Az mMaple integrálása a NUP96-ba lehetővé teszi a NUP96 dinamikájának valós idejű követését és vizualizálását in vivo, így nélkülözhetetlen eszközzé válik a sejt magok vizsgálatára összpontosító kutatók számára, valamint azok számára, akik a NPC működési zavarainak következményeit vizsgálják olyan betegségekben, mint a rák és a vírusfertőzések.

Speciális eszközként az U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple 16. számú klónja támogatja a nagy felbontású képalkotást, és jelentős adatokat szolgáltat az NPC-komponensek térbeli és időbeli eloszlásáról. Különösen értékes a génexpresszió, a fehérje lokalizáció és a nukleáris transzport részletes elemzését fiziológiai és patológiai körülmények között igénylő kísérletekhez, elősegítve a sejt folyamatok mélyebb megértését molekuláris szinten.

Organism Emberi

Tissue Csont

Disease Osteosarcoma

Jellemzők

Age 15 év

Gender Női

Ethnicity Kaukázusi

Growth properties Adherent

Szabályozási adatok

U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple sejtek | 300461

Citation	U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple (Cytion katalógusszám: 300461)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B7FK
Depositor	Az Ellenberg Labor (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Ez a humán osteosarcoma sejtvonallal (U2OS-CRISPR-CRISPR-NUP96-mMaple, 16-os klón) CRISPR-közvetítésű NUP96-mMaple fúziót tartalmaz, amely lehetővé teszi a nukleáris pórusszerkezetek fotokonvertálható jelölését. A konstrukció stabilan jelen van. Ez a besorolás csak Németországban érvényes, máshol eltérhet.

Biomolekuláris adatok

Protein expression	NUP96-mMaple (endogén nukleáris pórus komplex 96 fehérje, mMaple címkével ellátva)
---------------------------	--

A kezelése

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L glükóz, w: stabil glutamin, w: 2,0 mM nátrium-piruvát, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytion cikkszám: 820200a)
Supplements	A táptalajt 10% FBS-szel, 1% NEAA-val egészítsük ki
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Távolítsa el a régi táptalajt a megtapadt sejtekről, és mossa őket kalcium- és magnéziummentes PBS-szel. T25-ös lombikokhoz 3-5 ml PBS-t, T75-ös lombikokhoz pedig 5-10 ml-t használjunk. Ezután fedjük be a sejteket teljesen Accutase-zal, T25 lombikok esetében 1-2 ml-t, T75 lombikok esetében 2,5 ml-t használva. A sejteket 8-10 percig hagyjuk szobahőmérsékleten inkubálni, hogy leváljanak. Az inkubálás után óvatosan keverjük össze a sejteket 10 ml tápfolyadékkal, hogy reszuszpendáljuk őket, majd centrifugáljuk 300xg-nél 3 percig. Dobja el a felülúszót, szuszpendálja újra a sejteket friss tápfolyadékban, és helyezze át őket új lombikokba, amelyek már friss tápfolyadékot tartalmaznak.
Seeding density	1×10^4 sejt/cm ²
Fluid renewal	hetente 2-3 alkalommal

U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple sejtek | 300461

Freeze medium

Krioprezerváló táptalajként teljes növekedési táptalajt (beleértve az FBS-t) + 10% DMSO-t használunk a megfelelő kiolvasztás utáni életképesség érdekében, vagy CM-1-et (Cytion katalógusszám: 800100), amely optimalizált ozmoprotektánsokat és metabolikus stabilizátorokat tartalmaz a regenerálódás fokozása és a krio-indukált stressz csökkentése érdekében.

Thawing and Culturing Cells

1. Ellenőrizze, hogy az injekciós üveg a szállításkor mélyhűtött marad-e, mivel a sejteket szárazjégen szállítják, hogy a szállítás során az optimális hőmérsékletet fenntartsák.
2. Átvételt követően vagy azonnal tárolja a krioampullát $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatti hőmérsékleten a sejtek integritásának megőrzése érdekében, vagy folytassa a 3. lépéssel, ha azonnali tenyésztésre van szükség.
3. Azonnali tenyésztés esetén gyorsan fel kell olvasztani az injekciós üveget úgy, hogy tiszta vízzel és antimikrobiális szerrel ellátott $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe merítjük, és 40-60 másodpercig óvatosan kevergetjük, amíg egy kis jégcsomó nem marad.
4. Az összes további lépést steril körülmények között, áramlásos elszívóban végezzük el, és nyitás előtt fertőtlenítsük a krioümlékét 70%-os etanollal.
5. Óvatosan nyissa fel a fertőtlenített fiolát, és a sejtszuszpenziót óvatosan összekeverve helyezze át egy 15 ml-es centrifugacsőbe, amely 8 ml szobahőmérsékletű táptalajt tartalmaz.
6. Centrifugáljuk az elegyet $300 \times g$ -n 3 percig a sejtek szétválasztásához, és óvatosan dobjuk el a maradék fagyasztóközeget tartalmazó felülúszót.
7. Óvatosan szuszpendáljuk újra a sejt pelletet 10 ml friss táptalajban. Adhezív sejtek esetében ossza a szuszpenziót két T25-ös tenyésztőlombik között; szuszpenziós kultúrák esetében az összes tápfolyadékot tegye át egy T25-ös lombikba a hatékony sejtkölcsönhatás és növekedés elősegítése érdekében.
8. A sejt vonal folyamatos növekedése és fenntartása érdekében tartsa be a megállapított szubkultúra protokollokat, biztosítva a megbízható kísérleti eredményeket.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , párasított légkör.

Flask Coating

Nincs

Freezing Procedure

A kriokonzervált sejt vonalakat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple sejtek | 300461

Shipping Conditions

A kriokonzervált sejtvonalatokat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

Storage Conditions

Hosszú távú tartósítás céljából helyezze az üvegeket gőzfázisú folyékony nitrogénbe, körülbelül -150 és $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten. A $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolás csak rövid átmeneti lépésként fogadható el a folyékony nitrogénbe való átvitel előtt.

Minőségellenőrzés / Genetikai profil / HLA

Sterility

A mikoplazma-szennyeződést mind a PCR-alapú vizsgálatokkal, mind a lumineszcencia-alapú mikoplazma-kimutatási módszerekkel kizárják.

A bakteriális, gombás vagy élesztőgombás szennyeződés elkerülése érdekében a sejt kultúrákat napi vizuális ellenőrzésnek vetik alá.