

U2OS-CRISPR-TPR-TPR-SNAP sejtek | 300667

Általános információk

Description

Az U2OS-CRISPR-TPR-SNAP egy genomszerkesztett humán osteosarcoma sejtvonala, amely U2OS sejtekből származik, és amelyben az endogén TPR (Translocated Promoter Region) gént CRISPR/Cas9 technológiával módosították, hogy egy in-frame SNAP tagot kódoljon. A TPR egy nagy, spirálszerűen tekeredő nukleoporin, amely a nukleoplasztikus oldalon, a nukleáris pórus komplex (NPC) nukleáris kosarában lokalizálódik. A TPR endogén lókusának megjelölésével a fúziós fehérje natív szabályozó kontroll alatt expresszálódik, megőrizve a fiziológiai expressziós szinteket és fenntartva a nukleáris kosár szerkezetébe való megfelelő beépülést.

A SNAP tag lehetővé teszi a TPR kovalens jelölését benzilguanin-konjugált fluoreszcens szubsztátokkal élő vagy fixált sejtekben, ami rendkívül specifikus és stabil vizualizációt tesz lehetővé. Az U2OS-CRISPR-TPR-SNAP sejtekben a jelölt TPR jellegzetes pontszerű, gyűrűszerű eloszlást mutat a nukleáris membránon, ami megfelel az NPC-hez kapcsolódó nukleáris kosárszerkezeteknek. Ez a rendszer kiválóan alkalmas kvantitatív fluoreszcens mikroszkópiára, superfelbontású képalkotásra, pulzus-üldözéssel jelölésre, valamint a nukleáris kosár szerkezetének és forgalmának dinamikus vizsgálatára. Az U2OS sejtek lapos morfológiája és nagy magjai megkönnyítik a nukleáris membránhoz kapcsolódó struktúrák nagy felbontású képalkotását.

A TPR kritikus szerepet játszik az mRNS exportjában, a nukleáris transzport szabályozásában, a kromatin szerveződésében a nukleáris periférián és a genom térbeli szerveződésében. A TPR részt vesz a nukleáris transzporthoz kapcsolódó alkompartmentumok kialakulásában és a heterokromatin kizárásában a nukleáris pórusokkal kapcsolatos régiókból. Az U2OS-CRISPR-TPR-SNAP fiziológiailag releváns modellt nyújt a nukleáris kosár felépítésének és dinamikájának elemzéséhez, a nukleocitoplazmatikus transzportmechanizmusok vizsgálatához, valamint a nukleáris membránhoz kapcsolódó kromatin interakciók tanulmányozásához endogén expressziós körülmények között.

Organism Emberi

Tissue Csont

Disease Osteosarcoma

Jellemzők

Age 15 év

Gender Női

Ethnicity Kaukázusi

Morphology Epithelszerű

Growth properties Adherent

U2OS-CRISPR-TPR-TPR-SNAP sejtek | 300667

Szabályozási adatok

Citation	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytion katalógusszám: 300667)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Az Ellenberg Labor (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Ez a humán oszteoszarkóma sejtvonala (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) egy CRISPR által módosított TPR-SNAP fúziót tartalmaz, amely lehetővé teszi a TPR nukleáris kosárfehérje fluoreszcens és kémiai jelölését. A konstrukció stabilan integrálódik. Ez a besorolás csak Németországban érvényes, és máshol ettől eltérhet.

Biomolekuláris adatok

Protein expression	TPR, SNAP-tag
---------------------------	---------------

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 egészítsük ki 10% FBS-szel, 3,0 g/L glükózzal, stabil glutaminnal, 2,0 mM nátrium-piruváttal, 2,2 g/L NaHCO ₃ -mal, 1% NEAA-val
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.
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 krioindukált stressz csökkentése érdekében.

U2OS-CRISPR-TPR-TPR-SNAP sejtek | 300667**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 °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 °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 krioüklét 70%-os etanollal.
5. Óvatosan nyissa fel a fertőtlenített fiolát, és a sejtuszpenziót 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 sejt kölcsönhatás 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 °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 °C -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

**Shipping
Conditions**

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

U2OS-CRISPR-TPR-TPR-SNAP sejtek | 300667

Storage Conditions

Hosszú távú tartósítás céljából helyezze az üvegeket gőzfázisú folyékony nitrogénbe, körülbelül -150 és -196 °C közötti hőmérsékleten. A -80 °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.