

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sejtek | 300666

Általános információk

Description

Az U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 egy géntechnológiával módosított humán osteosarcoma sejtvonal, amely az U2OS szülői háttérből származik, és amelyben az endogén NUP133 lókuszt CRISPR/Cas9-mediált genomszerkesztéssel módosították, hogy C-terminális SNAPf tagot kódoljon. A NUP133 a Y-komplex (NUP107-160 komplex) központi komponense, amely egy strukturális alkompex, amely elengedhetetlen a nukleáris pórus komplex (NPC) összeállításához és fenntartásához. A SNAPf kódoló szekvencia endogén lókuszbba történő beépítésével a fúziós fehérje natív szabályozási kontroll alatt expresszálódik, megőrizve a fiziológiai expressziós szinteket és a szubcelluláris lokalizációt.

A SNAPf tag a SNAP-tag gyors jelölő változata, egy módosított O6-alkilguanin-DNS-alkil-transzferáz, amely kovalens reakcióba lép a benzilguanin-konjugált szubsztátokkal. Ez lehetővé teszi a Nup133 rendkívül specifikus és sokoldalú fluoreszcens jelölését élő vagy fixált sejtekben, sejtátersztő vagy sejtátersztő SNAP szubsztátok felhasználásával. Az U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sejtekben a fúziós fehérje a nukleáris pórus komplexekre jellemző pontszerű mintázatban lokalizálódik a sejtmembránján. Mivel a jelölés az endogén lókuszban történik, az NPC sztöchiometriája és architektúrája minimálisan zavart, így ez a modell alkalmas kvantitatív szuperfelbontású mikroszkópiára, egyedi molekulák nyomon követésére, valamint az NPC összeszerelésének és forgalmának kinetikai elemzésére.

Ez a sejtvonal robusztus platformot biztosít a nukleáris transzport, a nukleocitoplazmatikus transzport dinamikájának, az NPC biogenezisének az interfázis és a posztmitotikus nukleáris újrendezés során, valamint a Y-komplex szerkezeti szerveződésének a pórusvázon belül történő tanulmányozásához. Az U2OS háttér lapos morfológiát és nagy magokat kínál, ami megkönnyíti a nagy felbontású képalkotást. Az U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sejtek különösen alkalmasak pulzus-üldözéssel jelölési kísérletekhez, korrelatív fény- és elektronmikroszkópiához, valamint többszínű képalkotási módszerekhez, további endogén jelölésű nukleoporinokkal vagy transzportfaktorokkal kombinálva.

Organism Emberi

Tissue Csont

Disease Osteosarcoma

Metastatic site Az elsődleges daganat helye (csont)

Applications A nukleáris póruskomplex (NPC) biológiája; a Nup133/Y-komplex felépítése; az NPC biogenezise; a nukleocitoplazmatikus transzport; szuperfelbontású mikroszkópia (STORM/PALM/STED); egyes részecskék nyomon követése; pulzus-üldözéssel SNAP-jelölés; korrelatív fény- és elektronmikroszkópia; az NPC kvantitatív sztöchiometriája

Jellemzők

Age 15 év

Gender Női

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sejtek | 300666

Ethnicity	Kaukázusi
Morphology	Epithelszerű
Cell type	Hámsejtek (osteosarcoma)
Growth properties	Adherent

Szabályozási adatok

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytion katalógusszám: 300666)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Nincs hozzárendelve (CRISPR-rel módosított U2OS-származék; szülői U2OS CVCL_0042)
Depositor	Az Ellenberg Labor (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Ez a humán osteosarcoma sejtvonal (U2OS-CRISPR-CRISPR-SNAPf-Nup133) egy CRISPR által bevezetett SNAPf-Nup133 fúziót tartalmaz, amely lehetővé teszi a Nup133 nukleoporin fluoreszcens jelölését. Az inzert stabilan jelen van. Ez az osztályozás csak Németországban érvényes, máshol ettől eltérhet.

Biomolekuláris adatok

Protein expression	Nup133, SNAPf-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

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sejtek | 300666

Doubling time kb. 24–36 óra

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 reszuspendáljuk őket, majd centrifugáljuk 300xg-nél 3 percig. Dobja el a felülúszót, szuspendálja újra a sejteket friss tápfolyadékban, és helyezze át őket új lombikokba, amelyek már friss tápfolyadékot tartalmaznak.

Split ratio 1–3

Seeding density $1-3 \times 10^4$ sejt/cm²

Fluid renewal hetente 2-3 alkalommal

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.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sejtek | 300666**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 kriofülkét 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-SNAPf-Nup133 sejtek | 300666

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.