

Sel U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Informasi umum

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 adalah garis sel osteosarcoma manusia yang dimodifikasi secara genetik, yang berasal dari garis sel induk U2OS, di mana lokus NUP133 endogen telah dimodifikasi menggunakan pengeditan genom yang dimediasi oleh CRISPR/Cas9 untuk mengkodekan tag SNAPf pada ujung C-terminal. NUP133 merupakan komponen inti dari kompleks Y (kompleks NUP107-160), subkompleks struktural yang esensial untuk perakitan dan pemeliharaan kompleks pori nuklir (NPC). Dengan memperkenalkan urutan pengkodean SNAPf secara in-frame pada lokus endogen, protein fusi diekspresikan di bawah kendali regulasi alami, menjaga tingkat ekspresi fisiologis dan lokalisasi subseluler.

Tag SNAPf adalah varian penandaan cepat dari tag SNAP, enzim O6-alkilguanin-DNA alkyltransferase yang direkayasa untuk bereaksi kovalen dengan substrat yang dikonjugasi dengan benzyguanin. Hal ini memungkinkan penandaan fluoresen yang sangat spesifik dan serbaguna pada Nup133 dalam sel hidup atau yang telah difiksasi menggunakan substrat SNAP yang permeabel atau impermeabel. Pada sel U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, protein fusi terlokalisasi pada selubung nukleus dalam pola bercak yang khas dari kompleks pori nukleus. Karena penandaan terjadi di lokus endogen, stoikiometri dan arsitektur NPC minimal terganggu, menjadikan model ini cocok untuk mikroskopi super-resolusi kuantitatif, pelacakan molekul tunggal, dan analisis kinetik perakitan dan perputaran NPC.

Baris sel ini menyediakan platform yang andal untuk mempelajari transportasi nuklear, dinamika lalu lintas nukleositosolik, biogenesis NPC selama fase interfase dan perakitan ulang nukleus pasca-mitosis, serta organisasi struktural kompleks Y di dalam rangkaian pori. Latar belakang U2OS menawarkan morfologi datar dan nukleus besar, memudahkan pencitraan resolusi tinggi. Sel U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sangat cocok untuk eksperimen penandaan pulse-chase, mikroskopi cahaya dan elektron korelatif, serta pendekatan pencitraan multicolor bersama dengan nukleoporin atau faktor transportasi yang ditandai secara endogen.

Organism Manusia

Tissue Tulang

Disease Osteosarkoma

Karakteristik

Age 15 tahun

Gender Perempuan

Ethnicity Kaukasia

Morphology Seperti epitel

Growth properties Patuh

Sel U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Data Peraturan

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Nomor katalog Cytion 300666)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Laboratorium Ellenberg (Ellenberg Lab) (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Garis sel osteosarkoma manusia ini (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) mengandung fusi SNAPf-Nup133 yang diintroduksi oleh CRISPR, yang memungkinkan penandaan neon nukleoporin Nup133. Sisipan ini hadir secara stabil. Klasifikasi ini hanya berlaku di Jerman dan mungkin berbeda di tempat lain.

Data Biomolekuler

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

Penanganan

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glukosa, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natrium piruvat, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Nomor artikel Cytion 820200a)
Supplements	Lengkapi media dengan 10% FBS, 3,0 g/L Glukosa, Glutamin stabil, 2,0 mM Natrium piruvat, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Buang media lama dari sel yang melekat dan cuci dengan PBS yang tidak mengandung kalsium dan magnesium. Untuk labu T25, gunakan 3-5 ml PBS, dan untuk labu T75, gunakan 5-10 ml. Kemudian, tutupi sel sepenuhnya dengan Accutase, menggunakan 1-2 ml untuk labu T25 dan 2,5 ml untuk labu T75. Biarkan sel diinkubasi pada suhu kamar selama 8-10 menit untuk melepaskannya. Setelah inkubasi, campurkan sel secara perlahan dengan 10 ml medium untuk meresuspensi sel, kemudian sentrifugasi pada 300xg selama 3 menit. Buang supernatan, resuspensi sel dalam medium segar, dan pindahkan ke dalam labu baru yang sudah berisi medium segar.
Freeze medium	Sebagai media kriopreservasi, kami menggunakan media pertumbuhan lengkap (termasuk FBS) + 10% DMSO untuk viabilitas pasca-pencairan yang memadai, atau CM-1 (nomor katalog Cytion 800100), yang mencakup osmoprotektan yang dioptimalkan dan penstabil metabolisme untuk meningkatkan pemulihan dan mengurangi stres yang diinduksi kriopreservasi.

Sel U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Thawing and Culturing Cells

1. Pastikan botol tetap dalam keadaan beku pada saat pengiriman, karena sel dikirim dengan es kering untuk mempertahankan suhu optimal selama perjalanan.
2. Setelah diterima, segera simpan cryovial pada suhu di bawah -150°C untuk memastikan pelestarian integritas sel, atau lanjutkan ke langkah 3 jika kultur segera diperlukan.
3. Untuk kultur segera, segera cairkan botol dengan merendamnya dalam penangas air bersuhu 37°C dengan air bersih dan agen antimikroba, aduk perlahan selama 40-60 detik hingga gumpalan es kecil tetap ada.
4. Lakukan semua langkah selanjutnya dalam kondisi steril di dalam tudung alir, desinfektan kriovial dengan etanol 70% sebelum dibuka.
5. Buka botol yang telah didesinfeksi dengan hati-hati dan pindahkan suspensi sel ke dalam tabung sentrifugasi 15 ml yang berisi 8 ml media kultur suhu kamar, aduk perlahan.
6. Sentrifus campuran pada 300 x g selama 3 menit untuk memisahkan sel dan dengan hati-hati membuang supernatan yang mengandung sisa media pembekuan.
7. Resuspensi pelet sel dengan hati-hati dalam 10 ml medium kultur segar. Untuk sel yang melekat, bagi suspensi di antara dua labu kultur T25; untuk kultur suspensi, pindahkan semua media ke dalam satu labu T25 untuk mendorong interaksi dan pertumbuhan sel yang efektif.
8. Patuhi protokol subkultur yang telah ditetapkan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan garis sel yang berkelanjutan, memastikan hasil eksperimental yang andal.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , atmosfer yang dilembapkan.

Flask Coating

Tidak ada

Freezing Procedure

Lini sel kriopreservasi dikirim di atas es kering dalam kemasan terisolasi yang divalidasi dengan refrigeran yang cukup untuk mempertahankan suhu sekitar -78°C selama perjalanan. Setelah diterima, segera periksa wadah dan pindahkan botol tanpa penundaan ke tempat penyimpanan yang sesuai.

Shipping Conditions

Lini sel kriopreservasi dikirim di atas es kering dalam kemasan terisolasi yang divalidasi dengan refrigeran yang cukup untuk mempertahankan suhu sekitar -78°C selama perjalanan. Setelah diterima, segera periksa wadah dan pindahkan botol tanpa penundaan ke tempat penyimpanan yang sesuai.

Sel U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

**Storage
Conditions**

Untuk pengawetan jangka panjang, tempatkan botol dalam nitrogen cair fase uap pada suhu sekitar -150 hingga -196 °C. Penyimpanan pada suhu -80 °C hanya dapat diterima sebagai langkah sementara sebelum dipindahkan ke nitrogen cair.

Kontrol kualitas / Profil genetik / HLA

Sterility

Kontaminasi mikoplasma disingkirkan dengan menggunakan tes berbasis PCR dan metode deteksi mikoplasma berbasis pendaran.

Untuk memastikan tidak ada kontaminasi bakteri, jamur, atau ragi, kultur sel menjalani inspeksi visual setiap hari.