

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP ląstelės | 300667

Bendra informacija

Description

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP yra genomo redaguota žmogaus osteosarkomos ląstelių linija, gauta iš U2OS ląstelių, kuriose endogeninis TPR (Translocated Promoter Region) genas buvo modifikuotas naudojant CRISPR/Cas9 technologiją, kad koduotų in-frame SNAP žymę. TPR yra didelis susuktų spiralės formos nukleoporinas, kuris lokalizuojasi branduolinėje krepšelyje branduolinės poros komplekso (NPC) branduolinės pusėje. Žymint TPR jo endogeniniame lokuse, jungtinis baltymas yra ekspresuojamas pagal natūralią reguliacinę kontrolę, išsaugant fiziologinius ekspresijos lygius ir išlaikant tinkamą įtraukimą į branduolinės krepšelio struktūrą.

SNAP žymė leidžia kovalentiškai žymėti TPR benzylguano-konjuguotais fluorescenciniais substratais gyvose arba fiksuotose ląstelėse, leidžiant labai specifinį ir stabilų vizualizavimą. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP ląstelėse pažymėtas TPR rodo charakteringą taškinį žiedo formos pasiskirstymą branduolinėje apvaskalėje, atitinkantį NPC susijusias branduolinio krepšelio struktūras. Ši sistema puikiai tinka kiekybinei fluorescencinei mikroskopijai, super-rezoliucijos vaizdams, impulsų-persekiojimo žymėjimui ir dinamiškiems branduolinio krepšelio surinkimo ir apykaitos tyrimams. Plokščia morfologija ir dideli U2OS ląstelių branduoliai palengvina branduolinės apvaskalės susijusių struktūrų aukštos rezoliucijos vaizdus.

TPR atlieka svarbų vaidmenį mRNR eksporte, branduolinio transporto reguliavime, chromatinio organizavime branduolinėje periferijoje ir erdvinėje genomo organizacijoje. TPR taip pat dalyvauja branduolinio transporto susijusių subkompartimentų formavime ir heterochromatino pašalinime iš branduolinės poros susijusių regionų. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP suteikia fiziologiškai reikšmingą modelį branduolinio krepšelio architektūros ir dinamikos analizavimui, branduolinio-citoplazminio transporto mechanizmų tyrimui ir branduolinės apvaskalės susijusių chromatinio sąveikų tyrimui endogeninių ekspresijos sąlygomis.

Organism Žmogus

Tissue Kaulas

Disease Osteosarkoma

Metastatic site Pirminio naviko lokalizacija (kaulai)

Applications Branduolinio krepšelio biologija; TPR reguliuojamas mRNR eksportas; branduolinio ir citoplazminio transporto reguliavimas; chromatinio organizacija branduolio periferijoje; branduolinio transporto subkompartimentai; genomo erdvinė organizacija; superrezoliucijos mikroskopija; SNAP „pulse-chase“ žymėjimas; heterochromatino pašalinimas iš su poromis susijusių sričių

Charakteristikos

Age 15 metų

Gender Moteris

Ethnicity Kaukazičių

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP ląstelės | 300667

Morphology | epitelį panašus

Cell type Epitelio ląstelės (osteosarkoma)

Growth properties Prigludęs

Reguliavimo duomenys

Citation U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytion katalogo numeris 300667)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession Nepaskirtas (CRISPR modifikuotas U2OS darinys; pirminis U2OS CVCL_0042)

Depositor Ellenbergo laboratorija (EMBL)

GMO Status GMO-S1: šioje žmogaus osteosarkomos ląstelių linijoje (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) yra CRISPR sukurta TPR-SNAP sintezė, leidžianti fluorescenciniu ir cheminiu būdu žymėti TPR branduolio krepšelio baltymą. Konstruktas yra stabiliai integruotas. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir gali skirtis kitose šalyse.

Biomolekuliniai duomenys

Protein expression TPR, SNAP žymėjimas

Tvarkymas

Culture Medium McCoy's 5a, w: 3,0 g/l gliukozės, w: stabilus glutaminas, w: 2,0 mM natrio piruvatas, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (Cytion gaminio numeris 820200a)

Supplements Papildykite terpę 10 % FBS, 3,0 g/l gliukozės, stabilium glutaminu, 2,0 mM natrio piruvato, 2,2 g/l NaHCO₃, 1 % NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time maždaug nuo 24 iki 36 valandų

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP ląstelės | 300667

Subculturing Pašalinkite seną terpę nuo prilipusių ląstelių ir nuplaukite jas PBS, kuriame nėra kalcio ir magnio. T25 kolboms naudokite 3-5 ml PBS, o T75 kolboms - 5-10 ml. Tuomet visiškai užpilkite ląsteles "Accutase", naudodami 1-2 ml T25 kolboms ir 2,5 ml T75 kolboms. Leiskite ląstelėms inkubuotis kambario temperatūroje 8-10 minučių, kad jos atsiskirtų. Po inkubacijos atsargiai sumaišykite ląsteles su 10 ml terpės, kad jos vėl suspenduotų, tada 3 minutes centrifuguokite 300xg greičiu. Išmeskite supernatantą, vėl sutirpinkite ląsteles šviežioje terpėje ir perkelkite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.

Split ratio 1-3

Seeding density nuo 1 iki 3×10^4 ląstelių/cm²

Fluid renewal 2-3 kartus per savaitę

Freeze medium Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę (įskaitant FBS) + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo, arba CM-1 (Cytion katalogo numeris 800100), kurioje yra optimizuotų osmoprotektorių ir medžiagų apykaitos stabilizatorių, kad būtų pagerintas atsigavimas ir sumažintas kriokonservavimo sukeltas stresas.

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP ląstelės | 300667**Thawing and
Culturing Cells**

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei -150°C temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į 37°C temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 300 x g greičiu 3 minutes, kad atsiskirtų ląstelės, ir atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpės likučiais.
7. Švelniai resuspenduokite ląstelių granules 10 ml šviežios mitybinės terpės. Jei ląstelės yra prigludusios, suspensiją padalykite į dvi T25 kolbas; jei tai suspensinės kultūros, visą terpę perkelti į vieną T25 kolbą, kad paskatintumėte veiksmingą ląstelių sąveiką ir augimą.
8. Laikykitės nustatytų subkultūrų protokolų, kad ląstelių linija nuolat augtų ir būtų palaikoma, taip užtikrinant patikimus eksperimentų rezultatus.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5 % CO_2 , drėkintoje atmosferoje.

Flask Coating

Nėra

**Freezing
Procedure**

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug -78°C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

**Shipping
Conditions**

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug -78°C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP ląstelės | 300667

Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug -150-196 °C temperatūroje. Laikymas -80 °C temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeliant į skystą azotą.

Kokybės kontrolė / Genetinis profilis / HLA

Sterility

Mikoplazmos užterštumas atmetamas taikant PGR pagrįstus tyrimus ir liuminescencinius mikoplazmos aptikimo metodus.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų užteršimo bakterijomis, grybeliais ar mielėmis, ląstelių kultūros kasdien vizualiai tikrinamos.