

U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP ląstelės | 300174

Bendra informacija

Description

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP yra genetiškai modifikuota ląstelių linija, gauta iš žmogaus osteosarkomos U-2 OS pirminės linijos. Šioje ląstelių linijoje į NUP96 geno lokusą tikslingai įterpiama monomerinio sustiprinto žaliojo fluorescencinio baltymo (mEGFP) žyma, kuri gaunama naudojant CRISPR-Cas9 genų redagavimo technologiją. Branduolio porų kompleksui priklausantis NUP96 yra būtinas branduolio pernašai, o jo susiliejimas su mEGFP leidžia realiuoju laiku vizualizuoti branduolio porų dinamiką fluorescenciniu mikroskopu, suteikiant vertingų įžvalgų apie branduolio pernašos mechanizmus ir nukleocitoplazminį judėjimą.

Šis konkretus klonas, pažymėtas numeriu 195, buvo atrinktas dėl stabilios NUP96-mEGFP sintezės baltymo raiškos ir išlaiko tipiškas U-2 OS linijos savybes, įskaitant tvirtą citoskeleto struktūrą, kuri yra labai svarbi atliekant tyrimus, susijusius su vėžio ląstelių migracija ir metastazėmis. Taikant CRISPR technologiją užtikrinamas tikslus genų redagavimas, sumažinant netikslinius poveikius, kurie galėtų pakenkti eksperimentų rezultatų vientisumui. Todėl U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP klonas Nr. 195 yra ypač naudingas didelės skiriamosios gebos vaizdavimo metodams ir išsamiems ląstelės struktūros tyrimams, padedantiems atlikti pažangius ląstelės biologijos, vėžio tyrimų ir branduolinio transporto reiškinių tyrimus.

Organism Žmogus

Tissue Kaulas

Disease Osteosarkoma

Charakteristikos

Age 15 metų

Gender Moteris

Ethnicity Kaukaziėčių

Morphology Į epitelį panašus

Growth properties Priglundęs

Reguliavimo duomenys

Citation U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP klonas Nr. 195 (Cytion katalogo numeris 300174)

Biosafety level 1

U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP ląstelės | 300174

NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B7FJ
Depositor	Ellenbergo laboratorija (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: šioje žmogaus osteosarkomos ląstelių linijoje (U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP, klonas 195) yra CRISPR sukurta NUP96-mEGFP sintezė, įvesta naudojant lentivirusus, leidžianti fluorescenciniu būdu sekti branduolio porų kompleksus. Modifikacija yra stabiliai integruota. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir gali skirtis kitose šalyse.

Biomolekuliniai duomenys

Protein expression	MEGFP (branduolio porų komplekso baltymas 96, pažymėtas mEGFP)
---------------------------	--

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 NaHCO ₃ (Cytion gaminio numeris 820200a)
Supplements	Papildykite terpę 10 % FBS, 1 % NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
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 perkeltite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.
Seeding density	2-3 x 10 ⁴ ląstelės/cm ²
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-NUP96-mEGFP ląstelės | 300174**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-NUP96-mEGFP ląstelės | 300174

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.