

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 ląstelės | 300666

Bendra informacija

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 yra genetiškai modifikuota žmogaus osteosarkomos ląstelių linija, gauta iš tėvinės U2OS linijos, kurioje endogeninis NUP133 lokusas buvo modifikuotas naudojant CRISPR/Cas9 mediatorių genomo redagavimą, kad būtų užkoduotas C-terminalinis SNAPf žymeklis. NUP133 yra pagrindinis Y-komplekso (NUP107-160 kompleksas) komponentas, struktūrinis subkompleksas, būtinas branduolinio porų komplekso (NPC) surinkimui ir palaikymui. Įvedant SNAPf kodavimo seką į endogeninį lokusą, jungtinis baltymas yra ekspresuojamas pagal natūralią reguliacinę kontrolę, išlaikant fiziologinius ekspresijos lygius ir subląstelinę lokalizaciją.

SNAPf žymė yra greito žymėjimo variantas SNAP žymės, inžinerinio O6-alkilguanino-DNR alkiltransferazės, kuri kovalentiškai reaguoja su benzilguaninu konjuguotais substratais. Tai leidžia labai specifiskai ir universaliai fluorescenciniu būdu žymėti Nup133 gyvose arba fiksuotose ląstelėse, naudojant ląstelių pralaidžius arba nepralaidžius SNAP substratus. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 ląstelėse jungtinis baltymas lokalizuojasi branduolinėje apvalkale, būdingame branduolinių porų kompleksams. Kadangi žymėjimas vyksta endogeniniame lokuse, NPC stochiometrija ir architektūra yra minimaliai sutrikdyta, todėl šis modelis tinka kiekybinei superrezoliucijos mikroskopijai, vienos molekulės sekimui ir NPC surinkimo bei apykaitos kinetinei analizei.

Ši ląstelių linija suteikia tvirtą platformą branduolinio transporto, branduolinio-citoplazminio transporto dinamikos, NPC biogenezės interfazės metu ir postmitotinio branduolinio perrinkimo bei Y-komplekso struktūrinės organizacijos porų karkase tyrimams. U2OS fonas pasižymi plokščia morfologija ir dideliais branduoliais, palengvinančiais aukštos skiriamosios gebos vaizdavimą. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 ląstelės ypač tinka impulsų-persekiojimo žymėjimo eksperimentams, koreliatyviai šviesos ir elektronų mikroskopijai bei daugiakoloriniam vaizdavimui kartu su papildomais endogeniškai pažymėtais nukleoporiniais ar transporto veiksniais.

Organism Žmogus

Tissue Kaulas

Disease Osteosarkoma

Charakteristikos

Age 15 metų

Gender Moteris

Ethnicity Kaukazičių

Morphology Į epitelį panašus

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 ląstelės | 300666

Growth properties Prigludęs

Reguliavimo duomenys

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytion katalogo numeris 300666)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Ellenbergo laboratorija (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Šioje žmogaus osteosarkomos ląstelių linijoje (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) yra CRISPR įvesta SNAPf-Nup133 sintezė, leidžianti fluorescenciniu žymekliu žymėti Nup133 nukleoporiną. Įdėklas yra stabilus. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir gali skirtis kitose šalyse.

Biomolekuliniai duomenys

Protein expression Nup133, SNAPf žymuo

Tvarkymas

Culture Medium McCoys 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

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.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 ląstelės | 300666**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.

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 perkelkite 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 perkelkite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 ląstelės | 300666

Shipping Conditions

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelkite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug $-150\text{--}196\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Laikymas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.