

U2OS-CRISPR-NUP96-mKārtas šūnas | 300461

Vispārīga informācija

Description

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple ir ģenētiski modificēta osteosarkomas šūnu līnija, kas atvasināta no cilvēka U-2 OS šūnu līnijas, kas pazīstama ar savām spēcīgajām augšanas īpašībām un izmantojamību dažādos bioloģiskos pētījumos. Šis konkrētais klons ir modificēts, izmantojot CRISPR/Cas9 gēnu rediģēšanas tehnoloģiju, lai NUP96 gēnā iestrādātu mMaple - fotokonvertojamu fluorescējošu proteīnu. Proteīns mMaple ļauj izmantot progresīvas attēlveidošanas metodes, piemēram, dzīvās šūnas attēlveidošanu un superizšķirtspējas mikroskopiju, nodrošinot dinamisku ieskatu kodola poru kompleksa (NPC) uzvedībā un šūnu importa un eksporta mehānismos caur kodola apvalku.

NUP96 gēns, kas kodē svarīgu NPC komponentu, ir ļoti svarīgs nukleoplazmas transportam. NUP96 izmaiņas var ietekmēt ne tikai transporta mehānismus, bet arī vispārējo kodola arhitektūru un funkciju. Tādējādi šī šūnu līnija kalpo kā lielisks modelis ar NPC saistītu patoloģiju un kodola transporta lomas šūnu metabolismā un signalizācijā izpētei. mMaple integrēšana NUP96 ļauj reāllaika režīmā sekot līdzi NUP96 dinamikai un vizualizēt to in vivo, padarot to par neaizstājamu rīku pētniekiem, kas koncentrējas uz šūnu kodolu pētījumiem, un tiem, kas pēta NPC disfunkciju ietekmi uz tādām slimībām kā vēzis un vīrusu infekcijas.

Kā specializēts rīks U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple klons Nr. 16 atbalsta augstas izšķirtspējas attēlveidošanu un sniedz būtiskus datus par NPC komponentu telpisko un laika sadalījumu. Tas ir īpaši vērtīgs eksperimentos, kuros nepieciešama detalizēta gēnu ekspresijas, proteīnu lokalizācijas un kodola transporta analīze fizioloģiskos un patoloģiskos apstākļos, veicinot dziļāku izpratni par šūnu procesiem molekulārā līmenī.

Organism	Cilvēks
Tissue	Bone
Disease	Osteosarkoma

Raksturojums

Age	15 gadi
Gender	Sievietes
Ethnicity	Kaukāzietis
Growth properties	Adherent

Normatīvie dati

Citation	U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple (Cytion kataloga numurs 300461)
-----------------	--

U2OS-CRISPR-NUP96-mKārtas šūnas | 300461

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B7FK**Depositor** Ellenberga laboratorija (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Šī cilvēka osteosarkomas šūnu līnija (U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple, klons 16) satur CRISPR mediētu NUP96-mMaple fūziju, kas ļauj kodola poru struktūru marķēšanu ar fotokonvertoru. Konstrukts ir stabils. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un var atšķirties citur.**Biomolekulārie dati****Protein expression** NUP96-mMaple (endogēnais kodola poru kompleksa proteīns 96, marķēts ar mMaple)**Darbs ar****Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/l glikoze, w: stabils glutamīns, w: 2,0 mM nātrija piruvāts, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (Cytion izstrādājuma numurs 820200a)**Supplements** Papildināt barotni ar 10% FBS, 1% NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Noņem veco barotni no pielipušajām šūnām un mazgāt tās ar PBS, kurā nav kalcija un magnija. T25 kolbām izmantojiet 3-5 ml PBS, bet T75 kolbām - 5-10 ml. Pēc tam pilnībā pārklājat šūnas ar Accutase, izmantojot 1-2 ml T25 kolbām un 2,5 ml T75 kolbām. Ļaujiet šūnām inkubēties istabas temperatūrā 8-10 minūtes, lai tās atdalītos. Pēc inkubācijas uzmanīgi samaisiet šūnas ar 10 ml barotnes, lai tās atkārtoti suspendētu, pēc tam centrifugējiet 3 minūtes ar 300xg. Izmetiet supernatantu, atkārtoti suspendējiet šūnas svaigā barotnē un pārvietojiet tās jaunās kolbās, kurās jau ir svaiga barotne.**Seeding density** 1×10^4 šūnas/cm²**Fluid renewal** 2 līdz 3 reizes nedēļā**Freeze medium** Kā kriokonservēšanas barotni mēs izmantojam pilnvērtīgu augšanas barotni (ieskaitot FBS) + 10 % DMSO, lai nodrošinātu pietiekamu dzīvotspēju pēc atkausēšanas, vai CM-1 (Cytion kataloga numurs 800100), kas ietver optimizētus osmoprotektorus un metaboliskos stabilizatorus, lai uzlabotu atveseļošanas un samazinātu krioinducēto stresu.

U2OS-CRISPR-NUP96-mKārtas šūnas | 300461**Thawing and
Culturing Cells**

1. Pārliecinieties, ka pēc piegādes flakons paliek dziļi sasaldēts, jo šūnas tiek sūtītas uz sausā ledus, lai pārvadāšanas laikā saglabātu optimālu temperatūru.
2. Pēc saņemšanas vai nu nekavējoties uzglabāt kriovialu temperatūrā, kas zemāka par -150 °C, lai nodrošinātu šūnu integritātes saglabāšanu, vai arī turpināt 3. posmu, ja nepieciešama tūlītēja kultivēšana.
3. Tūlītējas kultivēšanas gadījumā ātri atkausējiet flakonu, iegremdējot to 37°C ūdens vannā ar tīru ūdeni un antibakteriālu līdzekli, viegli maisot 40-60 sekundes, līdz paliek neliels ledus gabaliņš.
4. Visas turpmākās darbības veiciet sterilos apstākļos plūsmas nosūcējā, pirms atvēršanas dezinficējot kriovialu ar 70% etanolu.
5. Uzmanīgi atveriet dezinficēto flakonu un pārnesiet šūnu suspensiju 15 ml centrifūgas mēģenē, kurā ir 8 ml istabas temperatūras barotnes, uzmanīgi samaisot.
6. Centrifugējiet maisījumu ar 300 x g 3 minūtes, lai atdalītu šūnas, un uzmanīgi izmetiet virskārtu, kas satur saldēšanas barotnes atlikumus.
7. Viegli resuspendēt šūnu granulas 10 ml svaigas barotnes. Adhēzijas šūnu gadījumā suspensiju sadalīt divās T25 kolbās; suspensijas kultūrām visu barotni pārnest vienā T25 kolbā, lai veicinātu efektīvu šūnu mijiedarbību un augšanu.
8. Ievērojiet noteiktos subkultūru protokolus, lai nodrošinātu nepārtrauktu šūnu līnijas augšanu un uzturēšanu, tādējādi nodrošinot uzticamus eksperimentu rezultātus.

**Incubation
Atmosphere**37°C, 5% CO_2 , mitrināta atmosfēra.**Flask Coating**

Neviens

**Freezing
Procedure**

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

U2OS-CRISPR-NUP96-mKārtas šūnas | 300461

Shipping Conditions

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

Storage Conditions

Ilgstošai uzglabāšanai flakonus ievietojiet šķidrā slāpekļī ar tvaika fāzi aptuveni -150 līdz -196 °C temperatūrā. Uzglabāšana -80 °C temperatūrā ir pieļaujama tikai kā īss starposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

Kvalitātes kontrole / Ģenētiskais profils / HLA

Sterility

Mikoplazmas piesārņojums tiek izslēgts, izmantojot gan uz PCR balstītus testus, gan uz luminiscenci balstītas mikoplazmas noteikšanas metodes.

Lai pārlicinātos, ka nav baktēriju, sēnīšu vai rauga piesārņojuma, šūnu kultūras katru dienu vizuāli pārbauda.