

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP šūnas | 300667

Vispārīga informācija

Description

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP ir genomā rediģēta cilvēka osteosarkomas šūnu līnija, kas iegūta no U2OS šūnām, kurās endogēnais TPR (Translocated Promoter Region) gēns ir modificēts, izmantojot CRISPR/Cas9 tehnoloģiju, lai kodētu in-frame SNAP tagu. TPR ir liels spirālveida nukleoportīns, kas lokalizējas kodola grozā kodola poru kompleksa (NPC) nukleoplazmatiskajā pusē. Marķējot TPR tā endogēnajā lokusā, fūzijas proteīns tiek ekspresēts saskaņā ar dabisko regulējošo kontroli, saglabājot fizioloģiskos ekspresijas līmeņus un uzturot pareizu iekļaušanu kodola groza struktūrā.

SNAP marķieris ļauj kovalenti marķēt TPR ar benzilguanīna konjugētiem fluorescējošiem substrātiem dzīvos vai fiksētos šūnos, nodrošinot ļoti specifisku un stabilu vizualizāciju. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP šūnās marķētais TPR parāda raksturīgu punktveida gredzenveida izkliedi kodola apvalkā, kas atbilst NPC saistītajām kodola groza struktūrām. Šī sistēma ir labi piemērota kvantitatīvai fluorescences mikroskopijai, superizšķirtspējas attēlveidošanai, impulsu-pakaļdzīšanas marķēšanai un dinamiskajiem pētījumiem par kodola groza montāžu un apgrozījumu. U2OS šūnu plakana morfoloģija un lieli kodoli atvieglo augstas izšķirtspējas attēlveidošanu kodola apvalka saistītajām struktūrām.

TPR spēlē izšķirošu lomu mRNA eksportā, kodola transporta regulācijā, hromatīna organizācijā kodola perifērijā un telpiskajā genoma organizācijā. TPR ir iesaistīts arī kodola transporta saistītu subkompartimentu veidošanā un heterohromatīna izslēgšanā no kodola poru saistītiem reģioniem. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP nodrošina fizioloģiski atbilstošu modeli kodola groza arhitektūras un dinamikas izpētei, nukleocitoplazmatiskās transporta mehānismu izpētei un kodola apvalka saistīto hromatīna mijiedarbību izpētei endogēnās ekspresijas apstākļos.

Organism Cilvēks

Tissue Bone

Disease Osteosarkoma

Metastatic site Primārā audzēja lokalizācija (kauls)

Applications Kodola groza bioloģija; TPR-mediēta mRNA eksportēšana; kodola un citoplazmas transporta regulācija; hromatīna organizācija kodola perifērijā; kodola transporta apakškompartimenti; genoma telpiskā organizācija; superizšķirtspējas mikroskopija; SNAP „pulse-chase” marķēšana; heterohromatīna izslēgšana no porām saistītiem reģioniem

Raksturojums

Age 15 gadi

Gender Sievietes

Ethnicity Kaukāzietis

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP šūnas | 300667

Morphology Epitēlijveidīgs

Cell type Epitelio šūnas (osteosarkoma)

Growth properties Adherent

Normatīvie dati

Citation U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytion kataloga numurs 300667)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession Nav piešķirts (CRISPR modificēts U2OS atvasinājums; sākotnējais U2OS CVCL_0042)

Depositor Ellenberga laboratorija (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Šī cilvēka osteosarkomas šūnu līnija (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) satur CRISPR inženierijas TPR-SNAP sintēzi, kas ļauj fluorescējoši un ķīmiski marķēt TPR kodola groza proteīnu. Konstrukts ir stabili integrēts. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un var atšķirties citur.

Biomolekulārie dati

Protein expression TPR, SNAP-tag

Darbs ar

Culture Medium McCoy's 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, 3,0 g/l glikozes, stabila glutamīnu, 2,0 mM nātrija piruvāta, 2,2 g/l NaHCO₃, 1% NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time aptuveni 24 līdz 36 stundas

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP šūnas | 300667

Subculturing Noņemt 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 pārklājiet 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.

Split ratio no 1 līdz 3

Seeding density 1 līdz 3×10^4 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 atveseļošanos un samazinātu krioinducēto stresu.

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP šūnas | 300667**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 šķidruma 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-TPR-SNAP šūnas | 300667

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.