

U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP šūnas | 300174

Vispārīga informācija

Description

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP ir ģenētiski modificēta šūnu līnija, kas iegūta no cilvēka osteosarkomas U-2 OS cilmes līnijas. Šajā šūnu līnijā NUP96 gēna lokusā ir mērķtiecīgi ievietota monomēra uzlabota zaļā fluorescējošā proteīna (mEGFP) marķierzīme, kas iegūta, izmantojot CRISPR-Cas9 gēnu rediģēšanas tehnoloģiju. NUP96, kas ir daļa no kodola poru kompleksa, ir būtisks kodola transportam, un tā saplūšana ar mEGFP ļauj reāllaikā vizualizēt kodola poru dinamiku fluorescences mikroskopijā, sniedzot vērtīgu ieskatu par kodola transporta mehānismiem un nukleocitoplazmas apriti.

Šis īpašais klons ar numuru 195 ir atlasīts, lai nodrošinātu stabilu NUP96-mEGFP saplūšanas proteīna ekspresiju un saglabātu U-2 OS līnijai raksturīgās īpašības, tostarp spēcīgu citoskeleta struktūru, kas ir ļoti svarīga pētījumos saistībā ar vēža šūnu migrāciju un metastāzēm. CRISPR tehnoloģijas izmantošana nodrošina precīzu gēnu rediģēšanu, līdz minimumam samazinot blakussaskares efektus, kas varētu apdraudēt eksperimenta rezultātu integritāti. Tāpēc U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP klons Nr. 195 ir īpaši noderīgs augstas izšķirtspējas attēlveidošanas metodēm un detalizētiem šūnu arhitektūras pētījumiem, kas palīdz veikt progresīvus pētījumus šūnu bioloģijā, vēža izpētē un kodola transporta parādībās.

Organism

Cilvēks

Tissue

Bone

Disease

Osteosarkoma

Raksturojums

Age

15 gadi

Gender

Sievietes

Ethnicity

Kaukāzietis

Morphology

Epitēlijveidīgs

Growth properties

Adherent

Normatīvie dati

Citation

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP klons Nr. 195 (Cytion kataloga numurs 300174)

Biosafety level

1

U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP šūnas | 300174

NCBI_TaxID 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B7FJ**Depositor** Ellenberga laboratorija (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Šī cilvēka osteosarkomas šūnu līnija (U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP, klons 195) satur CRISPR inženierijas NUP96-mEGFP sintēzi, kas ieviesta ar lentivīrusu piegādi, ļaujot fluorescējoši izsekot kodola poru kompleksiem. Modifikācija ir stabili integrēta. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un var atšķirties citur.**Biomolekulārie dati****Protein expression** MEGFP (kodola poru kompleksa proteīns 96, ar mEGFP marķējumu)**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** 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.**Seeding density** 2 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-NUP96-mEGFP šūnas | 300174

**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-mEGFP šūnas | 300174

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.