

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 šūnas | 300666

Vispārīga informācija

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 ir ģenētiski modificēta cilvēka osteosarkomas šūnu līnija, kas iegūta no vecāku U2OS fona, kurā endogēnais NUP133 lokuss ir modificēts, izmantojot CRISPR/Cas9 mediētu genoma rediģēšanu, lai kodētu C-terminālo SNAPf tagu. NUP133 ir Y-kompleksa (NUP107-160 kompleksa) galvenā sastāvdaļa, strukturāls subkomplekss, kas ir būtisks kodola poru kompleksa (NPC) veidošanai un uzturēšanai. Ieviešot SNAPf kodējošo sekvenci endogēnajā lokusā, fūzijas proteīns tiek ekspresēts saskaņā ar dabisko regulējošo kontroli, saglabājot fizioloģiskos ekspresijas līmeņus un subcelulāro lokalizāciju.

SNAPf marķieris ir ātrs SNAP marķiera variants, inženierijas O6-alkilguanīna-DNS alkiltransferāze, kas kovalenti reaģē ar benzilguanīna konjugātiem substrātiem. Tas ļauj veikt ļoti specifisku un daudzpusīgu Nup133 fluorescento marķēšanu dzīvos vai fiksētās šūnās, izmantojot šūnu caurlaidīgus vai necaurlaidīgus SNAP substrātus. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 šūnās fūzijas proteīns lokalizējas kodola apvalkā punktveida modeļi, kas ir raksturīgi kodola poru kompleksiem. Tā kā marķēšana notiek endogēnā lokusā, NPC stehiometrija un arhitektūra tiek minimāli traucēta, padarot šo modeli piemērotu kvantitatīvai superizšķirtspējas mikroskopijai, vienmolekulu izsekošanai un NPC montāžas un apgrozījuma kinētiskai analīzei.

Šī šūnu līnija nodrošina stabilu platformu kodola transporta, nukleocitoplazmatiskās satiksmes dinamikas, NPC biogēzes interfāzes un postmitotiskās kodola atkārtotās montāžas laikā, kā arī Y-kompleksa strukturālās organizācijas poru skeleta ietvaros pētīšanai. U2OS fons piedāvā plakanu morfoloģiju un lielus kodolus, kas atvieglo augstas izšķirtspējas attēlveidošanu. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 šūnas ir īpaši piemērotas impulsu-pakaļdzīšanas marķēšanas eksperimentiem, korelatīvai gaismas un elektronu mikroskopijai un daudzkrāsu attēlveidošanas pieejām kombinācijā ar papildu endogēni marķētiem nukleoporīniem vai transporta faktoriem.

Organism

Cilvēks

Tissue

Bone

Disease

Osteosarkoma

Metastatic site

Primārā audzēja lokalizācija (kauls)

Applications

Kodola poru kompleksa (NPC) bioloģija; Nup133/Y-kompleksa arhitektūra; NPC biogēze; nukleocitoplazmatiskais transports; superizšķirtspējas mikroskopija (STORM/PALM/STED); atsevišķu daļiņu izsekošana; impulsu-pakaļdzīšanas SNAP marķēšana; korelatīvā gaismas un elektronu mikroskopija; kvantitatīvā NPC stehiometrija

Raksturojums

Age

15 gadi

Gender

Sievietes

Ethnicity

Kaukāzietis

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 šūnas | 300666

Morphology Epitēlijveidīgs

Cell type Epitelio šūnas (osteosarkoma)

Growth properties Adherent

Normatīvie dati

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytion kataloga numurs 300666)

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-SNAPf-Nup133) satur CRISPR ieviestu SNAPf-Nup133 fūziju, kas ļauj fluorescējoši marķēt Nup133 nukleoporīnu. Ievietojums ir stabils. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un var atšķirties citur.

Biomolekulārie dati

Protein expression Nup133, SNAPf-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, stabilu 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-SNAPf-Nup133 šūnas | 300666

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-SNAPf-Nup133 šūnas | 300666**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-SNAPf-Nup133 šūnas | 300666

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.