

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-cellen | 300666

Algemene informatie

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 is een genetisch gemanipuleerde menselijke osteosarcoomcellijn afgeleid van de oorspronkelijke U2OS-achtergrond, waarin de endogene NUP133-locus is gemodificeerd met behulp van CRISPR/Cas9-gemedieerde genoombewerking om een C-terminale SNAPf-tag te coderen. NUP133 is een kerncomponent van het Y-complex (NUP107-160-complex), een structureel subcomplex dat essentieel is voor de assemblage en het onderhoud van het nucleaire poriëcomplex (NPC). Door de SNAPf-coderende sequentie in-frame in de endogene locus te introduceren, wordt het fusie-eiwit onder natuurlijke regulerende controle tot expressie gebracht, waardoor de fysiologische expressieniveaus en subcellulaire lokalisatie behouden blijven.

De SNAPf-tag is een snel labelende variant van de SNAP-tag, een gemanipuleerd O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase dat covalent reageert met benzylguanine-geconjugeerde substraten. Dit maakt een zeer specifieke en veelzijdige fluorescerende labeling van Nup133 in levende of gefixeerde cellen mogelijk met behulp van celpermeabele of impermeabele SNAP-substraten. In U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-cellen lokaliseert het fusie-eiwit zich in de kernmembraan in een puntvormig patroon dat kenmerkend is voor nucleaire poriëncomplexen. Omdat de tagging plaatsvindt op de endogene locus, worden de stoichiometrie en architectuur van NPC minimaal verstoord, waardoor dit model geschikt is voor kwantitatieve superresolutiemicroscopie, het volgen van afzonderlijke moleculen en kinetische analyses van NPC-assemblage en -omzet.

Deze cellijn biedt een robuust platform voor het bestuderen van nucleair transport, nucleocytoplasmatisch transport, NPC-biogenese tijdens interfase en postmitotische nucleaire herassemblage, en de structurele organisatie van het Y-complex binnen het poriënraamwerk. De U2OS-achtergrond biedt een vlakke morfologie en grote kernen, wat beeldvorming met hoge resolutie vergemakkelijkt. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-cellen zijn bijzonder geschikt voor pulse-chase-labeling-experimenten, correlatieve licht- en elektronenmicroscopie en multicolor beeldvorming in combinatie met aanvullende endogeen gelabelde nucleoporines of transportfactoren.

Organism Mens

Tissue Bot

Disease Osteosarcoom

Metastatic site Locatie van de primaire tumor (bot)

Applications Biologie van het nucleaire poriëncomplex (NPC); architectuur van het Nup133/Y-complex; NPC-biogenese; nucleocytoplasmatisch transport; superresolutiemicroscopie (STORM/PALM/STED); tracking van afzonderlijke deeltjes; pulse-chase SNAP-labeling; correlatieve licht- en elektronenmicroscopie; kwantitatieve NPC-stoichiometrie

Kenmerken

Age 15 jaar

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-cellen | 300666

Gender Vrouw

Ethnicity Kaukasisch

Morphology Epitheelachtig

Cell type Epitheelcellen (osteosarcoom)

Growth properties Aanhangend

Regelgevende gegevens

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytion catalogusnummer 300666)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession Niet toegewezen (met CRISPR gemodificeerd U2OS-derivaat; ouderlijke U2OS CVCL_0042)

Depositor Het Ellenberg Lab (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Deze menselijke osteosarcoomcellijn (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) bevat een CRISPR-geïntroduceerde SNAPf-Nup133-fusie, die fluorescente markering van de nucleoporine Nup133 mogelijk maakt. Het insert is stabiel aanwezig. Deze classificatie is alleen van toepassing binnen Duitsland en kan elders afwijken.

Biomoleculaire gegevens

Protein expression Nup133, SNAPf-tag

Omgaan met

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucose, w: stabiel Glutamine, w: 2,0 mM Natriumpyruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (Cytion artikelnummer 820200a)

Supplements Vul het medium aan met 10% FBS, 3,0 g/L Glucose, stabiele Glutamine, 2,0 mM Natriumpyruvaat, 2,2 g/L NaHCO₃, 1% NEAA

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-cellen | 300666

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time ongeveer 24 tot 36 uur

Subculturing Verwijder het oude medium van de adherente cellen en was ze met PBS zonder calcium en magnesium. Gebruik voor T25-flesjes 3-5 ml PBS en voor T75-flesjes 5-10 ml. Bedek de cellen vervolgens volledig met Accutase, met 1-2 ml voor T25-flesjes en 2,5 ml voor T75-flesjes. Laat de cellen gedurende 8-10 minuten bij kamertemperatuur incuberen om ze los te maken. Na incubatie de cellen voorzichtig mengen met 10 ml medium om ze te resuspenden en vervolgens centrifugeren bij 300xg gedurende 3 minuten. Gooi het supernatant weg, resuspendeer de cellen in vers medium en breng ze over in nieuwe kolven die al vers medium bevatten.

Split ratio 1 tot en met 3

Seeding density 1 tot 3×10^4 cellen/cm²

Fluid renewal 2 tot 3 keer per week

Freeze medium Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimedum (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-cellen | 300666

Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij $300 \times g$ om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , bevochtigde atmosfeer.

Flask Coating

Geen

Freezing Procedure

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-cellen | 300666

Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Kwaliteitscontrole / Genetisch profiel / HLA

Sterility

Mycoplasma-verontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasma-detectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.