

Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448

Informacje ogólne

Description

U-2 OS-CRISPR-NUP96-Halo to genetycznie zmodyfikowana linia komórkowa pochodząca z ludzkich komórek kostniakomięsaka U-2 OS. Ta linia komórkowa została zmodyfikowana przy użyciu technologii CRISPR-Cas9 w celu włączenia HaloTag w locus genu NUP96. NUP96, część kompleksu porów jądrowych, odgrywa kluczową rolę w transporcie jądrowym i regulacji komórkowej. Wprowadzenie HaloTag pozwala na precyzyjną wizualizację i biochemiczną charakterystykę dynamiki i interakcji NUP96 w komórce.

Ułatwiając kowalencyjne przyłączanie ligandów fluorescencyjnych lub innych sond, HaloTag umożliwia obrazowanie w czasie rzeczywistym i stanowi potężne narzędzie do badania mechanizmów transportu jądrowego w żywych komórkach. Ten konkretny klon, o numerze 252, został wybrany ze względu na stabilną ekspresję znakowanego HaloTag NUP96, zapewniając spójną wydajność w konfiguracjach eksperymentalnych. Ta cecha sprawia, że jest on bardzo odpowiedni do technik obrazowania o wysokiej rozdzielczości i badań interakcji molekularnych, wspierając w ten sposób zaawansowane badania w biologii komórkowej, szczególnie w kontekście funkcji jądrowej i regulacji genetycznej.

Organism

Człowiek

Tissue

Kość

Disease

Mięsak kościopochodny

Charakterystyka

Age

15 lat

Gender

Kobieta

Ethnicity

Kaukaski

Morphology

Podobny do nabłonka

Growth properties

Adherent

Dane regulacyjne

Citation

U-2 OS-CRISPR-NUP96-Halo (numer katalogowy Cytion 300448)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448

CellosaurusAccession CVCL_B7FI

Depositor Laboratorium Ellenberg (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Ta ludzka linia komórek kostniakomięsaka (U2OS-CRISPR-NUP96-Halo, klon 252) zawiera fuzję NUP96-Halo edytowaną za pomocą CRISPR, generowaną poprzez dostarczanie lentiwirusowe, umożliwiając fluorescencyjne znakowanie kompleksów porów jądrowych. Modyfikacja jest stabilnie zintegrowana. Ta klasyfikacja ma zastosowanie tylko w Niemczech i może się różnić w innych krajach.

Dane biomolekularne

Protein expression NUP96-Halo (endogenne białko kompleksu porów jądrowych 96, znakowane Halo)

Obsługa

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukozy, w: stabilna glutamina, w: 2,0 mM pirogronianu sodu, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (numer artykułu Cytion 820200a)

Supplements Uzupełnić podłoże 10% FBS

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Split ratio Zalecany jest stosunek 1:3 do 1:4

Seeding density 1×10^4 kom^{órek}/cm²

Fluid renewal 2 do 3 razy w tygodniu

Freeze medium Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448**Thawing and
Culturing Cells**

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $300 \times g$ przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawiesinowych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Flask Coating

Brak

**Freezing
Procedure**

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolkę do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448

Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C. Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości i analiza molekularna

Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.

Profil STR

CSF1PO: 13,14
D13S317: 13,13
D16S539: 9,11
D5S818: 11,12
D7S820: 11,12
TH01: 9,3,9,3
TPOX: 11,12
vWA: 14,18
D3S1358: 16,16
D21S11: 31,32
D18S51: 12,14
Penta E: 10,13
Penta D: 9,9
D8S1179: 12,14
FGA: 20,20

Allele HLA

A*: '02:01:01, '32:01:01
B*: '44:02:01, '44:27:01
C*: '05:01:01, '07:04:01
DRB1*: '09:01:02G, '14:54:01
DQA1*: '01:04:01, '03:02:01
DQB1*: '03:03:02, '05:03:01
DPB1*: '02:01:02, '04:01:01
E: '01:01:01