

Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Informacje ogólne

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 to genetycznie zmodyfikowana linia komórek ludzkiego osteosarcoma pochodząca z macierzystego tła U2OS, w której endogenny locus NUP133 został zmodyfikowany za pomocą edycji genomu za pomocą CRISPR/Cas9 w celu zakodowania tagu C-terminalnego SNAPf. NUP133 jest podstawowym składnikiem kompleksu Y (kompleksu NUP107-160), podkompleksu strukturalnego niezbędnego do tworzenia i utrzymania kompleksu porów jądrowych (NPC). Dzięki wprowadzeniu sekwencji kodującej SNAPf w ramce odczytu w endogennym locus, białko fuzyjne jest wyrażane pod kontrolą naturalnych mechanizmów regulacyjnych, zachowując fizjologiczne poziomy ekspresji i lokalizację subkomórkową.

Tag SNAPf jest szybko znakującym wariantem tagu SNAP, inżynierijnej O6-alkilguaniny-DNA alkyltransferazy, która reaguje kowalencyjnie z substratami sprzężonymi z benzyloguaniną. Umożliwia to wysoce specyficzne i wszechstronne znakowanie fluorescencyjne Nup133 w żywych lub utrwalonych komórkach przy użyciu substratów SNAP przenikających lub nieprzenikających przez komórki. W komórkach U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 białko fuzyjne lokalizuje się w otocze jądrowej w postaci charakterystycznych dla kompleksów porów jądrowych punktów. Ponieważ znakowanie odbywa się w endogenicznym locus, stechiometria i architektura NPC są minimalnie zaburzone, co sprawia, że model ten nadaje się do ilościowej mikroskopii superrozdzielczej, śledzenia pojedynczych cząsteczek oraz analiz kinetycznych montażu i obrotu NPC.

Ta linia komórkowa stanowi solidną platformę do badania transportu jądrowego, dynamiki transportu jądrowo-cytoplazmatycznego, biogenezy NPC podczas interfazy i ponownego montażu jądra po mitozie oraz organizacji strukturalnej kompleksu Y w szkielecie porów. Tło U2OS oferuje płaską morfologię i duże jądra, ułatwiając obrazowanie w wysokiej rozdzielczości. Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 są szczególnie dobrze dostosowane do eksperymentów znakowania metodą pulse-chase, korelacyjnej mikroskopii świetlnej i elektronowej oraz wielobarwnego obrazowania w połączeniu z dodatkowymi endogenicznie znakowanymi nukleoporinami lub czynnikami transportowymi.

Organism Człowiek

Tissue Kość

Disease Mięsak kościopochodny

Charakterystyka

Age 15 lat

Gender Kobieta

Ethnicity Kaukaski

Morphology Podobny do nabłonka

Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Growth properties Adherent

Dane regulacyjne

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (numer katalogowy Cytion 300666)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Laboratorium Ellenberg (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Ta ludzka linia komórek kostniakomięsaka (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) zawiera wprowadzoną przez CRISPR fuzję SNAPf-Nup133, umożliwiającą fluorescencyjne znakowanie nukleoporyny Nup133. Wstawka jest stabilnie obecna. Ta klasyfikacja ma zastosowanie tylko w Niemczech i może się różnić w innych krajach.

Dane biomolekularne

Protein expression Nup133, SNAPf-tag

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 Uzupelnic pożywkę o 10% FBS, 3,0 g/l glukozy, stabilną glutaminę, 2,0 mM pirogronianu sodu, 2,2 g/l NaHCO₃, 1% NEAA

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. Odrzucić supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666**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.

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

Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

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 fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

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 / Profil genetyczny / HLA

Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczone 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.