

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP Hücreleri | 300667

Genel bilgi

Description

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP, endojen TPR (Translocated Promoter Region) geninin CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak bir in-frame SNAP etiketi kodlayacak şekilde modifiye edildiği, U2OS hücrelerinden türetilmiş, genomu düzenlenmiş bir insan osteosarkom hücre hattıdır. TPR, nükleer gözenek kompleksinin (NPC) nükleoplazmik tarafındaki nükleer sepete lokalize olan büyük bir sarmal sarmal nükleoporindir. TPR'yi endojen lokusunda etiketleyerek, füzyon proteini doğal düzenleyici kontrol altında eksprese edilir, fizyolojik ekspresyon seviyeleri korunur ve nükleer sepet yapısına uygun şekilde dahil edilmesi sağlanır.

SNAP etiketi, canlı veya sabit hücrelerde TPR'nin benzilguanin konjuge floresan substratlarla kovalent etiketlenmesini sağlayarak, yüksek düzeyde spesifik ve stabil görselleştirme imkanı sunar. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP hücrelerinde, etiketlenmiş TPR, NPC ile ilişkili nükleer sepet yapılarına karşılık gelen, nükleer zarfta karakteristik noktalı halka benzeri bir dağılım gösterir. Bu sistem, kantitatif floresan mikroskopi, süper çözünürlüklü görüntüleme, puls-chase etiketleme ve nükleer sepet montajı ve dönüşümünün dinamik çalışmaları için çok uygundur. U2OS hücrelerinin düz morfolojisi ve büyük çekirdekleri, nükleer zarf ile ilişkili yapıların yüksek çözünürlüklü görüntülenmesini kolaylaştırır.

TPR, mRNA ihracı, nükleer taşıma düzenlemesi, nükleer çevrede kromatin organizasyonu ve uzamsal genom organizasyonunda kritik roller oynar. TPR ayrıca nükleer taşıma ile ilişkili alt bölmelerin oluşumunda ve heterokromatinin nükleer gözenekle ilişkili bölgelerden dışlanmasında rol oynar. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP, nükleer sepetin mimarisini ve dinamiklerini incelemek, nükleositolplazmik taşıma mekanizmalarını araştırmak ve endojen ekspresyon koşulları altında nükleer zarfta ilişkili kromatin etkileşimlerini incelemek için fizyolojik olarak ilgili bir model sağlar.

Organism

İnsan

Tissue

Kemik

Disease

Osteosarkom

Metastatic site

Birincil tümör yeri (kemik)

Applications

Nükleer sepet biyolojisi; TPR aracılı mRNA ihracı; nükleositolplazmik taşıma düzenlemesi; nükleer çevrede kromatin organizasyonu; nükleer taşıma alt bölmeleri; genomun uzamsal organizasyonu; süper çözünürlüklü mikroskopi; SNAP puls-chase etiketleme; gözeneklerle ilişkili bölgelerden heterokromatin dışlanması

Özellikler

Age

15 yıl

Gender

Kadın

Ethnicity

Kafkas

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP Hücreleri | 300667

Morphology Epitel benzeri

Cell type Epitel hücreleri (osteosarkom)

Growth properties Yapışık

Düzenleyici Veriler

Citation U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytion katalog numarası 300667)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession Atanmamış (CRISPR ile modifiye edilmiş U2OS türevi; ana U2OS CVCL_0042)

Depositor Ellenberg Laboratuvarı (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Bu insan osteosarkom hücre hattı (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP), TPR nükleer sepet proteininin floresan ve kimyasal etiketlenmesini sağlayan CRISPR ile tasarlanmış bir TPR-SNAP füzyonu içerir. Yapı stabil olarak entegre edilmiştir. Bu sınıflandırma sadece Almanya içinde geçerlidir ve başka yerlerde farklılık gösterebilir.

Biyomoleküler Veriler

Protein expression TPR, SNAP etiketi

Elleçleme

Culture Medium McCoy's 5a, w: 3.0 g/L Glukoz, w: stabil Glutamin, w: 2.0 mM Sodyum piruvat, w: 2.2 g/L NaHCO₃ (Cytion makale numarası 820200a)

Supplements Ortamı %10 FBS, 3,0 g/L Glukoz, stabil Glutamin, 2,0 mM Sodyum piruvat, 2,2 g/L NaHCO₃, %1 NEAA ile takviye edin

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time yaklaşık 24 ila 36 saat

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP Hücreleri | 300667

Subculturing Yapışık hücrelerden eski ortamı çıkarın ve kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile yıkayın. T25 şişeleri için 3-5 ml PBS ve T75 şişeleri için 5-10 ml kullanın. Ardından, T25 flasklar için 1-2 ml ve T75 flasklar için 2,5 ml kullanarak hücreleri Accutase ile tamamen kaplayın. Hücreleri ayırmak için oda sıcaklığında 8-10 dakika inkübasyona bırakın. İnkübasyondan sonra, hücreleri yeniden süspansiyon etmek için 10 ml besiyeriyle hafifçe karıştırın, ardından 300xg'de 3 dakika santrifüjleyin. Süpernatantı atın, hücreleri taze besiyerinde yeniden süspansiyon edin ve zaten taze besiyeri içeren yeni şişelere aktarın.

Split ratio 1'den 3'e kadar

Seeding density 1 ila 3×10^4 hücre/cm²

Fluid renewal haftada 2 ila 3 kez

Freeze medium Kriyoprezervasyon ortamı olarak, yeterli çözülme sonrası canlılık için tam büyüme ortamı (FBS dahil) + %10 DMSO veya iyileşmeyi artırmak ve kriyo-indüklenmiş stresi azaltmak için optimize edilmiş ozmoprotektanlar ve metabolik stabilizatörler içeren CM-1 (Cytion katalog numarası 800100) kullanıyoruz.

Thawing and Culturing Cells

1. Hücreler taşıma sırasında optimum sıcaklıkları korumak için kuru buz üzerinde gönderildiğinden, flakonun teslimat sırasında derin dondurulmuş halde kaldığını teyit edin.
2. Teslim aldıktan sonra, hücresel bütünlüğün korunmasını sağlamak için kriyovialı hemen -150°C'nin altındaki sıcaklıklarda saklayın veya hemen kültürleme gerekiyorsa 3. adıma geçin.
3. Derhal kültürleme için flakonun temiz su ve antimikrobiyal bir madde içeren 37°C'lik bir su banyosuna daldırıp küçük bir buz kümesi kalana kadar 40-60 saniye boyunca hafifçe çalkalayarak hızlıca çözün.
4. Sonraki tüm adımları steril koşullar altında bir akış başlığı içinde gerçekleştirin ve açmadan önce kriyoviyalleri %70 etanol ile dezenfekte edin.
5. Dezenfekte edilmiş flakonun dikkatlice açın ve hücre süspansiyonunu 8 ml oda sıcaklığında kültür ortamı içeren 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarın ve hafifçe karıştırın.
6. Hücreleri ayırmak için karışımı 300 x g'de 3 dakika santrifüjleyin ve artık dondurma ortamı içeren süpernatantı dikkatlice atın.
7. Hücre pelletini 10 ml taze kültür ortamında yavaşça yeniden süspansiyon edin. Yapışık hücreler için, süspansiyonu iki T25 kültür şişesi arasında bölün; süspansiyon kültürleri için, etkili hücre etkileşimini ve büyümesini teşvik etmek üzere tüm ortamı tek bir T25 şişesine aktarın.
8. Hücre hattının sürekli büyümesi ve bakımı için belirlenmiş alt kültür protokollerine uyun ve güvenilir deneysel sonuçlar elde edin.

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP Hücreleri | 300667

Incubation Atmosphere 37°C, %5_{CO2}, nemlendirilmiş atmosfer.

Flask Coating Yok

Freezing Procedure Kriyoprezerve edilmiş hücre hatları, nakliye boyunca yaklaşık -78 °C'yi korumak için yeterli soğutucu akışkan içeren, onaylanmış, yalıtılmış ambalajlarda kuru buz üzerinde gönderilir. Teslim aldığınızda, kabı hemen inceleyin ve flakonları gecikmeden uygun depoya aktarın.

Shipping Conditions Kriyoprezerve edilmiş hücre hatları, nakliye boyunca yaklaşık -78 °C'yi korumak için yeterli soğutucu akışkan içeren, onaylanmış, yalıtılmış ambalajlarda kuru buz üzerinde gönderilir. Teslim aldığınızda, kabı hemen inceleyin ve flakonları gecikmeden uygun depoya aktarın.

Storage Conditions Uzun süreli muhafaza için flakonları yaklaşık -150 ila -196 °C'de buhar fazlı sıvı nitrojen içine yerleştirin. 80 °C'de saklama yalnızca sıvı nitrojene aktarılmadan önce kısa bir ara adım olarak kabul edilebilir.

Kalite kontrol / Genetik profil / HLA

Sterility Mikoplazma kontaminasyonu hem PCR tabanlı tahliller hem de lüminesans tabanlı mikoplazma tespit yöntemleri kullanılarak dışlanır.

Bakteriyel, fungal veya maya kontaminasyonu olmadığından emin olmak için hücre kültürleri günlük görsel incelemelere tabi tutulur.