

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 Hücreleri | 300666

Genel bilgi

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, ebeveyn U2OS arka planından türetilmiş, genetik olarak mühendislik uygulanmış bir insan osteosarkom hücre hattıdır. Bu hücre hattında, endojen NUP133 lokusu, CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme kullanılarak C-terminal SNAPf etiketini kodlayacak şekilde modifiye edilmiştir. NUP133, nükleer por kompleksi (NPC) montajı ve bakımı için gerekli olan yapısal bir alt kompleks olan Y-kompleksinin (NUP107-160 kompleksi) temel bir bileşenidir. SNAPf kodlama dizisini endojen lokusa çerçeve içinde sokarak, füzyon proteini doğal düzenleyici kontrol altında ifade edilir ve fizyolojik ifade seviyeleri ve subselüler lokalizasyon korunur.

SNAPf etiketi, benzyguánin konjuge substratlarla kovalent reaksiyona giren, mühendislik ürünü bir O6-alkilguánin-DNA alkiltransferaz olan SNAP etiketinin hızlı etiketleme varyantıdır. Bu, hücre geçirgen veya geçirgen olmayan SNAP substratları kullanılarak canlı veya sabit hücrelerde Nup133'ün yüksek oranda spesifik ve çok yönlü floresan etiketlemesini mümkün kılar. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 hücrelerinde, füzyon proteini, nükleer gözenek komplekslerinin karakteristik noktalı deseninde nükleer zarfta lokalize olur. Etiketleme endojen lokusta gerçekleştiğinden, NPC stokiyometrisi ve mimarisi minimum düzeyde bozulur, bu da bu modeli kantitatif süper çözünürlüklü mikroskopi, tek molekül izleme ve NPC montajı ve dönüşümünün kinetik analizleri için uygun hale getirir.

Bu hücre hattı, nükleer taşıma, nükleositoloplazmik trafik dinamikleri, interfaz ve post-mitotik nükleer yeniden birleşme sırasında NPC biyogenezi ve gözenek iskeleti içindeki Y-kompleksinin yapısal organizasyonunu incelemek için sağlam bir platform sağlar. U2OS arka planı, düz morfoloji ve büyük çekirdekler sunarak yüksek çözünürlüklü görüntülemeyi kolaylaştırır. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 hücreleri, ek endojen etiketli nükleoporinler veya taşıma faktörleri ile birlikte puls-chase etiketleme deneyleri, korelatif ışık ve elektron mikroskobu ve çok renkli görüntüleme yaklaşımları için özellikle uygundur.

Organism

İnsan

Tissue

Kemik

Disease

Osteosarkom

Özellikler

Age

15 yıl

Gender

Kadın

Ethnicity

Kafkas

Morphology

Epitel benzeri

Growth properties

Yapışık

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 Hücreleri | 300666**Düzenleyici Veriler**

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytion katalog numarası 300666)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenberg Laboratuvarı (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Bu insan osteosarkom hücre hattı (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133), Nup133 nükleoporininin floresan etiketlenmesini sağlayan CRISPR ile tanımlanan bir SNAPf-Nup133 füzyonu içerir. Ek parça stabil olarak mevcuttur. Bu sınıflandırma sadece Almanya içinde geçerlidir ve başka yerlerde farklılık gösterebilir.

Biyomoleküler Veriler

Protein expression	Nup133, SNAPf-tag
---------------------------	-------------------

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 NaHCO ₃ (Cytion makale numarası 820200a)
Supplements	Ortamı %10 FBS, 3,0 g/L Glukoz, stabil Glutamin, 2,0 mM Sodyum piruvat, 2,2 g/L NaHCO ₃ , %1 NEAA ile takviye edin
Dissociation Reagent	Accutase
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.
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.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 Hücreleri | 300666**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 flakonu 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 flakonu 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 peletini 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.

**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.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 Hücreleri | 300666

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.