Product sheet

Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Загальна інформація

Description	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 — це генетично модифікована лінія клітин остеосаркоми людини, отримана з батьківської лінії U2OS, в якій ендогенний локус NUP133 був модифікований за допомогою редагування геному за допомогою CRISPR/Cas9 для кодування C-кінцевого тегу SNAPf. NUP133 є основним компонентом Y-комплексу (комплекс NUP107-160), структурного субкомплексу, необхідного для складання та підтримки ядерного пористого комплексу (NPC). Шляхом введення кодуючої послідовності SNAPf в ендогенний локус, фузійний білок експресується під нативним регуляторним контролем, зберігаючи фізіологічні рівні експресії та субклітинну локалізацію. Мітка SNAPf є варіантом швидкого маркування мітки SNAP, інженерно сконструйованої O6-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансферази, яка ковалентно реагує з бензилгуанін-кон'югованими субстратами. Це дозволяє здійснювати високоспецифічне та універсальне флуоресцентне маркування Nup133 у живих або фіксованих клітинах за допомогою клітинно-проникних або непроникних субстратів SNAP. У клітинах U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 фузійний білок локалізується в ядерній оболонці у вигляді крапчастих утворень, характерних для ядерних пористих комплексів. Оскільки мічення відбувається в ендогенному локусі, стехіометрія та архітектура NPC мінімально порушуються, що робить цю модель придатною для кількісної мікроскопії надвисокої роздільної здатності, відстеження окремих молекул та кінетичного аналізу складання та обороту NPC. Ця клітинна лінія забезпечує надійну платформу для вивчення ядерного транспорту, динаміки ядерно-цитоплазматичного трафіку, біогенезу NPC під час інтерфази та постмітотичного ядерного перезбирання, а також структурної організації Y-комплексу в пористій каркасі. Фон U2OS забезпечує плоску морфологію та великі ядра, що полегшує отримання зображень з високою роздільною здатністю. Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 особливо добре підходять для експериментів з міткою імпульс-переслідування, кореляційної світлової та електронної мікроскопії, а також багатоколірних методів візуалізації в поєднанні з додатковими ендогенно міченими нуклеопоринами або транспортними факторами.
Organism	Людина
Tissue	Кость
Disease	Остеосаркома
Metastatic site	Локалізація первинної пухлини (кістка)
Applications	Біологія ядерно-порового комплексу (NPC); архітектура комплексу Nup133/Y; біогенез NPC; ядерно-цитоплазматичний транспорт; мікроскопія надвисокої роздільної здатності (STORM/PALM/STED); відстеження окремих частинок; мічення методом «пульс-чейз» за допомогою SNAP; кореляційна світлова та електронна мікроскопія; кількісна стехіометрія NPC

Характеристики

Age	15 років

Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Gender	Жінка
Ethnicity	Кавказець
Morphology	Епітеліальноподібні
Cell type	Епітеліальні клітини (остеосаркома)
Growth properties	Адепт

Нормативні дані

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (номер за каталогом Cytion 300666)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Не визначено (похідна лінії U2OS, модифікована за допомогою CRISPR; батьківська лінія U2OS CVCL_0042)
Depositor	Лабораторія Елленберга (EMBL)
GMO Status	ГМО-S1: Ця лінія клітин остеосаркоми людини (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) містить злиття SNAPf-Nup133, введене за допомогою CRISPR, що дозволяє флуоресцентне мічення нуклеопорину Nup133. Вставка стабільно присутня. Ця класифікація застосовується лише в Німеччині і може відрізнятися в інших країнах.

Біомолекулярні дані

Protein expression	Nup133, SNAPf-тег

Обробка

Culture Medium	McCoys 5a, w: 3,0 г/л Глюкоза, w: стабільна Глютамін, w: 2,0 мМ Піруват натрію, w: 2,2 г/л NaHCO3 (Cytion article number 820200a)
Supplements	Додайте до середовища 10% FBS, 3,0 г/л глюкози, стабільний глютамін, 2,0 мМ пірувату натрію, 2,2 г/л NaHCO3, 1% NEAA

Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Dissociation Reagent	Аккутаза
Doubling time	приблизно від 24 до 36 годин
Subculturing	Видаліть старе середовище з прилиплих клітин і промийте їх PBS, в якому бракує кальцію і магнію. Для колб T25 використовуйте 3-5 мл PBS, а для колб T75 - 5-10 мл. Потім повністю покрийте клітини аккутазою, використовуючи 1-2 мл для колб T25 і 2,5 мл для колб T75. Залиште клітини інкубуватися при кімнатній температурі протягом 8-10 хвилин, щоб відокремити їх. Після інкубації обережно змішайте клітини з 10 мл середовища, щоб ресуспендувати їх, а потім центрифугуйте при 300xg протягом 3 хвилин. Викиньте надосадову рідину, ресуспендуйте клітини у свіжому середовищі та перенесіть їх у нові колби, які вже містять свіже середовище.
Split ratio	від 1 до 3
Seeding density	від 1 до 3 × 10^4 клітин/$см^2$
Fluid renewal	2-3 рази на тиждень
Freeze medium	Як середовище кріоконсервування ми використовуємо повне живильне середовище (включаючи FBS) + 10% ДМСО для адекватної життєздатності після відтавання або CM-1 (номер за каталогом Cytion 800100), до складу якого входять оптимізовані осмопротектори та метаболічні стабілізатори для прискорення відновлення та зменшення кріоіндукованого стресу.

Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Thawing and Culturing Cells

1. Переконайтеся, що віал залишається глибоко замороженим після доставки, оскільки клітини транспортуються на сухому льоду для підтримання оптимальної температури під час транспортування.

2. Після отримання негайно зберігайте кріовіал при температурі нижче -150°C, щоб забезпечити збереження клітинної цілісності, або перейдіть до кроку 3, якщо потрібне негайне культивування.

3. Для негайного культивування швидко розморозьте віал, зануривши його у водяну баню з чистою водою і антимікробним засобом при температурі 37°C, обережно перемішуючи протягом 40-60 секунд, поки не залишиться невелика крижана грудка.

4. Всі наступні кроки виконуйте в стерильних умовах у проточній витяжній шафі, дезінфікуючи кріовіал 70% етанолом перед відкриттям.

5. Обережно відкрийте продезінфікований флакон і перенесіть клітинну суспензію в 15 мл центрифужну пробірку, що містить 8 мл культурального середовища кімнатної температури, обережно перемішуючи.

6. Відцентрифугуйте суміш при 300 x g протягом 3 хвилин, щоб відокремити клітини, і обережно викиньте надосадову рідину, що містить залишки заморожувального середовища.

7. Обережно ресуспендуйте осад клітин у 10 мл свіжого культурального середовища. Для адгезивних клітин розділіть суспензію між двома культуральними колбами T25; для суспензійних культур перенесіть все середовище в одну колбу T25, щоб сприяти ефективній взаємодії та росту клітин.

8. Дотримуйтесь встановлених протоколів субкультивування для продовження росту і підтримання клітинної лінії, забезпечуючи надійні результати експерименту.

Incubation Atmosphere	37°C, 5% $_{CO2}$, волога атмосфера.
Flask Coating	Ні
Freezing Procedure	Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевіреній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78 °C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і негайно перемістіть віали у відповідне місце для зберігання.

Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Shipping Conditions	Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевіреній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78 °C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і негайно перемістіть віали у відповідне місце для зберігання.
Storage Conditions	Для тривалого зберігання помістіть флакони в парофазний рідкий азот при температурі від -150 до -196 °C. Зберігання при -80 °C допустиме лише як короткий проміжний етап перед перенесенням у рідкий азот.

Контроль якості та молекулярний аналіз

Sterility	Зараження мікоплазмою виключається за допомогою аналізів на основі ПЛР та люмінесцентних методів виявлення мікоплазми. Щоб переконатися у відсутності бактеріального, грибкового або дріжджового забруднення, клітинні культури піддаються щоденному візуальному контролю.