U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2

300663

VISPĀRĪGA INFORMĀCIJA

Apraksts

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 ir genomā rediģēta cilvēka osteosarkomas šūnu līnija, kas iegūta no U2OS šūnām, kurās endogēnais RANBP2 (pazīstams arī kā NUP358) lokuss ir modificēts ar CRISPR/Cas9, lai kodētu SNAPf marķieri in-frame ar dabisko proteīnu. Nup358/RanBP2 ir liels nukleoporīns, kas lokalizēts kodola poru kompleksa (NPC) citoplazmatiskajos filamentos un spēlē svarīgu lomu nukleocitoplazmatiskajā transportā, SUMOilācijā un mitotiskajos procesos. Endogēnā marķēšana nodrošina, ka SNAPf-Nup358 tiek ekspresēts fizioloģiskā promotora kontrolē, saglabājot dabisko ekspresijas līmeni un minimizējot ar pārekspresijas sistēmām saistītos artefaktus.
SNAPf tag ir ātrs marķēšanas variants SNAP-tag, kas kovalenti saistās ar benzilguanīna konjugētiem substrātiem, ļaujot selektīvi un stabili marķēt Nup358 dzīvos vai fiksētos šūnos. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 šūnās fūzijas proteīns lokalizējas kodola apvalkā punktveida izkliedes veidā, kas ir raksturīga citoplazmatiskajiem NPC filamentiem. Šī konfigurācija atbalsta augstas izšķirtspējas fluorescences attēlveidošanu, superizšķirtspējas mikroskopiju, impulsu-pakaļdzīšanas marķēšanu un vienmolekulu izsekošanas pieejas, lai pētītu NPC arhitektūru un dinamiku. U2OS šūnu plakana morfoloģija un lielie kodoli vēl vairāk atvieglo kodola apvalka struktūru kvantitatīvo attēlveidošanu.
Šis modelis ļauj pētīt Nup358 specifiskās lomas CRM1/eksportīna atkarīgajā kodola eksportā, Ran GTPāzes cikla regulācijā un citoplazmatisko transporta platformu telpiskajā organizācijā. Ņemot vērā Nup358 iesaisti mitotiskā vārpstas montāžā un kinetohoras funkcijā, šī šūnu līnija ir piemērota arī šūnu cikla atkarīgās nukleoporīnu pārdales un NPC demontāžas/remontāžas pētīšanai mitozes laikā. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 nodrošina fizioloģiski atbilstošu platformu cilvēka šūnu kodola poru kompleksa citoplazmatiskās virsmas strukturālo un funkcionālo aspektu izpētei.

Audums	Bone
Slimība	Osteosarkoma
Metastāžu vieta	Primārā audzēja lokalizācija (kauls)

Pieteikumi

Kodola poru kompleksa citoplazmatisko filamentu bioloģija; Nup358/RanBP2 CRM1-mediētā kodola eksportā; Ran GTPāzes cikls; SUMO ceļš; mitotiskā vārpstiņa veidošanās; atsevišķu daļiņu izsekošana; superizšķirtspējas mikroskopija; SNAP „pulse-chase” marķēšana; NPC citoplazmatiskās virsmas arhitektūra

KLASIFIKĀCIJA

Organisms	Cilvēks
Sekss	Sieviete
Augšanas īpašības	Atbalstītājs
ĢMO statuss	GMO-S1

Sīkāka informācija par ĢMO statusu

GMO-S1: This human osteosarcoma cell line (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) contains a CRISPR-engineered SNAPf-Nup358/RanBP2 fusion enabling precise labeling of nuclear pore cytoplasmic fibrils. The modification is stably integrated. This classification applies only within Germany and may differ elsewhere.

Bioloģiskās drošības līmenis	1

RAKSTURLIELUMI

Morfoloģija	Epitēlijveidīgs

Cytion GmbH
Nikola-Tesla-Str. 3
69124 Heidelberg
Tel: +49 (0)6221 405780
info@cytion.com
cytion.com

Registered office Heidelberg
VAT ID: DE283292917
Local court Mannheim - HRB 714394
CEO / Geschäftsführer: Jonathan Steubing

Banking information
Sparkasse Heidelberg
IBAN: DE35 6725 0020 0009 2076 86
BIC: SOLADES1HDB

Šūnu tips	Epitelio šūnas (osteosarkoma)
Laiks, kas nepieciešams, lai skaits dubultojās	aptuveni 24 līdz 36 stundas

IDENTIFIKATORI

Atsauce

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytion kataloga numurs 300663)

NCBI nodokļu identifikācijas numurs	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
noguldītājs	Ellenberga laboratorija (EMBL)

PAZĪMES UN UZŅĒMĪBA

Proteīnu ekspresija

Nup358/RanBP2, SNAPf-tag

APSTRĀDE UN AUDZĒŠANA

Barotne

McCoys 5a, w: 3,0 g/l glikoze, w: stabils glutamīns, w: 2,0 mM nātrija piruvāts, w: 2,2 g/l NaHCO3 (Cytion izstrādājuma numurs 820200a)

Inkubācijas vide	37°C, 5%CO2, mitrināta atmosfēra.

Papildinājumi

Papildināt barotni ar 10% FBS, 3,0 g/l glikozes, stabilu glutamīnu, 2,0 mM nātrija piruvāta, 2,2 g/l NaHCO3, 1% NEAA

Disociācijas reaģents	Accutase

Pārstādīšana

Noņemt veco barotni no pielipušajām šūnām un mazgāt tās ar PBS, kurā nav kalcija un magnija. T25 kolbām izmantojiet 3-5 ml PBS, bet T75 kolbām - 5-10 ml. Pēc tam pilnībā pārklājiet šūnas ar Accutase, izmantojot 1-2 ml T25 kolbām un 2,5 ml T75 kolbām. Ļaujiet šūnām inkubēties istabas temperatūrā 8-10 minūtes, lai tās atdalītos. Pēc inkubācijas uzmanīgi samaisiet šūnas ar 10 ml barotnes, lai tās atkārtoti suspendētu, pēc tam centrifugējiet 3 minūtes ar 300xg. Izmetiet supernatantu, atkārtoti suspendējiet šūnas svaigā barotnē un pārvietojiet tās jaunās kolbās, kurās jau ir svaiga barotne.

Sadalījuma attiecība	no 1 līdz 3
Sēšanas blīvums	1 līdz 3 × 10^4 šūnas/cm^2
Šķidruma atjaunošana	2 līdz 3 reizes nedēļā

Atkausēšana un kultivēšana

Confirm that the vial remains deeply frozen upon delivery, as cells are shipped on dry ice to maintain optimal temperatures during transit. Upon receipt, either store the cryovial immediately at temperatures below -150°C to ensure the preservation of cellular integrity, or proceed to step 3 if immediate culturing is required.
For immediate culturing, swiftly thaw the vial by immersing it in a 37°C water bath with clean water and an antimicrobial agent, agitating gently for 40-60 seconds until a small ice clump remains.
Perform all subsequent steps under sterile conditions in a flow hood, disinfecting the cryovial with 70% ethanol before opening.
Carefully open the disinfected vial and transfer the cell suspension into a 15 ml centrifuge tube containing 8 ml of room-temperature culture medium, mixing gently.
Centrifuge the mixture at 300 x g for 3 minutes to separate the cells and carefully discard the supernatant containing residual freezing medium.
Gently resuspend the cell pellet in 10 ml of fresh culture medium. For adherent cells, divide the suspension between two T25 culture flasks; for suspension cultures, transfer all the medium into one T25 flask to promote effective cell interaction and growth.
Adhere to established subculture protocols for continued growth and maintenance of the cell line, ensuring reliable experimental outcomes.

KVALITĀTES KONTROLE UN KRIOKONSERVĀCIJA

Sterilitāte

Mikoplazmas piesārņojums tiek izslēgts, izmantojot gan uz PCR balstītus testus, gan uz luminiscenci balstītas mikoplazmas noteikšanas metodes.
Lai pārliecinātos, ka nav baktēriju, sēnīšu vai rauga piesārņojuma, šūnu kultūras katru dienu vizuāli pārbauda.

Saldēšanas barotne	Kā kriokonservēšanas barotni mēs izmantojam pilnvērtīgu augšanas barotni (ieskaitot FBS) + 10 % DMSO, lai nodrošinātu pietiekamu dzīvotspēju pēc atkausēšanas, vai CM-1 (Cytion kataloga numurs 800100), kas ietver optimizētus osmoprotektorus un metaboliskos stabilizatorus, lai uzlabotu atveseļošanos un samazinātu krioinducēto stresu.

Uzglabāšanas nosacījumi

Ilgstošai uzglabāšanai flakonus ievietojiet šķidrā slāpeklī ar tvaika fāzi aptuveni -150 līdz -196 °C temperatūrā. Uzglabāšana -80 °C temperatūrā ir pieļaujama tikai kā īss starpposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

Piegādes nosacījumi

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidruma daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

ZIEDOTĀJS

Donora vecums	15 gadi
Etniskā piederība	Kaukāzietis

JURIDISKIE JAUTĀJUMI UN DROŠĪBA

Drošības pasākumi

Plānojot uzglabāt kriokviālu šķidrā slāpeklī turpmākai atkausēšanai, obligāti jāievēro stingri drošības pasākumi. Ir nepieciešami piemēroti aizsargcimdi un apģērbs, un, pārvietojot sasaldētos paraugus uz šķidrā slāpekļa tvertni vai no tās, ir jālieto sejas maska vai aizsargbrilles. Tas jādara, lai mazinātu traumu risku, ko var radīt iespējamas kriokrioviālu eksplozijas, kas var izraisīt asu fragmentu izmešanu.

Garantija

Uzņēmumā Cytion mēs atbalstām savu produktu kvalitāti un dzīvotspēju.
Mēs garantējam, ka mūsu šūnas būs dzīvotspējīgas kultivēšanas sākumā 60 dienas pēc nosūtīšanas no mūsu ražotnēm.
Mēs nodrošinām, ka visi materiāli atbilst analīzes sertifikātā un/vai produkta lapā aprakstītajām specifikācijām
Lai iegūtu sīkāku informāciju, lūdzu, skatiet mūsu <a href=""/"/Kas mēs esam/garantija/"" hreflang=""x-default"">Garantijas paziņojumu

Tiek piemēroti līgumi ar trešajām personām	Yes

Cytion GmbH
Nikola-Tesla-Str. 3
69124 Heidelberg
Tel: +49 (0)6221 405780
info@cytion.com
cytion.com

Registered office Heidelberg
VAT ID: DE283292917
Local court Mannheim - HRB 714394
CEO / Geschäftsführer: Jonathan Steubing

Banking information
Sparkasse Heidelberg
IBAN: DE35 6725 0020 0009 2076 86
BIC: SOLADES1HDB