U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2

300663

ALGEMENE INFORMATIE

Beschrijving

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 is een genoombewerkte menselijke osteosarcoomcellijn afgeleid van U2OS-cellen waarin de endogene RANBP2-locus (ook bekend als NUP358) is gemodificeerd door CRISPR/Cas9 om een SNAPf-tag in-frame met het natuurlijke eiwit te coderen. Nup358/RanBP2 is een groot nucleoporine dat zich bevindt in de cytoplasmatische filamenten van het nucleaire poriecomplex (NPC) en een cruciale rol speelt in nucleocytoplasmatisch transport, SUMOylatie en mitotische processen. Endogene tagging zorgt ervoor dat SNAPf-Nup358 wordt uitgedrukt onder fysiologische promotorcontrole, waardoor de natuurlijke expressieniveaus behouden blijven en artefacten die verband houden met overexpressiesystemen tot een minimum worden beperkt.
De SNAPf-tag is een snel labelende variant van de SNAP-tag die covalent bindt aan benzylguanine-geconjugeerde substraten, waardoor selectieve en stabiele fluorescerende labeling van Nup358 in levende of gefixeerde cellen mogelijk is. In U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-cellen lokaliseert het fusie-eiwit zich in de kernmembraan in een puntvormige verdeling die kenmerkend is voor cytoplasmatische NPC-filamenten. Deze configuratie ondersteunt hoge-resolutie fluorescentiebeeldvorming, superresolutiemicroscopie, pulse-chase-labeling en single-molecule tracking-benaderingen om de architectuur en dynamica van NPC te bestuderen. De vlakke morfologie en grote kernen van U2OS-cellen vergemakkelijken bovendien kwantitatieve beeldvorming van kernmembraanstructuren.
Dit model maakt het mogelijk om de specifieke rol van Nup358 te onderzoeken in CRM1/exportine-afhankelijke nucleaire export, Ran GTPase-cyclusregulatie en de ruimtelijke organisatie van cytoplasmatische transportplatforms. Gezien de betrokkenheid van Nup358 bij de assemblage van de mitotische spindel en de kinetochorefunctie, is de cellijn ook geschikt voor het bestuderen van de celcyclusafhankelijke herverdeling van nucleoporines en NPC-demontage/herassemblage tijdens mitose. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 biedt een fysiologisch relevant platform voor het ontleden van structurele en functionele aspecten van het cytoplasmatische oppervlak van het nucleaire poriecomplex in menselijke cellen.

Weefsel	Bot
Ziekte	Osteosarcoom
Plaats van uitzaaiingen	Locatie van de primaire tumor (bot)

Toepassingen

Biologie van de cytoplasmatische filamenten van het nucleaire poriecomplex; Nup358/RanBP2 bij de door CRM1 gemedieerde nucleaire export; Ran-GTPase-cyclus; SUMO-route; opbouw van de mitotische spindel; tracking van afzonderlijke deeltjes; superresolutiemicroscopie; SNAP-pulse-chase-markering; architectuur van het cytoplasmatische oppervlak van het NPC

CLASSIFICATIE

Organisme	Mens
Seks	Vrouw
Groei-eigenschappen	Aanhanger
GGO-status	GMO-S1

Details over de GGO-status

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.

Bioveiligheidsniveau	1

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

KENMERKEN

Morfologie	Epitheelachtig
Celtype	Epitheelcellen (osteosarcoom)
Verdubbelingstijd	ongeveer 24 tot 36 uur

IDENTIFICATIEGEGEVENS

Bronvermelding

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytion catalogusnummer 300663)

NCBI-belastingnummer	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Inlegger	Het Ellenberg Lab (EMBL)

EXPRESSIE EN VATBAARHEID

Eiwit-expressie

Nup358/RanBP2, SNAPf-tag

BEHANDELING EN KWEEK

Kweekmedium

McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucose, w: stabiel Glutamine, w: 2,0 mM Natriumpyruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO3 (Cytion artikelnummer 820200a)

Incubatieomgeving	37°C, 5%CO2, bevochtigde atmosfeer.

Supplementen

Vul het medium aan met 10% FBS, 3,0 g/L Glucose, stabiele Glutamine, 2,0 mM Natriumpyruvaat, 2,2 g/L NaHCO3, 1% NEAA

Dissociatiereagens	Accutase

Heruitplanten

Verwijder het oude medium van de adherente cellen en was ze met PBS zonder calcium en magnesium. Gebruik voor T25-flesjes 3-5 ml PBS en voor T75-flesjes 5-10 ml. Bedek de cellen vervolgens volledig met Accutase, met 1-2 ml voor T25-flesjes en 2,5 ml voor T75-flesjes. Laat de cellen gedurende 8-10 minuten bij kamertemperatuur incuberen om ze los te maken. Na incubatie de cellen voorzichtig mengen met 10 ml medium om ze te resuspenderen en vervolgens centrifugeren bij 300xg gedurende 3 minuten. Gooi het supernatant weg, resuspendeer de cellen in vers medium en breng ze over in nieuwe kolven die al vers medium bevatten.

Splitsingsverhouding	1 tot en met 3
Zaaidichtheid	1 tot 3 × 10^4 cellen/cm^2
Vloeistofverversing	2 tot 3 keer per week

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

Ontdooien en kweken

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.

KWALITEITSCONTROLE EN CRYOPRESERVATIE

Onvruchtbaarheid

Mycoplasmaverontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasmadetectiemethoden.
Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.

Kweekmedium invriezen	Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimedium (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

Opslagvoorwaarden

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Verzendvoorwaarden

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer -78 °C te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

DONATEUR

Leeftijd van de donor	15 jaar
Etnische afkomst	Kaukasisch

JURIDISCHE EN VEILIGHEIDSASPECTEN

Veiligheidsmaatregelen

Wanneer men van plan is om een cryovial in vloeibare stikstof op te slaan om later te ontdooien, is het verplicht om strenge veiligheidsmaatregelen in acht te nemen. Passende beschermende handschoenen en kleding zijn essentieel en het gebruik van een gezichtsmasker of veiligheidsbril is vereist tijdens het overbrengen van bevroren monsters naar of uit de tank met vloeibare stikstof. Dit is om het risico op letsel door mogelijke cryoviale explosies bij het verwijderen te beperken, wat kan resulteren in de projectie van scherpe fragmenten.

Garantie

Bij Cytion staan we achter de kwaliteit en levensvatbaarheid van onze producten.
We garanderen dat onze cellen levensvatbaar zijn bij het begin van de kweek gedurende 60 dagen na verzending vanuit onze faciliteiten.
We verzekeren dat alle materialen voldoen aan de specificaties beschreven in het analysecertificaat en/of productblad
Raadpleeg voor volledige informatie onze <a href=""/Wie-zijn-wij/Garantie/"" hreflang=""x-default"">Garantieverklaring

Er gelden overeenkomsten met derden	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