U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2

300663

INFORMACJE OGÓLNE

Opis

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 to zmodyfikowana genetycznie linia komórek ludzkiego osteosarcoma pochodząca z komórek U2OS, w której endogenny locus RANBP2 (znany również jako NUP358) został zmodyfikowany za pomocą CRISPR/Cas9 w celu kodowania tagu SNAPf w ramce z natywnym białkiem. Nup358/RanBP2 jest dużym nukleoporinem zlokalizowanym w cytoplazmatycznych włóknach kompleksu porów jądrowych (NPC) i odgrywa kluczową rolę w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym, SUMOylacji i procesach mitotycznych. Endogeniczne znakowanie zapewnia, że SNAPf-Nup358 jest wyrażany pod fizjologiczną kontrolą promotora, utrzymując natywne poziomy ekspresji i minimalizując artefakty związane z systemami nadekspresji.
Tag SNAPf jest szybko znakującym wariantem tagu SNAP, który kowalencyjnie wiąże substraty sprzężone z benzyloguaniną, umożliwiając selektywne i stabilne znakowanie fluorescencyjne Nup358 w żywych lub utrwalonych komórkach. W komórkach U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 białko fuzyjne lokalizuje się w otoczce jądrowej w postaci punktowej dystrybucji charakterystycznej dla cytoplazmatycznych włókien NPC. Taka konfiguracja umożliwia obrazowanie fluorescencyjne o wysokiej rozdzielczości, mikroskopię superrozdzielczą, znakowanie metodą pulse-chase oraz śledzenie pojedynczych cząsteczek w celu badania architektury i dynamiki NPC. Płaska morfologia i duże jądra komórek U2OS dodatkowo ułatwiają ilościowe obrazowanie struktur błony jądrowej.
Model ten umożliwia badanie specyficznych ról Nup358 w eksporcie jądrowym zależnym od CRM1/eksportyny, regulacji cyklu Ran GTPazy oraz organizacji przestrzennej cytoplazmatycznych platform transportowych. Biorąc pod uwagę udział Nup358 w tworzeniu wrzeciona mitotycznego i funkcji kinetochoru, linia komórkowa nadaje się również do badania zależnej od cyklu komórkowego redystrybucji nukleoporin oraz demontażu/ponownego montażu NPC podczas mitozy. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 stanowi fizjologicznie istotną platformę do analizy strukturalnych i funkcjonalnych aspektów cytoplazmatycznej powierzchni kompleksu porów jądrowych w komórkach ludzkich.

Chusteczka	Kość
Choroba	Mięsak kościopochodny
Miejsce przerzutów	Miejsce występowania guza pierwotnego (kość)

Zastosowania

Biologia włókien cytoplazmatycznych kompleksu porów jądrowych; rola białka Nup358/RanBP2 w eksporcie jądrowym za pośrednictwem CRM1; cykl GTPazy Ran; szlak SUMO; tworzenie wrzeciona mitotycznego; śledzenie pojedynczych cząstek; mikroskopia superrozdzielcza; znakowanie metodą SNAP „pulse-chase”; architektura strony cytoplazmatycznej kompleksu porów jądrowych

KLASYFIKACJA

Organizm	Człowiek
Seks	Kobieta
Właściwości związane ze wzrostem	Zwolennik
Status GMO	GMO-S1

Szczegółowe informacje dotyczące statusu GMO

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.

Poziom bezpieczeństwa biologicznego	1

CECHY CHARAKTERYSTYCZNE

Morfologia	Podobny do nabłonka

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

Typ komórki	Komórki nabłonkowe (osteosarcoma)
Czas podwojenia	ok. 24–36 godzin

IDENTYFIKATORY

Źródło

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (numer katalogowy Cytion 300663)

Numer identyfikacji podatkowej NCBI	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Wkładca	Laboratorium Ellenberg (EMBL)

EKSPRESJA I PODATNOŚĆ

Ekspresja białek

Nup358/RanBP2, tag SNAPf

POSTĘPOWANIE I HODOWLA

Pożywka hodowlana

McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukozy, w: stabilna glutamina, w: 2,0 mM pirogronianu sodu, w: 2,2 g/l NaHCO3 (numer artykułu Cytion 820200a)

Atmosfera inkubacyjna	37°C, 5%CO2, nawilżona atmosfera.

Suplementy

Uzupełnić pożywkę o 10% FBS, 3,0 g/l glukozy, stabilną glutaminę, 2,0 mM pirogronianu sodu, 2,2 g/l NaHCO3, 1% NEAA

Odczynnik dysocjacyjny	Accutase

Hodowla komórek w subkulturze

Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzucić supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Współczynnik podziału	od 1 do 3
Gęstość wysiewu	od 1 do 3 × 10^4 komórek/cm^2
Odnawianie płynów	2 do 3 razy w tygodniu

Rozmrażanie i hodowla

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.

KONTROLA JAKOŚCI I KRIOKONSERWACJA

Bezpłodność

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.
Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.

Pożywka do zamrażania	Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

Warunki przechowywania

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiolki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C.
Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Warunki wysyłki

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

DARCZYŃCA

Wiek dawcy	15 lat
Pochodzenie etniczne	Kaukaski

KWESTIE PRAWNE I BEZPIECZEŃSTWO

Środki bezpieczeństwa

Planując przechowywanie kriofiolek w ciekłym azocie w celu ich późniejszego rozmrożenia, należy bezwzględnie przestrzegać rygorystycznych środków bezpieczeństwa. Niezbędne są odpowiednie rękawice i odzież ochronna, a podczas przenoszenia zamrożonych próbek do lub ze zbiornika z ciekłym azotem wymagane jest stosowanie maski lub okularów ochronnych. Ma to na celu zmniejszenie ryzyka obrażeń spowodowanych potencjalnymi eksplozjami kriowialu podczas wyjmowania, które mogą skutkować wyrzuceniem ostrych fragmentów.

Gwarancja

W Cytion gwarantujemy jakość i żywotność naszych produktów.
Gwarantujemy, że nasze komórki będą żywotne na początku hodowli przez 60 dni po wysyłce z naszych zakładów.
Zapewniamy, że wszystkie materiały są zgodne ze specyfikacjami opisanymi w certyfikacie analizy i/lub karcie produktu
Szczegółowe informacje można znaleźć w naszej <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default"">Oświadczeniu gwarancyjnym

Obowiązują umowy z podmiotami zewnętrznymi	Yes