U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1

300664

ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

Описание

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 е геномно редактирана човешка остеосаркомна клетъчна линия, получена от U2OS клетки, в които ендогенният ген SEH1L (SEH1) е модифициран с помощта на CRISPR/Cas9 технология, за да кодира SNAPf таг в рамката. SEH1 е компонент на Y-комплекса (известен също като NUP107-160 комплекс), основен структурен модул на ядрения порен комплекс (NPC), който допринася за сглобяването и стабилността на порестата скафолд. Чрез вмъкване на SNAPf кодиращата последователност в ендогенния локус, маркираният SEH1 протеин се експресира под естествен регулаторен контрол, запазвайки физиологичните нива на експресия и минимизирайки смущенията в състава на ядрените пори.
SNAPf етикетът е инженерно създаден, бързо реагиращ вариант на SNAP-етикета, който ковалентно се свързва с бензилгуанин-конюгирани субстрати, позволявайки селективно и стабилно флуоресцентно маркиране в живи или фиксирани клетки. В U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 клетките, фузионният протеин се локализира в ядрената мембрана в характерния за NPC разпределение пунктиран модел. Тъй като маркирането се извършва на нива на ендогенни протеини, тази система е подходяща за количествена флуоресцентна микроскопия, изображения със суперразделителна способност и анализи за проследяване на единични частици, насочени към разлагане на организацията и стехиометрията на NPC. Плоската морфология и големите ядра на U2OS клетките допълнително улесняват визуализацията с висока разделителна способност на структурите на ядрената мембрана.
SEH1 участва в биогенезата на NPC и също така е свързан с процесите, свързани с кинетохорите по време на митозата. Съответно, тази клетъчна линия предоставя стабилна платформа за изследване на зависимата от клетъчния цикъл сглобка и разглобка на NPC, пространствената организация на Y-комплекса в порестата структура и потенциалните двойни роли на SEH1 в ядрената мембрана и митотичните кинетохори. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 позволява механистични изследвания на архитектурата и динамиката на ядрените пори при физиологично релевантни условия на експресия.

Тъкан	Bone
Заболяване	Остеосарком
Място на метастазите	Локация на първичния тумор (кост)

Приложения

Биология на Y-комплекса/комплекса NUP107-160; ролята на SEH1 в сглобяването на скелета на NPC; компоненти на NPC, свързани с кинетохора; стехиометрия на NPC; маркиране чрез SNAP „пулс-чейс“; микроскопия със свръхвисока разделителна способност; биогенеза на NPC; разграждане и повторно сглобяване на NPC по време на митоза

КЛАСИФИКАЦИЯ

Организъм	Човек
Секс	Женски
Свойства, свързани с растежа	Привърженик
Статус на ГМО	GMO-S1

Подробности относно статуса на ГМО

GMO-S1: This human osteosarcoma cell line (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) contains a CRISPR-mediated SNAPf-SEH1 fusion that allows selective labeling of the SEH1 nucleoporin. The modification is stably present. This classification applies only within Germany and may differ elsewhere.

Ниво на биологична безопасност	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

ХАРАКТЕРИСТИКИ

Морфология	Подобни на епител
Тип клетка	Епителни клетки (остеосаркома)
Време за удвояване	приблизително 24 до 36 часа

ИДЕНТИФИКАТОРИ

Източник

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (каталожен номер 300664 на Cytion)

Данъчен идентификационен номер в NCBI	9606
Целозавър	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Вложител	Лабораторията на Елънбърг (EMBL)

ПРОЯВА И ПРЕДРАЗПОЛОЖЕНОСТ

Експресия на протеини

SEH1, SNAPf-таг

ОБРАБОТКА И ОТГЛЕЖДАНЕ

Хранителна среда

McCoys 5a, w: 3,0 g/L глюкоза, w: стабилен глутамин, w: 2,0 mM натриев пируват, w: 2,2 g/L NaHCO3 (номер на статията в Cytion 820200a)

Атмосфера за инкубация	37°C, 5%CO2, овлажнена атмосфера.

Добавки

Допълнете средата с 10% FBS, 3,0 g/L глюкоза, стабилен глутамин, 2,0 mM натриев пируват, 2,2 g/L NaHCO3, 1% NEAA

Реагент за дисоциация	Accutase

Пресаждане

Отстранете старата среда от адхезивните клетки и ги промийте с PBS, която не съдържа калций и магнезий. За колби T25 използвайте 3-5 ml PBS, а за колби T75 - 5-10 ml. След това покрийте клетките изцяло с Accutase, като използвате 1-2 ml за колби T25 и 2,5 ml за колби T75. Оставете клетките да се инкубират на стайна температура за 8-10 минути, за да се отделят. След инкубацията внимателно разбъркайте клетките с 10 ml среда, за да ги ресуспендирате, след което центрофугирайте при 300xg за 3 минути. Изхвърлете супернатантата, ресуспендирайте клетките в прясна среда и ги прехвърлете в нови колби, които вече съдържат прясна среда.

Коефициент на разделяне	от 1 до 3
Плътност на засяването	от 1 до 3 × 10^4 клетки/$см^2$
Обновяване на течността	2 до 3 пъти седмично

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

Размразяване и култивиране

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.

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ

Стерилност

Замърсяването с микоплазма се изключва както чрез PCR-базирани анализи, така и чрез луминесцентни методи за откриване на микоплазма.
За да се гарантира, че няма бактериално, гъбично или дрождево замърсяване, клетъчните култури се подлагат на ежедневни визуални проверки.

Среда за замразяване	Като среда за криоконсервация използваме пълна среда за растеж (включително FBS) + 10% DMSO за адекватна жизнеспособност след размразяване или CM-1 (каталожен номер 800100 на Cytion), която включва оптимизирани осмопротектори и метаболитни стабилизатори за подобряване на възстановяването и намаляване на криоиндуцирания стрес.

Условия за съхранение

За дълготрайно съхранение поставете флаконите в течен азот в парна фаза при температура около -150 до -196 °C. Съхранението при -80 °C е приемливо само като кратък междинен етап преди прехвърлянето в течен азот.

Условия за доставка

Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед в утвърдени, изолирани опаковки с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78 °C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.

ДАРИТЕЛ

Възраст на донора	15 години
Етническа принадлежност	Кавказки

ПРАВНИ ВЪПРОСИ И БЕЗОПАСНОСТ

Мерки за безопасност

Когато планирате да съхранявате криопрепарат в течен азот за бъдещо размразяване, е задължително да спазвате строги мерки за безопасност. Подходящите защитни ръкавици и облекло са от съществено значение, а по време на прехвърлянето на замразени проби към или от резервоара с течен азот е необходимо да се използва маска за лице или предпазни очила. Това се прави, за да се намали рискът от нараняване от потенциални експлозии на криовиолите при изваждането им, които могат да доведат до изхвърляне на остри фрагменти.

Гаранция

Ние в Cytion заставаме зад качеството и жизнеспособността на нашите продукти.
Гарантираме, че нашите клетки ще бъдат жизнеспособни в началото на култивирането в продължение на 60 дни след изпращането им от нашите съоръжения.
Гарантираме, че всички материали отговарят на спецификациите, описани в сертификата за анализ и/или продуктовата листа
За пълни подробности, моля, направете справка с нашата <a href=""/Кои сме ние/Гаранция/"" hreflang=""x-default"">Гаранционна декларация

Прилагат се споразумения с трети страни	Yes