U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1

300664

OBECNÉ INFORMACE

Popis

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 je genomově upravená lidská osteosarkomová buněčná linie odvozená z buněk U2OS, ve které byl endogenní gen SEH1L (SEH1) modifikován pomocí technologie CRISPR/Cas9 tak, aby kódoval in-frame SNAPf tag. SEH1 je součástí Y-komplexu (známého také jako komplex NUP107-160), základního strukturálního modulu jaderného pórového komplexu (NPC), který přispívá k sestavení a stabilitě pórové kostry. Vložením kódující sekvence SNAPf do endogenního lokusu se značený protein SEH1 exprimuje pod nativní regulační kontrolou, čímž se zachovávají fyziologické úrovně exprese a minimalizují se poruchy složení jaderných pórů.
Značka SNAPf je uměle vytvořená, rychle reagující varianta značky SNAP, která se kovalentně váže na substráty konjugované s benzylguaninem, což umožňuje selektivní a stabilní fluorescenční značení v živých nebo fixovaných buňkách. V buňkách U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 se fúzní protein lokalizuje do jaderné obálky v tečkovitém vzoru charakteristickém pro distribuci NPC. Protože značení probíhá na úrovni endogenních proteinů, je tento systém vhodný pro kvantitativní fluorescenční mikroskopii, superrozlišovací zobrazování a analýzy sledování jednotlivých částic zaměřené na rozbor organizace a stechiometrie NPC. Plochá morfologie a velká jádra buněk U2OS dále usnadňují vysokorozlišovací vizualizaci struktur jaderné obálky.
SEH1 se podílí na biogenezi NPC a je také zapojen do procesů spojených s kinetochory během mitózy. Tato buněčná linie proto poskytuje robustní platformu pro zkoumání sestavování a rozebírání NPC v závislosti na buněčném cyklu, prostorové organizace Y-komplexu v rámci pórovitého lešení a potenciální dvojí role SEH1 v jaderné obálce a mitotických kinetochorech. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 umožňuje mechanistické studie architektury a dynamiky jaderných pórů za fyziologicky relevantních expresních podmínek.

Tkáň	Kost
Nemoc	Osteosarkom
Místo metastázy	Místo primárního nádoru (kost)

Aplikace

Biologie komplexu Y/komplexu NUP107-160; role SEH1 při sestavování kostry NPC; složky NPC asociované s kinetochorem; stechiometrie NPC; značení metodou SNAP pulse-chase; mikroskopie se superrozlišením; biogeneze NPC; mitotická demontáž a opětovná montáž NPC

KLASIFIKACE

Organismus	Člověk
Sex	Žena
Růstové vlastnosti	Přívrženec
Stav GMO	GMO-S1

Podrobnosti o statusu GMO

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.

Úroveň biologické bezpečnosti	1

CHARAKTERISTIKA

Morfologie	Epitelu podobné
Typ buňky	Epitelové buňky (osteosarkom)
Doba zdvojnásobení	přibližně 24 až 36 hodin

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

IDENTIFIKÁTORY

Citace

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (katalogové číslo Cytion 300664)

Daňové identifikační číslo NCBI	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Vkladatel	Ellenbergova laboratoř (EMBL)

EXPRESE A NÁCHYLNOST

Exprese proteinů

SEH1, SNAPf-tag

MANIPULACE A CHOV

Pěstovací médium

McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilní glutamin, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO3 (číslo článku Cytion 820200a)

Inkubační atmosféra	37 °C, 5 %CO2, zvlhčená atmosféra.

Doplňky stravy

Doplňte médium o 10% FBS, 3,0 g/l glukózy, stabilní glutamin, 2,0 mM pyruvát sodný, 2,2 g/l NaHCO3, 1% NEAA

Disociační činidlo	Accutase

Subkultivace

Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstřeďte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhoďte, buňky znovu rozpusťte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.

Poměr rozdělení	1 až 3
Hustota výsevu	1 až 3 × 10^4 buněk/cm^2
Obnova tekutin	2 až 3krát týdně

Rozmrazování a kultivace

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 KVALITY A KRYOKONZERVACE

Sterilita

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy. Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuálním kontrolám.

Mrazicí médium	Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryo.

Podmínky skladování

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Dopravní podmínky

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

DÁRCE

Věk dárce	15 let
Etnická příslušnost	Kavkazský

PRÁVNÍ INFORMACE A BEZPEČNOSTNÍ POKYNY

Bezpečnostní opatření

Při plánování uložení kryovialu v kapalném dusíku pro budoucí rozmrazení je nutné dodržovat přísná bezpečnostní opatření. Nezbytné jsou vhodné ochranné rukavice a oděv a při přenášení zmrazených vzorků do nádrže s kapalným dusíkem nebo z ní je nutné používat obličejovou masku nebo ochranné brýle. To proto, aby se snížilo riziko zranění v důsledku možných výbuchů kryovialů při jejich vyjímání, které mohou mít za následek vystřelování ostrých úlomků.

Záruka

Ve společnosti Cytion si stojíme za kvalitou a životaschopností našich produktů.
Zaručujeme, že naše buňky budou životaschopné na začátku kultivace po dobu 60 dnů po odeslání z našich zařízení.
Zaručujeme, že všechny materiály odpovídají specifikacím popsaným v certifikátu analýzy a/nebo v produktovém listu
Úplné informace naleznete v našem <a href=""/Kdo-jsme/Záruka/"" hreflang=""x-default"">Záručním prohlášení

Platí smlouvy s třetími stranami	Yes