U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1

300664

GENERELLE OPLYSNINGER

Beskrivelse

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 er en genomredigeret human osteosarkomcellelinje afledt af U2OS-celler, hvor det endogene SEH1L (SEH1)-gen er blevet modificeret ved hjælp af CRISPR/Cas9-teknologi til at kode for et in-frame SNAPf-tag. SEH1 er en komponent i Y-komplekset (også kendt som NUP107-160-komplekset), et centralt strukturelt modul i det nukleare porekompleks (NPC), der bidrager til porestrukturens samling og stabilitet. Ved at indsætte SNAPf-kodningssekvensen på det endogene locus udtrykkes det mærkede SEH1-protein under naturlig regulatorisk kontrol, hvilket bevarer fysiologiske ekspressionsniveauer og minimerer forstyrrelser i det nukleare porekompleks' sammensætning.
SNAPf-tagget er en konstrueret, hurtigt reagerende variant af SNAP-tagget, der kovalent binder benzylguanin-konjugerede substrater, hvilket muliggør selektiv og stabil fluorescerende mærkning i levende eller fiksede celler. I U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler lokaliseres fusionsproteinet til kernehinden i et punktformet mønster, der er karakteristisk for NPC-fordelingen. Da mærkningen finder sted på endogene proteinniveauer, er dette system velegnet til kvantitativ fluorescensmikroskopi, superopløsningsbilleddannelse og enkeltpartikelsporingsanalyser med det formål at dissekere NPC-organisering og stoichiometri. Den flade morfologi og de store kerner i U2OS-celler letter yderligere højopløsningsvisualisering af kernehindestrukturer.
SEH1 deltager i NPC-biogenese og har også været impliceret i kinetokor-associerede processer under mitose. Derfor udgør denne cellelinje en robust platform for undersøgelse af cellecyklusafhængig NPC-samling og -adskillelse, rumlig organisering af Y-komplekset inden for porestrukturen og SEH1's potentielle dobbeltrolle ved kernehinden og mitotiske kinetokorer. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 muliggør mekanistiske studier af nukleare porers arkitektur og dynamik under fysiologisk relevante ekspressionsbetingelser.

Væv	Knogle
Sygdom	Osteosarkom
Metastasested	Primær tumorlokalisation (knogle)

Anvendelser

Y-komplekset/NUP107-160-kompleksets biologi; SEH1 i opbygningen af NPC-skelettet; kinetokor-associerede NPC-komponenter; NPC-støkiometri; SNAP-pulse-chase-mærkning; superopløsningsmikroskopi; NPC-biogenese; mitotisk nedbrydning og genopbygning af NPC

KLASSIFICERING

Organisme	Menneske
Køn	Kvinde
Vækstegenskaber	Tilhænger
GMO-status	GMO-S1

Oplysninger om GMO-status

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.

Biosikkerhedsniveau	1

EGENSKABER

Morfologi	Epitel-lignende
Celletype	Epithelceller (osteosarkom)

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

Fordoblingstid	ca. 24 til 36 timer

IDENTIFIKATORER

Kildehenvisning

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytion katalognummer 300664)

NCBI-skattenummer	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Indskyder	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)

UDTRYK OG MODTAGELIGHED

Proteinekspression

SEH1, SNAPf-tag

HÅNDTERING OG OPDRÆT

Næringsmedium

McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glukose, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO3 (Cytion artikelnummer 820200a)

Inkubationsatmosfære	37°C, 5%CO2, befugtet atmosfære.

Kosttilskud

Suppler mediet med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO3, 1 % NEAA

Dissociationsreagens	Accutase

Oddyrkning

Fjern det gamle medium fra de klæbende celler, og vask dem med PBS, der ikke indeholder calcium og magnesium. Brug 3-5 ml PBS til T25-kolber og 5-10 ml til T75-kolber. Dæk derefter cellerne helt med Accutase, brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber. Lad cellerne inkubere ved stuetemperatur i 8-10 minutter for at løsne dem. Efter inkubationen blandes cellerne forsigtigt med 10 ml medium for at resuspendere dem, og centrifugeres derefter ved 300xg i 3 minutter. Kassér supernatanten, resuspender cellerne i frisk medium, og overfør dem til nye kolber, der allerede indeholder frisk medium.

Opdelingsforhold	1 til 3
Såtæthed	1 til 3 × 10^4 celler/cm^2
Væskeudskiftning	2 til 3 gange om ugen

Optøning og dyrkning

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.

KVALITETSKONTROL OG KRYOPRÆSERVERING

Sterilitet

Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder. For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.

Frysemedium	Som kryopræserveringsmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmobeskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryo-induceret stress.

Opbevaringsbetingelser

For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

Leveringsbetingelser

Kryopræserverede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. -78 °C under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

DONOR

Donorens alder	15 år
Etnisk tilhørsforhold	Kaukasisk

JURIDISKE FORHOLD OG SIKKERHED

Sikkerhedsforanstaltninger

Når man planlægger at opbevare et kryovæske i flydende nitrogen med henblik på fremtidig optøning, er det obligatorisk at overholde strenge sikkerhedsforanstaltninger. Passende beskyttelseshandsker og -tøj er afgørende, og der skal bruges ansigtsmaske eller sikkerhedsbriller under overførslen af frosne prøver til eller fra tanken med flydende nitrogen. Dette er for at mindske risikoen for skader fra potentielle kryovæskeeksplosioner ved fjernelse, som kan resultere i projektion af skarpe fragmenter.

Garanti

Hos Cytion står vi inde for vores produkters kvalitet og levedygtighed.
Vi garanterer, at vores celler vil være levedygtige ved kulturens start i 60 dage efter afsendelse fra vores faciliteter.
Vi sikrer, at alle materialer er i overensstemmelse med de specifikationer, der er beskrevet i analysecertifikatet og/eller produktarket
For alle detaljer henvises til vores <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default"">Garantierklæring

Der gælder aftaler med tredjeparter	Yes