U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1

300664

YLEISTÄ TIETOA

Kuvaus

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 on genomin muokattu ihmisen osteosarkoomasolulinja, joka on johdettu U2OS-soluista, joissa endogeeninen SEH1L (SEH1) -geeni on muokattu CRISPR/Cas9-tekniikalla koodaamaan in-frame SNAPf-tunniste. SEH1 on osa Y-kompleksia (tunnetaan myös nimellä NUP107-160-kompleksi), joka on ydinporokompleksin (NPC) ydinrakenteellinen moduuli, joka edistää porojen tukirakenteen kokoamista ja vakautta. Lisäämällä SNAPf-koodaussekvenssin endogeeniseen lokukseen, merkitty SEH1-proteiini ilmentyy natiivin säätelyn alaisena, säilyttäen fysiologiset ilmentymistasot ja minimoiden häiriöt ydinporojen koostumuksessa.
SNAPf-tag on muokattu, nopeasti reagoiva SNAP-tagin variantti, joka sitoutuu kovalenttisesti bentsyyliguaninikonjugoitujen substraattien kanssa, mikä mahdollistaa selektiivisen ja stabiilin fluoresoivan leimauksen elävissä tai kiinnitetyissä soluissa. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-soluissa fuusioproteiini lokalisoituu ydinvaipaan NPC:n jakautumiselle tyypillisellä pistekuvioisella tavalla. Koska merkintä tapahtuu endogeenisten proteiinitasojen tasolla, tämä järjestelmä sopii hyvin kvantitatiiviseen fluoresenssimikroskopiaan, superresoluutioiseen kuvantamiseen ja yksittäisten hiukkasten seurantaan, joiden tarkoituksena on analysoida NPC:n organisaatio ja stoikiometria. U2OS-solujen tasainen morfologia ja suuret tumat helpottavat entisestään ydinkalvon rakenteiden korkean resoluution visualisointia.
SEH1 osallistuu NPC:n biogeneesiin ja on myös ollut mukana mitoosissa tapahtuvissa kinetokoorin prosesseissa. Näin ollen tämä solulinja tarjoaa vankan alustan solusyklistä riippuvan NPC:n kokoamisen ja purkamisen, Y-kompleksin spatiaalisen organisaation huokosrakenteessa sekä SEH1:n mahdollisten kaksoisroolien tutkimiseen ydinkotelossa ja mitoosikinetokoorissa. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 mahdollistaa ydinporojen arkkitehtuurin ja dynamiikan mekanistisen tutkimuksen fysiologisesti merkityksellisissä ilmentymisolosuhteissa.

Kudos	Luu
Sairaus	Osteosarkooma
Metastaasikohde	Ensisijainen kasvaimen sijainti (luu)

Sovellukset

Y-kompleksi/NUP107-160-kompleksin biologia; SEH1:n rooli NPC:n tukirakenteen muodostumisessa; kinetokoriin liittyvät NPC-komponentit; NPC:n stoikiometria; SNAP-pulse-chase-leimaus; superresoluutiomikroskopia; NPC:n biogeneesi; mitootisen NPC:n hajoaminen ja uudelleenmuodostuminen

LUOKITTELU

Organismi	Ihminen
Sukupuoli	Nainen
Kasvuominaisuudet	Kiinnittynyt
GMO-status	GMO-S1

GMO-statuksen tiedot

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.

Bioturvallisuustaso	1

OMINAISUUDET

Morfologia	Epiteelin kaltainen
Solutyyppi	Epiteelisolut (osteosarkooma)

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

Kaksinkertaistumisaika	noin 24–36 tuntia

TUNNISTEET

Lähdeviite

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytionin luettelonumero 300664)

NCBI-verotunnus	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Tallettaja	Ellenbergin laboratorio (EMBL)

ILMENTYMINEN JA ALTTIUS

Proteiinin ilmentyminen

SEH1, SNAPf-tag

KÄSITTELY JA VILJELY

Viljelyalusta

McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukoosia, w: vakaa glutamiini, w: 2,0 mM natriumpyruvaattia, w: 2,2 g/l NaHCO3 (Cytionin artikkelinumero 820200a)

Inkubaatioilma	37 °C, 5 %CO2, kostutettu ilmakehä.

Ravintolisät

Täydennetään elatusainetta 10 % FBS:llä, 3,0 g/l glukoosilla, stabiililla glutamiinilla, 2,0 mM natriumpyruvaatilla, 2,2 g/l NaHCO3:lla, 1 % NEAA:lla

Dissosiaatioreagenssi	Accutase

Soluviljely

Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreeseen väliaineeseen ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

Jakosuhde	1–3
Kylvötiheys	1–3 × 10^4 solua/cm^2
Nesteen uusiminen	2-3 kertaa viikossa

Sulatus ja viljely

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.

LAADUNVALVONTA JA KRYOSÄILYTYS

Hedelmättömyys

Mykoplasmakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrityksillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.
Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.

Jäädytysaine	Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotectantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

Säilytysolosuhteet

Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen typpeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen typpeen.

Toimitusehdot

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäässä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

LAHJOITTAJA

Luovuttajan ikä	15 vuotta
Etnisyys	Kaukasialainen

OIKEUDELLISET JA TURVALLISUUSASIAT

Turvallisuusohjeet

Kun suunnitellaan kryoputken säilyttämistä nestemäisessä typessä sulatusta varten, on noudatettava tiukkoja turvatoimenpiteitä. Asianmukaiset suojakäsineet ja -vaatteet ovat välttämättömiä, ja kasvonaamarin tai suojalasien käyttö on välttämätöntä siirrettäessä jäädytettyjä näytteitä nestetyppisäiliöön tai siitä pois. Tällä pyritään pienentämään loukkaantumisriskiä, joka aiheutuu kryoputkien mahdollisista räjähdyksistä, jotka voivat aiheuttaa terävien sirpaleiden sinkoutumisen.

Takuu

Me Cytionilla seisomme tuotteidemme laadun ja elinkelpoisuuden takana.
Takaamme, että solumme ovat elinkelpoisia viljelyn alkaessa 60 päivän ajan sen jälkeen, kun ne on lähetetty laitoksestamme.
Vakuutamme, että kaikki materiaalit ovat analyysitodistuksessa ja/tai tuoteselosteessa kuvattujen eritelmien mukaisia
Lisätietoja on <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""""x-default"">Takuulausumassa

Sovelletaan kolmansien osapuolten kanssa tehtyjä sopimuksia	Yes