U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1

300664

VISPĀRĪGA INFORMĀCIJA

Apraksts

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 ir genomā rediģēta cilvēka osteosarkomas šūnu līnija, kas iegūta no U2OS šūnām, kurās endogēnais SEH1L (SEH1) gēns ir modificēts, izmantojot CRISPR/Cas9 tehnoloģiju, lai kodētu in-frame SNAPf tagu. SEH1 ir Y-kompleksa (pazīstams arī kā NUP107-160 komplekss) komponents, kas ir kodola poru kompleksa (NPC) galvenais strukturālais modulis, kas veicina poru skeleta montāžu un stabilitāti. Ievietojot SNAPf kodējošo sekvenci endogēnajā lokusā, marķētā SEH1 proteīna ekspresija notiek saskaņā ar dabisko regulējošo kontroli, saglabājot fizioloģiskos ekspresijas līmeņus un minimizējot traucējumus kodola poru sastāvā.
SNAPf marķieris ir inženierijas izstrādāts, ātri reaģējošs SNAP marķiera variants, kas kovalenti saistās ar benzilguanīna konjugētiem substrātiem, ļaujot selektīvi un stabili marķēt dzīvas vai fiksētas šūnas. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 šūnās fūzijas proteīns lokalizējas kodola apvalkā punktveida modelī, kas ir raksturīgs NPC izplatībai. Tā kā marķēšana notiek endogēno proteīnu līmenī, šī sistēma ir labi piemērota kvantitatīvai fluorescences mikroskopijai, superizšķirtspējas attēlveidošanai un vienu daļiņu izsekošanas analīzēm, kuru mērķis ir izpētīt NPC organizāciju un stehiometriju. U2OS šūnu plakana morfoloģija un lielie kodoli vēl vairāk atvieglo kodola apvalka struktūru vizualizāciju augstā izšķirtspējā.
SEH1 piedalās NPC biogēnēzē un ir iesaistīts arī kinetohoru saistītajos procesos mitozes laikā. Tādējādi šī šūnu līnija nodrošina stabilu platformu, lai pētītu šūnu cikla atkarīgo NPC montāžu un demontāžu, Y kompleksa telpisko organizāciju poru skeleta ietvaros un SEH1 potenciālo dubulto lomu kodola apvalkā un mitotiskajos kinetohoros. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 ļauj veikt mehāniskos pētījumus par kodola poru arhitektūru un dinamiku fizioloģiski atbilstošos ekspresijas apstākļos.

Audums	Bone
Slimība	Osteosarkoma
Metastāžu vieta	Primārā audzēja lokalizācija (kauls)

Pieteikumi

Y-kompleksa/NUP107-160 kompleksa bioloģija; SEH1 loma NPC karkasa veidošanā; ar kinetohoru saistītās NPC sastāvdaļas; NPC stehiometrija; SNAP „pulse-chase” marķēšana; superizšķirtspējas mikroskopija; NPC biogēneze; mitotiskā NPC izjaukšana un atkārtota salikšana

KLASIFIKĀCIJA

Organisms	Cilvēks
Sekss	Sieviete
Augšanas īpašības	Atbalstītājs
ĢMO statuss	GMO-S1

Sīkāka informācija par ĢMO statusu

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.

Bioloģiskās drošības līmenis	1

RAKSTURLIELUMI

Morfoloģija	Epitēlijveidīgs
Šūnu tips	Epitelio šūnas (osteosarkoma)

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

Laiks, kas nepieciešams, lai skaits dubultojās	aptuveni 24 līdz 36 stundas

IDENTIFIKATORI

Atsauce

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytion kataloga numurs 300664)

NCBI nodokļu identifikācijas numurs	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
noguldītājs	Ellenberga laboratorija (EMBL)

PAZĪMES UN UZŅĒMĪBA

Proteīnu ekspresija

SEH1, SNAPf-tag

APSTRĀDE UN AUDZĒŠANA

Barotne

McCoys 5a, w: 3,0 g/l glikoze, w: stabils glutamīns, w: 2,0 mM nātrija piruvāts, w: 2,2 g/l NaHCO3 (Cytion izstrādājuma numurs 820200a)

Inkubācijas vide	37°C, 5%CO2, mitrināta atmosfēra.

Papildinājumi

Papildināt barotni ar 10% FBS, 3,0 g/l glikozes, stabilu glutamīnu, 2,0 mM nātrija piruvāta, 2,2 g/l NaHCO3, 1% NEAA

Disociācijas reaģents	Accutase

Pārstādīšana

Noņemt veco barotni no pielipušajām šūnām un mazgāt tās ar PBS, kurā nav kalcija un magnija. T25 kolbām izmantojiet 3-5 ml PBS, bet T75 kolbām - 5-10 ml. Pēc tam pilnībā pārklājiet šūnas ar Accutase, izmantojot 1-2 ml T25 kolbām un 2,5 ml T75 kolbām. Ļaujiet šūnām inkubēties istabas temperatūrā 8-10 minūtes, lai tās atdalītos. Pēc inkubācijas uzmanīgi samaisiet šūnas ar 10 ml barotnes, lai tās atkārtoti suspendētu, pēc tam centrifugējiet 3 minūtes ar 300xg. Izmetiet supernatantu, atkārtoti suspendējiet šūnas svaigā barotnē un pārvietojiet tās jaunās kolbās, kurās jau ir svaiga barotne.

Sadalījuma attiecība	no 1 līdz 3
Sēšanas blīvums	1 līdz 3 × 10^4 šūnas/cm^2
Šķidruma atjaunošana	2 līdz 3 reizes nedēļā

Atkausēšana un kultivēšana

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.

KVALITĀTES KONTROLE UN KRIOKONSERVĀCIJA

Sterilitāte

Mikoplazmas piesārņojums tiek izslēgts, izmantojot gan uz PCR balstītus testus, gan uz luminiscenci balstītas mikoplazmas noteikšanas metodes.
Lai pārliecinātos, ka nav baktēriju, sēnīšu vai rauga piesārņojuma, šūnu kultūras katru dienu vizuāli pārbauda.

Saldēšanas barotne	Kā kriokonservēšanas barotni mēs izmantojam pilnvērtīgu augšanas barotni (ieskaitot FBS) + 10 % DMSO, lai nodrošinātu pietiekamu dzīvotspēju pēc atkausēšanas, vai CM-1 (Cytion kataloga numurs 800100), kas ietver optimizētus osmoprotektorus un metaboliskos stabilizatorus, lai uzlabotu atveseļošanos un samazinātu krioinducēto stresu.

Uzglabāšanas nosacījumi

Ilgstošai uzglabāšanai flakonus ievietojiet šķidrā slāpeklī ar tvaika fāzi aptuveni -150 līdz -196 °C temperatūrā. Uzglabāšana -80 °C temperatūrā ir pieļaujama tikai kā īss starpposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

Piegādes nosacījumi

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidruma daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

ZIEDOTĀJS

Donora vecums	15 gadi
Etniskā piederība	Kaukāzietis

JURIDISKIE JAUTĀJUMI UN DROŠĪBA

Drošības pasākumi

Plānojot uzglabāt kriokviālu šķidrā slāpeklī turpmākai atkausēšanai, obligāti jāievēro stingri drošības pasākumi. Ir nepieciešami piemēroti aizsargcimdi un apģērbs, un, pārvietojot sasaldētos paraugus uz šķidrā slāpekļa tvertni vai no tās, ir jālieto sejas maska vai aizsargbrilles. Tas jādara, lai mazinātu traumu risku, ko var radīt iespējamas kriokrioviālu eksplozijas, kas var izraisīt asu fragmentu izmešanu.

Garantija

Uzņēmumā Cytion mēs atbalstām savu produktu kvalitāti un dzīvotspēju.
Mēs garantējam, ka mūsu šūnas būs dzīvotspējīgas kultivēšanas sākumā 60 dienas pēc nosūtīšanas no mūsu ražotnēm.
Mēs nodrošinām, ka visi materiāli atbilst analīzes sertifikātā un/vai produkta lapā aprakstītajām specifikācijām
Lai iegūtu sīkāku informāciju, lūdzu, skatiet mūsu <a href=""/"/Kas mēs esam/garantija/"" hreflang=""x-default"">Garantijas paziņojumu

Tiek piemēroti līgumi ar trešajām personām	Yes

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