U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1

300664

ALGEMENE INFORMATIE

Beschrijving

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 is een genoom-bewerkte menselijke osteosarcoomcellijn afgeleid van U2OS-cellen waarin het endogene SEH1L (SEH1)-gen is gemodificeerd met behulp van CRISPR/Cas9-technologie om een in-frame SNAPf-tag te coderen. SEH1 is een onderdeel van het Y-complex (ook bekend als het NUP107-160-complex), een kernstructuurmodule van het nucleaire poriecomplex (NPC) die bijdraagt aan de assemblage en stabiliteit van het poriënraamwerk. Door de SNAPf-coderende sequentie op de endogene locus in te voegen, wordt het gemerkte SEH1-eiwit onder natuurlijke regulerende controle tot expressie gebracht, waardoor de fysiologische expressieniveaus behouden blijven en verstoringen van de samenstelling van de nucleaire poriën tot een minimum worden beperkt.
De SNAPf-tag is een gemanipuleerde, snel reagerende variant van de SNAP-tag die covalent bindt aan benzylguanine-geconjugeerde substraten, waardoor selectieve en stabiele fluorescerende labeling in levende of gefixeerde cellen mogelijk is. In U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-cellen lokaliseert het fusie-eiwit zich in de kernmembraan in een puntvormig patroon dat kenmerkend is voor de NPC-distributie. Omdat de labeling plaatsvindt op endogeen eiwitniveau, is dit systeem zeer geschikt voor kwantitatieve fluorescentiemicroscopie, superresolutiebeeldvorming en single-particle tracking-analyses gericht op het ontleden van de NPC-organisatie en stoichiometrie. De vlakke morfologie en grote kernen van U2OS-cellen vergemakkelijken bovendien de visualisatie met hoge resolutie van nucleaire envelopstructuren. SEH1 neemt deel aan de biogenese van NPC's en is ook betrokken bij kinetochore-gerelateerde processen tijdens mitose. Deze cellijn biedt dan ook een robuust platform voor onderzoek naar de celcyclusafhankelijke assemblage en desassemblage van NPC's, de ruimtelijke organisatie van het Y-complex binnen het poriënraamwerk en de mogelijke dubbele rol van SEH1 bij de kernmembraan en mitotische kinetochoren. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 maakt mechanistisch onderzoek mogelijk naar de architectuur en dynamica van nucleaire poriën onder fysiologisch relevante expressieomstandigheden.

Weefsel	Bot
Ziekte	Osteosarcoom
Plaats van uitzaaiingen	Locatie van de primaire tumor (bot)

Toepassingen

Biologie van het Y-complex/NUP107-160-complex; SEH1 bij de opbouw van het NPC-raamwerk; kinetochore-geassocieerde NPC-componenten; stoichiometrie van het NPC; SNAP-puls-chase-markering; superresolutiemicroscopie; NPC-biogenese; mitotische afbraak en heropbouw van het NPC

CLASSIFICATIE

Organisme	Mens
Seks	Vrouw
Groei-eigenschappen	Aanhanger
GGO-status	GMO-S1

Details over de GGO-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.

Bioveiligheidsniveau	1

KENMERKEN

Morfologie	Epitheelachtig

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

Celtype	Epitheelcellen (osteosarcoom)
Verdubbelingstijd	ongeveer 24 tot 36 uur

IDENTIFICATIEGEGEVENS

Bronvermelding

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

NCBI-belastingnummer	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Inlegger	Het Ellenberg Lab (EMBL)

EXPRESSIE EN VATBAARHEID

Eiwit-expressie

SEH1, SNAPf-tag

BEHANDELING EN KWEEK

Kweekmedium

McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucose, w: stabiel Glutamine, w: 2,0 mM Natriumpyruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO3 (Cytion artikelnummer 820200a)

Incubatieomgeving	37°C, 5%CO2, bevochtigde atmosfeer.

Supplementen

Vul het medium aan met 10% FBS, 3,0 g/L Glucose, stabiele Glutamine, 2,0 mM Natriumpyruvaat, 2,2 g/L NaHCO3, 1% NEAA

Dissociatiereagens	Accutase

Heruitplanten

Verwijder het oude medium van de adherente cellen en was ze met PBS zonder calcium en magnesium. Gebruik voor T25-flesjes 3-5 ml PBS en voor T75-flesjes 5-10 ml. Bedek de cellen vervolgens volledig met Accutase, met 1-2 ml voor T25-flesjes en 2,5 ml voor T75-flesjes. Laat de cellen gedurende 8-10 minuten bij kamertemperatuur incuberen om ze los te maken. Na incubatie de cellen voorzichtig mengen met 10 ml medium om ze te resuspenderen en vervolgens centrifugeren bij 300xg gedurende 3 minuten. Gooi het supernatant weg, resuspendeer de cellen in vers medium en breng ze over in nieuwe kolven die al vers medium bevatten.

Splitsingsverhouding	1 tot en met 3
Zaaidichtheid	1 tot 3 × 10^4 cellen/cm^2
Vloeistofverversing	2 tot 3 keer per week

Ontdooien en kweken

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.

KWALITEITSCONTROLE EN CRYOPRESERVATIE

Onvruchtbaarheid

Mycoplasmaverontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasmadetectiemethoden.
Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.

Kweekmedium invriezen	Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimedium (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

Opslagvoorwaarden

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Verzendvoorwaarden

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer -78 °C te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

DONATEUR

Leeftijd van de donor	15 jaar
Etnische afkomst	Kaukasisch

JURIDISCHE EN VEILIGHEIDSASPECTEN

Veiligheidsmaatregelen

Wanneer men van plan is om een cryovial in vloeibare stikstof op te slaan om later te ontdooien, is het verplicht om strenge veiligheidsmaatregelen in acht te nemen. Passende beschermende handschoenen en kleding zijn essentieel en het gebruik van een gezichtsmasker of veiligheidsbril is vereist tijdens het overbrengen van bevroren monsters naar of uit de tank met vloeibare stikstof. Dit is om het risico op letsel door mogelijke cryoviale explosies bij het verwijderen te beperken, wat kan resulteren in de projectie van scherpe fragmenten.

Garantie

Bij Cytion staan we achter de kwaliteit en levensvatbaarheid van onze producten.
We garanderen dat onze cellen levensvatbaar zijn bij het begin van de kweek gedurende 60 dagen na verzending vanuit onze faciliteiten.
We verzekeren dat alle materialen voldoen aan de specificaties beschreven in het analysecertificaat en/of productblad
Raadpleeg voor volledige informatie onze <a href=""/Wie-zijn-wij/Garantie/"" hreflang=""x-default"">Garantieverklaring

Er gelden overeenkomsten met derden	Yes