U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1

300664

ALLMÄN INFORMATION

Beskrivning

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 är en genredigerad human osteosarkomcellinje som härrör från U2OS-celler, där det endogena SEH1L-genet (SEH1) har modifierats med hjälp av CRISPR/Cas9-teknik för att koda för en in-frame SNAPf-tagg. SEH1 är en komponent i Y-komplexet (även känt som NUP107-160-komplexet), en central strukturell modul i kärnporekomplexet (NPC) som bidrar till porstommens sammansättning och stabilitet. Genom att infoga SNAPf-kodningssekvensen på den endogena lokusen uttrycks det taggade SEH1-proteinet under naturlig regulatorisk kontroll, vilket bevarar fysiologiska expressionsnivåer och minimerar störningar i kärnporernas sammansättning. SNAPf-taggen är en konstruerad, snabbverkande variant av SNAP-taggen som kovalent binder bensylguaninkonjugerade substrat, vilket möjliggör selektiv och stabil fluorescerande märkning i levande eller fixerade celler. I U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler lokaliseras fusionsproteinet till kärnmembranet i ett punktmönster som är karakteristiskt för NPC-distribution. Eftersom märkningen sker på endogena proteinnivåer är detta system väl lämpat för kvantitativ fluorescensmikroskopi, superupplösningsavbildning och enkelpartikelspårningsanalyser som syftar till att dissekera NPC-organisationen och stökiometrin. Den plana morfologin och de stora kärnorna i U2OS-celler underlättar ytterligare högupplöst visualisering av kärnmembranstrukturer.
SEH1 deltar i NPC-biogenes och har också kopplats till kinetokorassocierade processer under mitos. Följaktligen utgör denna cellinje en robust plattform för att undersöka cellcykelberoende NPC-montering och demontering, den rumsliga organisationen av Y-komplexet inom porstommen och SEH1:s potentiella dubbla roller vid kärnmembranet och mitotiska kinetokorer. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 möjliggör mekanistiska studier av kärnporernas arkitektur och dynamik under fysiologiskt relevanta expressionsförhållanden.

Vävnad	Ben
Sjukdom	Osteosarkom
Metastaseringsställe	Primärtumörens lokalisation (ben)

Ansökningar

Y-komplexets/NUP107-160-komplexets biologi; SEH1 vid bildandet av NPC-stommen; kinetokorassocierade NPC-komponenter; NPC:s stökiometri; SNAP-puls-chase-märkning; superupplösningsmikroskopi; NPC-biogenes; nedmontering och återuppbyggnad av NPC under mitosen

KLASSIFICERING

Organism	Människa
Kön	Kvinna
Tillväxtegenskaper	Följsam
GMO-status	GMO-S1

Detaljer 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.

Biosäkerhetsnivå	1

EGENSKAPER

Morfologi	Epitelliknande
Celltyp	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

Fördubblingstid	ca 24 till 36 timmar

IDENTIFIERARE

Källa

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

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

UTTRYCK OCH MOTTAGLIGHET

Proteinexpression

SEH1, SNAPf-tagg

HANTERING OCH ODLING

Odlingsmedium

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

Inkubationsatmosfär	37°C, 5%CO2, befuktad atmosfär.

Kosttillskott

Komplettera med 10% FBS, 3,0 g/L glukos, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO3, 1% NEAA

Dissociationsmedel	Accutase

Vidareodling

Ta bort det gamla mediet från de adherenta cellerna och tvätta dem med PBS som saknar kalcium och magnesium. Använd 3-5 ml PBS för T25-kolvar och 5-10 ml för T75-kolvar. Täck sedan cellerna helt med Accutase, använd 1-2 ml för T25-kolvar och 2,5 ml för T75-kolvar. Låt cellerna inkubera i rumstemperatur i 8-10 minuter så att de lossnar. Efter inkubationen, blanda cellerna försiktigt med 10 ml medium för att resuspendera dem och centrifugera sedan vid 300xg i 3 minuter. Kassera supernatanten, resuspendera cellerna i färskt medium och överför dem till nya kolvar som redan innehåller färskt medium.

Uppdelningsförhållande	1 till 3
Såtäthet	1 till 3 × 10^4 celler/cm^2
Vätskeförnyelse	2 till 3 gånger per vecka

Upptining och odling

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.

KVALITETSKONTROLL OCH KRYOKONSERVERING

Sterilitet

Mykoplasmakontaminering utesluts med hjälp av både PCR-baserade analyser och luminiscensbaserade metoder för mykoplasmadiagnostik. För att säkerställa att det inte finns någon kontaminering av bakterier, svamp eller jäst utsätts cellkulturerna för dagliga visuella inspektioner.

Frysmedel	Som kryokonserveringsmedium använder vi komplett tillväxtmedium (inklusive FBS) + 10% DMSO för adekvat viabilitet efter upptining, eller CM-1 (Cytion katalognummer 800100), som innehåller optimerade osmoprotektanter och metaboliska stabilisatorer för att förbättra återhämtningen och minska kryoinducerad stress.

Förvaringsförhållanden

För långtidsförvaring, placera flaskorna i flytande kväve i ångfas vid ca -150 till -196 °C. Förvaring vid -80 °C är acceptabelt endast som ett kort mellanliggande steg innan överföring till flytande kväve.

Leveransvillkor

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka -78 °C under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

DONATOR

Donatorns ålder	15 år
Etnicitet	Kaukasisk

JURIDISKA FRÅGOR OCH SÄKERHET

Säkerhetsföreskrifter

När man planerar att förvara en kryovial i flytande kväve för framtida upptining är det obligatoriskt att följa strikta säkerhetsåtgärder. Lämpliga skyddshandskar och skyddskläder är nödvändiga, och ansiktsmask eller skyddsglasögon måste användas vid överföring av frysta prover till eller från tanken med flytande kväve. Detta för att minska risken för skador på grund av eventuella explosioner i frysbehållaren vid borttagning, vilket kan leda till att vassa fragment projiceras.

Garanti

På Cytion står vi bakom våra produkters kvalitet och livskraft.
Vi garanterar att våra celler är livsdugliga vid odlingens början i 60 dagar efter leverans från våra anläggningar.
Vi försäkrar att allt material överensstämmer med de specifikationer som beskrivs i analyscertifikatet och/eller produktbladet
För fullständig information, se vår <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default"">Garantiförklaring

Avtal med tredje part gäller	Yes