U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133

300666

OBECNÉ INFORMACE

Popis

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 je geneticky modifikovaná lidská osteosarkomová buněčná linie odvozená od mateřské linie U2OS, ve které byl endogenní lokus NUP133 modifikován pomocí editace genomu zprostředkované CRISPR/Cas9 tak, aby kódoval C-terminální značku SNAPf. NUP133 je základní složkou Y-komplexu (komplex NUP107-160), strukturálního subkomplexu nezbytného pro sestavení a udržování jaderného pórového komplexu (NPC). Zavedením kódující sekvence SNAPf do endogenního lokusu je fúzní protein exprimován pod nativní regulační kontrolou, přičemž jsou zachovány fyziologické úrovně exprese a subcelulární lokalizace.
Značka SNAPf je variantou značky SNAP, která umožňuje rychlé značení. Jedná se o uměle vytvořenou O6-alkylguanin-DNA alkyltransferázu, která kovalentně reaguje se substráty konjugovanými s benzylguaninem. To umožňuje vysoce specifické a univerzální fluorescenční značení Nup133 v živých nebo fixovaných buňkách pomocí buněčně propustných nebo nepropustných substrátů SNAP. V buňkách U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 se fúzní protein lokalizuje do jaderné obálky v bodkovitém vzoru charakteristickém pro jaderné pórové komplexy. Protože značení probíhá na endogenním lokusu, stechiometrie a architektura NPC jsou minimálně narušeny, což činí tento model vhodným pro kvantitativní superrozlišovací mikroskopii, sledování jednotlivých molekul a kinetické analýzy sestavování a obratu NPC. Tato buněčná linie poskytuje robustní platformu pro studium jaderného transportu, dynamiky nukleocytoplazmatického transportu, biogeneze NPC během interfáze a postmitotické jaderné reasamblace a strukturální organizace Y-komplexu v rámci pórové kostry. Pozadí U2OS nabízí plochou morfologii a velká jádra, což usnadňuje zobrazování ve vysokém rozlišení. Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 jsou zvláště vhodné pro experimenty s pulzním značením, korelační světelnou a elektronovou mikroskopii a multibarevné zobrazovací přístupy v kombinaci s dalšími endogenně značenými nukleoporiny nebo transportními faktory.

Tkáň	Kost
Nemoc	Osteosarkom
Místo metastázy	Místo primárního nádoru (kost)

Aplikace

Biologie komplexu jaderných pórů (NPC); architektura komplexu Nup133/Y; biogeneze NPC; nukleocytoplazmatický transport; mikroskopie se superrozlišením (STORM/PALM/STED); sledování jednotlivých částic; značení SNAP metodou pulse-chase; korelační světelná a elektronová mikroskopie; kvantitativní stechiometrie NPC

KLASIFIKACE

Organismus	Člověk
Sex	Žena
Růstové vlastnosti	Přívrženec
Stav GMO	GMO-S1

Podrobnosti o statusu GMO

GMO-S1: This human osteosarcoma cell line (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) contains a CRISPR-introduced SNAPf-Nup133 fusion, enabling fluorescent tagging of the Nup133 nucleoporin. The insert is stably present. This classification applies only within Germany and may differ elsewhere.

Úroveň biologické bezpečnosti	1

CHARAKTERISTIKA

Morfologie	Epitelu podobné

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

Typ buňky	Epitelové buňky (osteosarkom)
Doba zdvojnásobení	přibližně 24 až 36 hodin

IDENTIFIKÁTORY

Citace

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (katalogové číslo Cytion 300666)

Daňové identifikační číslo NCBI	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Vkladatel	Ellenbergova laboratoř (EMBL)

EXPRESE A NÁCHYLNOST

Exprese proteinů

Nup133, SNAPf-tag

MANIPULACE A CHOV

Pěstovací médium

McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilní glutamin, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO3 (číslo článku Cytion 820200a)

Inkubační atmosféra	37 °C, 5 %CO2, zvlhčená atmosféra.

Doplňky stravy

Doplňte médium o 10% FBS, 3,0 g/l glukózy, stabilní glutamin, 2,0 mM pyruvát sodný, 2,2 g/l NaHCO3, 1% NEAA

Disociační činidlo	Accutase

Subkultivace

Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstřeďte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhoďte, buňky znovu rozpusťte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.

Poměr rozdělení	1 až 3
Hustota výsevu	1 až 3 × 10^4 buněk/cm^2
Obnova tekutin	2 až 3krát týdně

Rozmrazování a kultivace

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.

KONTROLA KVALITY A KRYOKONZERVACE

Sterilita

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy. Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuálním kontrolám.

Mrazicí médium	Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryo.

Podmínky skladování

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Dopravní podmínky

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

DÁRCE

Věk dárce	15 let
Etnická příslušnost	Kavkazský

PRÁVNÍ INFORMACE A BEZPEČNOSTNÍ POKYNY

Bezpečnostní opatření

Při plánování uložení kryovialu v kapalném dusíku pro budoucí rozmrazení je nutné dodržovat přísná bezpečnostní opatření. Nezbytné jsou vhodné ochranné rukavice a oděv a při přenášení zmrazených vzorků do nádrže s kapalným dusíkem nebo z ní je nutné používat obličejovou masku nebo ochranné brýle. To proto, aby se snížilo riziko zranění v důsledku možných výbuchů kryovialů při jejich vyjímání, které mohou mít za následek vystřelování ostrých úlomků.

Záruka

Ve společnosti Cytion si stojíme za kvalitou a životaschopností našich produktů.
Zaručujeme, že naše buňky budou životaschopné na začátku kultivace po dobu 60 dnů po odeslání z našich zařízení.
Zaručujeme, že všechny materiály odpovídají specifikacím popsaným v certifikátu analýzy a/nebo v produktovém listu
Úplné informace naleznete v našem <a href=""/Kdo-jsme/Záruka/"" hreflang=""x-default"">Záručním prohlášení

Platí smlouvy s třetími stranami	Yes