U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133

300666

GENERELLE OPLYSNINGER

Beskrivelse

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 er en genetisk manipuleret human osteosarkomcellelinje afledt af den oprindelige U2OS-baggrund, hvor det endogene NUP133-lokus er blevet modificeret ved hjælp af CRISPR/Cas9-medieret genomredigering for at kode for et C-terminalt SNAPf-tag. NUP133 er en kernekomponent i Y-komplekset (NUP107-160-komplekset), et strukturelt subkompleks, der er essentielt for samling og vedligeholdelse af nukleare porekomplekser (NPC). Ved at indføre SNAPf-kodningssekvensen in-frame på det endogene locus udtrykkes fusionsproteinet under naturlig regulatorisk kontrol, hvilket bevarer fysiologiske ekspressionsniveauer og subcellulær lokalisering.
SNAPf-tagget er en hurtigt mærkende variant af SNAP-tagget, et konstrueret O6-alkylguanin-DNA-alkyltransferase, der reagerer kovalent med benzylguanin-konjugerede substrater. Dette muliggør en meget specifik og alsidig fluorescerende mærkning af Nup133 i levende eller fiksede celler ved hjælp af cellepermeable eller impermeable SNAP-substrater. I U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler lokaliseres fusionsproteinet til kernehinden i et punktformet mønster, der er karakteristisk for kerneporekomplekser. Da mærkningen finder sted på det endogene locus, forstyrres NPC-støkiometrien og -arkitekturen minimalt, hvilket gør denne model velegnet til kvantitativ superopløsningsmikroskopi, sporing af enkeltmolekyler og kinetiske analyser af NPC-samling og -omsætning.
Denne cellelinje udgør en robust platform for studier af nuklear transport, nukleocytoplasmatisk trafikdynamik, NPC-biogenese under interfase og postmitotisk nuklear genopbygning samt strukturel organisering af Y-komplekset inden for porestrukturen. U2OS-baggrunden tilbyder flad morfologi og store kerner, hvilket letter højopløsningsbilleddannelse. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler er særligt velegnede til puls-chase-mærkningsforsøg, korrelativ lys- og elektronmikroskopi og flerfarvede billeddannelsesmetoder i kombination med yderligere endogent mærkede nukleoporiner eller transportfaktorer.

Væv	Knogle
Sygdom	Osteosarkom
Metastasested	Primær tumorlokalisation (knogle)

Anvendelser

Biologi vedrørende kerneporekomplekset (NPC); Nup133/Y-kompleksets arkitektur; NPC-biogenese; transport mellem cellekerne og cytoplasma; superopløsningsmikroskopi (STORM/PALM/STED); sporing af enkeltpartikler; puls-chase SNAP-mærkning; korrelativ lys- og elektronmikroskopi; kvantitativ NPC-støkiometri

KLASSIFICERING

Organisme	Menneske
Køn	Kvinde
Vækstegenskaber	Tilhænger
GMO-status	GMO-S1

Oplysninger om GMO-status

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.

Biosikkerhedsniveau	1

EGENSKABER

Morfologi	Epitel-lignende

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

Celletype	Epithelceller (osteosarkom)
Fordoblingstid	ca. 24 til 36 timer

IDENTIFIKATORER

Kildehenvisning

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytion katalognummer 300666)

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

UDTRYK OG MODTAGELIGHED

Proteinekspression

Nup133, SNAPf-tag

HÅNDTERING OG OPDRÆT

Næringsmedium

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

Inkubationsatmosfære	37°C, 5%CO2, befugtet atmosfære.

Kosttilskud

Suppler mediet med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO3, 1 % NEAA

Dissociationsreagens	Accutase

Oddyrkning

Fjern det gamle medium fra de klæbende celler, og vask dem med PBS, der ikke indeholder calcium og magnesium. Brug 3-5 ml PBS til T25-kolber og 5-10 ml til T75-kolber. Dæk derefter cellerne helt med Accutase, brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber. Lad cellerne inkubere ved stuetemperatur i 8-10 minutter for at løsne dem. Efter inkubationen blandes cellerne forsigtigt med 10 ml medium for at resuspendere dem, og centrifugeres derefter ved 300xg i 3 minutter. Kassér supernatanten, resuspender cellerne i frisk medium, og overfør dem til nye kolber, der allerede indeholder frisk medium.

Opdelingsforhold	1 til 3
Såtæthed	1 til 3 × 10^4 celler/cm^2
Væskeudskiftning	2 til 3 gange om ugen

Optøning og dyrkning

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.

KVALITETSKONTROL OG KRYOPRÆSERVERING

Sterilitet

Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder. For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.

Frysemedium	Som kryopræserveringsmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmobeskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryo-induceret stress.

Opbevaringsbetingelser

For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

Leveringsbetingelser

Kryopræserverede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. -78 °C under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

DONOR

Donorens alder	15 år
Etnisk tilhørsforhold	Kaukasisk

JURIDISKE FORHOLD OG SIKKERHED

Sikkerhedsforanstaltninger

Når man planlægger at opbevare et kryovæske i flydende nitrogen med henblik på fremtidig optøning, er det obligatorisk at overholde strenge sikkerhedsforanstaltninger. Passende beskyttelseshandsker og -tøj er afgørende, og der skal bruges ansigtsmaske eller sikkerhedsbriller under overførslen af frosne prøver til eller fra tanken med flydende nitrogen. Dette er for at mindske risikoen for skader fra potentielle kryovæskeeksplosioner ved fjernelse, som kan resultere i projektion af skarpe fragmenter.

Garanti

Hos Cytion står vi inde for vores produkters kvalitet og levedygtighed.
Vi garanterer, at vores celler vil være levedygtige ved kulturens start i 60 dage efter afsendelse fra vores faciliteter.
Vi sikrer, at alle materialer er i overensstemmelse med de specifikationer, der er beskrevet i analysecertifikatet og/eller produktarket
For alle detaljer henvises til vores <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default"">Garantierklæring

Der gælder aftaler med tredjeparter	Yes