U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133

300666

ÜLDINE TEAVE

Kirjeldus

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 on geneetiliselt muundatud inimese osteosarkoomi rakuliin, mis on saadud vanemlikust U2OS-taustast, kus endogeenne NUP133-lokus on muundatud CRISPR/Cas9-vahendatud genoomi redigeerimise abil, et kodeerida C-terminaalne SNAPf-märgis. NUP133 on Y-kompleksi (NUP107-160 kompleks) põhikomponent, struktuuriline alakompleks, mis on oluline tuumapooride kompleksi (NPC) kokkupanekuks ja säilitamiseks. SNAPf kodeeriva järjestuse sisseviimisega endogeensesse lokusesse ekspresseeritakse fusioonvalku loomuliku regulatsiooni kontrolli all, säilitades füsioloogilised ekspressioonitasemed ja subtsellulaarse lokaliseerumise.
SNAPf-märgis on SNAP-märgise kiire märgistamise variant, mis on insenereeritud O6-alküülguanine-DNA alküültransferaas, mis reageerib kovalentselt bentsüülguanine-konjugeeritud substraatidega. See võimaldab Nup133 väga spetsiifilist ja mitmekülgset fluorestsentsmärgistamist elusates või fikseeritud rakkudes, kasutades rakkudele läbilaskvaid või läbilaskmatuid SNAP-substraate. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 rakkudes lokaliseerub fusioonvalk tuumaümbrise punktide mustrina, mis on iseloomulik tuumapooride kompleksidele. Kuna märgistamine toimub endogeenses lokuses, on NPC stoikiomeetria ja arhitektuur minimaalselt häiritud, mistõttu see mudel sobib kvantitatiivseks üliresolutsioonilise mikroskoopia, ühe molekuli jälgimise ja NPC kokkupaneku ja käibe kineetilise analüüsi jaoks. See rakuliin pakub tugevat platvormi tuuma transpordi, tuuma-tsütoplasma liikumise dünaamika, NPC biogeneesi interfase ja postmitotilise tuuma taaskoostumise ning Y-kompleksi struktuurilise korralduse uurimiseks pooride raamistikus. U2OS taust pakub siledat morfoloogiat ja suuri tuumi, mis hõlbustab kõrge resolutsiooniga pildistamist. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 rakud sobivad eriti hästi impulss-jälgimise märgistamise eksperimentideks, korrelatiivseks valgus- ja elektronmikroskoopiasseks ning mitmevärviliseks pildistamiseks kombinatsioonis täiendavate endogeenselt märgistatud nukleoporiinide või transportfaktoritega.

Kude	Bone
Haigus	Osteosarkoom
Metastaaside asukoht	Esmane kasvaja asukoht (luu)

Rakendused

Tuumapoorikompleksi (NPC) bioloogia; Nup133/Y-kompleksi arhitektuur; NPC biogenees; tuuma-tsütoplasma transport; ülitäpne mikroskoopia (STORM/PALM/STED); üksikpartikli jälgimine; pulse-chase SNAP-märgistamine; korrelatiivne valgus- ja elektronmikroskoopia; kvantitatiivne NPC stoikiomeetria

KLASSIFIKATSIOON

Organism	Inimene
Sugu	Naine
Kasvuvõime	Järgija
GMO-staatus	GMO-S1

GMO-staatuse üksikasjad

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.

Bioloogilise ohutuse tase	1

OMADUSED

Morfoloogia	Epiteelilaadsed

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

Rakutüüp	Epiteelrakud (osteosarkoom)
Kahekordistumisaeg	umbes 24–36 tundi

TUNNUSED

Viide

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytioni kataloginumber 300666)

NCBI maksukood	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Hoiustaja	Ellenbergi labor (EMBL)

AVALDUMINE JA VASTUVÕTLIKKUS

Valgu ekspressioon

Nup133, SNAPf-tag

KÄSITLEMINE JA KASVATAMINE

Kasvatuskeskkond

McCoys 5a, w: 3,0 g/L glükoos, w: stabiilne glutamiin, w: 2,0 mM naatriumpüruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO3 (Cytioni artikli number 820200a)

Inkubatsiooni keskkond	37°C, 5%CO2, niisutatud atmosfäär.

Toidulisandid

Täiendada söötme 10% FBS, 3,0 g/L glükoosi, stabiilse glutamiini, 2,0 mM naatriumpüruvaadi, 2,2 g/L NaHCO3, 1% NEAAga

Dissotsiatsioonireaktiiv	Accutase

Kultuuri edasikasvatamine

Eemaldage kleepunud rakkudelt vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspenseerida, seejärel tsentrifuugige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.

Jagamissuhe	1–3
Külvitihedus	1–3 × 10^4 rakku/cm^2
Vedeliku vahetus	2 kuni 3 korda nädalas

Sulatamine ja kasvatamine

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.

KVALITEEDIKONTROLL JA KRÜOKONSERVEERIMINE

Viljatus

Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminestsentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.
Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.

Külmutuskeskkond	Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni kataloginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

Säilitamistingimused

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Tarne- ja kohaletoimetamistingimused

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78 °C. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige viaalid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

ANNETAJA

Doonori vanus	15 aastat
Etniline kuuluvus	Kaukaasia

ÕIGUSLIKUD JA OHUTUSALASED KÜSIMUSED

Ohutusnõuded

Kui plaanitakse krüoviaalide säilitamist vedelas lämmastikus tulevase sulatamise eesmärgil, on kohustuslik järgida rangeid ohutusmeetmeid. Asjakohased kaitsekindad ja -riietus on hädavajalikud ning külmutatud proovide vedela lämmastiku mahutisse või mahutist väljaviimisel tuleb kasutada näomaski või kaitseprille. See on vajalik selleks, et vähendada vigastuste ohtu, mis tuleneb võimalikest krüoviaalide plahvatustest eemaldamisel, mille tagajärjel võivad välja paiskuda teravad killud.

Garantii

Cytion seisab oma toodete kvaliteedi ja elujõulisuse eest.
Me garanteerime, et meie rakud on elujõulised kasvatamise alguses 60 päeva jooksul pärast meie rajatistest saatmist.
Tagame, et kõik materjalid vastavad analüüsisertifikaadis ja/või tootelehel kirjeldatud spetsifikatsioonidele
Täielikke üksikasju leiate meie <a href="""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang="""x-default"">Tagatise avaldusest

Kehtivad kolmandate osapooltega sõlmitud lepingud	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