U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133

300666

GENERELL INFORMASJON

Beskrivelse

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 er en genetisk manipulert human osteosarkomcellelinje avledet fra den opprinnelige U2OS-bakgrunnen, hvor det endogene NUP133-lokuset er modifisert ved hjelp av CRISPR/Cas9-mediert genomredigering for å kode for en C-terminal SNAPf-tag. NUP133 er en kjernekomponent i Y-komplekset (NUP107-160-komplekset), et strukturelt subkompleks som er essensielt for sammensetningen og vedlikeholdet av nukleære porekomplekset (NPC). Ved å introdusere SNAPf-kodingssekvensen i rammen ved det endogene lokuset, uttrykkes fusjonsproteinet under naturlig regulatorisk kontroll, slik at fysiologiske ekspresjonsnivåer og subcellulær lokalisering bevares.
SNAPf-taggen er en hurtigmerkingsvariant av SNAP-taggen, en konstruert O6-alkylguanin-DNA-alkyltransferase som reagerer kovalent med benzylguanin-konjugerte substrater. Dette muliggjør høyspesifikk og allsidig fluorescerende merking av Nup133 i levende eller fiksert celler ved hjelp av cellepermeable eller impermeable SNAP-substrater. I U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler lokaliseres fusjonsproteinet til kjernemembranen i et punktformet mønster som er karakteristisk for kjerneporekomplekser. Fordi merking skjer på det endogene lokuset, forstyrres NPC-støkiometrien og -arkitekturen minimalt, noe som gjør denne modellen egnet for kvantitativ superoppløsningsmikroskopi, sporing av enkeltmolekyler og kinetiske analyser av NPC-montering og -omsetning.
Denne cellelinjen gir en robust plattform for å studere nukleær transport, nukleocytoplasmatisk trafikkdynamikk, NPC-biogenese under interfase og postmitotisk nukleær reassembly, og strukturell organisering av Y-komplekset innenfor porestøtten. U2OS-bakgrunnen gir flat morfologi og store kjerner, noe som muliggjør høyoppløselig avbildning. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler er spesielt godt egnet for puls-chase-merkingseksperimenter, korrelativ lys- og elektronmikroskopi og flerfarget avbildning i kombinasjon med ytterligere endogent merkede nukleoporiner eller transportfaktorer.

Vev	Bein
Sykdom	Osteosarkom
Metastaseområde	Primærsvulstens lokalisering (bein)

Søknader

Biologi knyttet til kjerneporekomplekset (NPC); Nup133/Y-kompleksets arkitektur; NPC-biogenese; nukleocytoplasmatisk transport; superoppløsningsmikroskopi (STORM/PALM/STED); sporing av enkeltpartikler; puls-chase SNAP-merking; korrelativ lys- og elektronmikroskopi; kvantitativ NPC-støkiometri

KLASSIFISERING

Organisme	Menneske
Sex	Kvinne
Vekstegenskaper	Tilhenger
GMO-status	GMO-S1

Detaljer 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.

Biosikkerhetsnivå	1

EGENSKAPER

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	Epitelceller (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)
Innskjærer	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)

UTTRYKK OG MOTTAKELIGHET

Proteinekspresjon

Nup133, SNAPf-tag

HÅNDTERING OG KULTUR

Næringsmedium

McCoys 5a, m: 3,0 g/L glukose, m: stabil glutamin, m: 2,0 mM natriumpyruvat, m: 2,2 g/L NaHCO3 (Cytion artikkelnummer 820200a)

Inkubasjonsatmosfære	37 °C, 5 %CO2, befuktet atmosfære.

Kosttilskudd

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

Dissosiasjonsmiddel	Accutase

Subkultivering

Fjern det gamle mediet fra de adherente cellene, og vask dem med PBS uten kalsium og magnesium. Bruk 3-5 ml PBS for T25-kolber og 5-10 ml for T75-kolber. Dekk deretter cellene helt med Accutase, med 1-2 ml for T25-kolber og 2,5 ml for T75-kolber. La cellene inkubere i romtemperatur i 8-10 minutter for å løsne dem. Etter inkubasjon blandes cellene forsiktig med 10 ml medium for å resuspendere dem, og sentrifuger deretter ved 300xg i 3 minutter. Kast supernatanten, resuspender cellene i nytt medium, og overfør dem til nye kolber som allerede inneholder nytt medium.

Oppdelingsforhold	1 til 3
Såtetthet	1 til 3 × 10^4 celler/cm^2
Væskefornyelse	2 til 3 ganger per uke

Tining og dyrking

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 OG KRYOKONSERVERING

Sterilitet

Mykoplasma-kontaminering utelukkes ved hjelp av både PCR-baserte analyser og luminescensbaserte metoder for påvisning av mykoplasma.
For å sikre at det ikke finnes bakterie-, sopp- eller gjærkontaminering, blir cellekulturene inspisert visuelt hver dag.

Frysemedium	Som kryopreserveringsmedium bruker vi komplett vekstmedium (inkludert FBS) + 10 % DMSO for tilstrekkelig levedyktighet etter opptining, eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som inneholder optimaliserte osmobeskyttende midler og metabolske stabilisatorer for å øke utvinningen og redusere kryoindusert stress.

Oppbevaringsbetingelser

For langtidsoppbevaring plasseres hetteglassene i flytende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Lagring ved -80 °C er kun akseptabelt som et kort mellomtrinn før overføring til flytende nitrogen.

Fraktvilkår

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. -78 °C under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

DONOR

Donorens alder	15 år
Etnisitet	Kaukasisk

JURIDISK OG SIKKERHET

Sikkerhetsregler

Når du planlegger å oppbevare et kryovial i flytende nitrogen for senere tining, er det obligatorisk å følge strenge sikkerhetstiltak. Det er viktig å bruke egnede vernehansker og -klær, og det er påbudt å bruke ansiktsmaske eller vernebriller under overføring av frosne prøver til eller fra tanken med flytende nitrogen. Dette er for å redusere risikoen for skader som følge av potensielle kryovæskeeksplosjoner ved fjerning, noe som kan føre til at skarpe fragmenter slynges ut.

Garanti

Hos Cytion står vi bak kvaliteten og levedyktigheten til produktene våre.
Vi garanterer at cellene våre vil være levedyktige ved starten av dyrkingen i 60 dager etter at de er sendt fra våre anlegg.
Vi forsikrer at alle materialer er i samsvar med spesifikasjonene som er beskrevet i analysesertifikatet og/eller produktarket
For fullstendig informasjon, se vår <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default"">Garantierklæring

Avtaler med tredjeparter gjelder	Yes