U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133

300666

INFORMACJE OGÓLNE

Opis

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 to genetycznie zmodyfikowana linia komórek ludzkiego osteosarcoma pochodząca z macierzystego tła U2OS, w której endogenny locus NUP133 został zmodyfikowany za pomocą edycji genomu za pomocą CRISPR/Cas9 w celu zakodowania tagu C-terminalnego SNAPf. NUP133 jest podstawowym składnikiem kompleksu Y (kompleksu NUP107-160), podkompleksu strukturalnego niezbędnego do montażu i utrzymania kompleksu porów jądrowych (NPC). Dzięki wprowadzeniu sekwencji kodującej SNAPf w ramce endogennego locus, białko fuzyjne jest wyrażane pod natywną kontrolą regulacyjną, zachowując fizjologiczne poziomy ekspresji i lokalizację subkomórkową.
Tag SNAPf jest szybko znakującym wariantem tagu SNAP, inżynieryjnej O6-alkiloguaniny-DNA alkiltransferazy, która reaguje kowalencyjnie z substratami sprzężonymi z benzyloguaniną. Umożliwia to wysoce specyficzne i wszechstronne znakowanie fluorescencyjne Nup133 w żywych lub utrwalonych komórkach przy użyciu substratów SNAP przenikających lub nieprzenikających przez komórki. W komórkach U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 białko fuzyjne lokalizuje się w otoczce jądrowej w postaci charakterystycznych dla kompleksów porów jądrowych punktów. Ponieważ znakowanie odbywa się w endogenicznym locus, stechiometria i architektura NPC są minimalnie zaburzone, co sprawia, że model ten nadaje się do ilościowej mikroskopii superrozdzielczej, śledzenia pojedynczych cząsteczek oraz analiz kinetycznych montażu i obrotu NPC.
Ta linia komórkowa stanowi solidną platformę do badania transportu jądrowego, dynamiki transportu jądrowo-cytoplazmatycznego, biogenezy NPC podczas interfazy i ponownego montażu jądra po mitozy oraz organizacji strukturalnej kompleksu Y w ramach szkieletu porów. Tło U2OS oferuje płaską morfologię i duże jądra, ułatwiając obrazowanie w wysokiej rozdzielczości. Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 są szczególnie dobrze przystosowane do eksperymentów znakowania metodą pulse-chase, korelacyjnej mikroskopii świetlnej i elektronowej oraz wielobarwnego obrazowania w połączeniu z dodatkowymi endogennie znakowanymi nukleoporinami lub czynnikami transportowymi.

Chusteczka	Kość
Choroba	Mięsak kościopochodny
Miejsce przerzutów	Miejsce występowania guza pierwotnego (kość)

Zastosowania

Biologia kompleksu porów jądrowych (NPC); architektura kompleksu Nup133/Y; biogeneza NPC; transport jądrowo-cytoplazmatyczny; mikroskopia superrozdzielcza (STORM/PALM/STED); śledzenie pojedynczych cząstek; znakowanie SNAP metodą pulse-chase; korelacyjna mikroskopia świetlna i elektronowa; ilościowa stechiometria NPC

KLASYFIKACJA

Organizm	Człowiek
Seks	Kobieta
Właściwości związane ze wzrostem	Zwolennik
Status GMO	GMO-S1

Szczegółowe informacje dotyczące 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.

Poziom bezpieczeństwa biologicznego	1

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

CECHY CHARAKTERYSTYCZNE

Morfologia	Podobny do nabłonka
Typ komórki	Komórki nabłonkowe (osteosarcoma)
Czas podwojenia	ok. 24–36 godzin

IDENTYFIKATORY

Źródło

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (numer katalogowy Cytion 300666)

Numer identyfikacji podatkowej NCBI	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Wkładca	Laboratorium Ellenberg (EMBL)

EKSPRESJA I PODATNOŚĆ

Ekspresja białek

Nup133, SNAPf-tag

POSTĘPOWANIE I HODOWLA

Pożywka hodowlana

McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukozy, w: stabilna glutamina, w: 2,0 mM pirogronianu sodu, w: 2,2 g/l NaHCO3 (numer artykułu Cytion 820200a)

Atmosfera inkubacyjna	37°C, 5%CO2, nawilżona atmosfera.

Suplementy

Uzupełnić pożywkę o 10% FBS, 3,0 g/l glukozy, stabilną glutaminę, 2,0 mM pirogronianu sodu, 2,2 g/l NaHCO3, 1% NEAA

Odczynnik dysocjacyjny	Accutase

Hodowla komórek w subkulturze

Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzucić supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Współczynnik podziału	od 1 do 3
Gęstość wysiewu	od 1 do 3 × 10^4 komórek/cm^2
Odnawianie płynów	2 do 3 razy w tygodniu

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

Rozmrażanie i hodowla

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 JAKOŚCI I KRIOKONSERWACJA

Bezpłodność

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.
Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.

Pożywka do zamrażania	Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

Warunki przechowywania

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiolki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C.
Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Warunki wysyłki

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

DARCZYŃCA

Wiek dawcy	15 lat
Pochodzenie etniczne	Kaukaski

KWESTIE PRAWNE I BEZPIECZEŃSTWO

Środki bezpieczeństwa

Planując przechowywanie kriofiolek w ciekłym azocie w celu ich późniejszego rozmrożenia, należy bezwzględnie przestrzegać rygorystycznych środków bezpieczeństwa. Niezbędne są odpowiednie rękawice i odzież ochronna, a podczas przenoszenia zamrożonych próbek do lub ze zbiornika z ciekłym azotem wymagane jest stosowanie maski lub okularów ochronnych. Ma to na celu zmniejszenie ryzyka obrażeń spowodowanych potencjalnymi eksplozjami kriowialu podczas wyjmowania, które mogą skutkować wyrzuceniem ostrych fragmentów.

Gwarancja

W Cytion gwarantujemy jakość i żywotność naszych produktów.
Gwarantujemy, że nasze komórki będą żywotne na początku hodowli przez 60 dni po wysyłce z naszych zakładów.
Zapewniamy, że wszystkie materiały są zgodne ze specyfikacjami opisanymi w certyfikacie analizy i/lub karcie produktu
Szczegółowe informacje można znaleźć w naszej <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default"">Oświadczeniu gwarancyjnym

Obowiązują umowy z podmiotami zewnętrznymi	Yes