U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133

300666

INFORMAÇÕES GERAIS

Descrição

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 é uma linha celular de osteossarcoma humano geneticamente modificada, derivada da linha parental U2OS, na qual o locus NUP133 endógeno foi modificado usando edição do genoma mediada por CRISPR/Cas9 para codificar uma etiqueta SNAPf C-terminal. O NUP133 é um componente central do complexo Y (complexo NUP107-160), um subcomplexo estrutural essencial para a montagem e manutenção do complexo de poros nucleares (NPC). Ao introduzir a sequência de codificação SNAPf no locus endógeno, a proteína de fusão é expressa sob controlo regulatório nativo, preservando os níveis de expressão fisiológica e a localização subcelular.
A etiqueta SNAPf é uma variante de marcação rápida da etiqueta SNAP, uma O6-alquilguanina-DNA alquiltransferase projetada que reage covalentemente com substratos conjugados com benzilguanina. Isso permite a marcação fluorescente altamente específica e versátil de Nup133 em células vivas ou fixas usando substratos SNAP permeáveis ou impermeáveis às células. Nas células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, a proteína de fusão localiza-se no envelope nuclear num padrão pontilhado característico dos complexos de poros nucleares. Como a marcação ocorre no locus endógeno, a estequiometria e a arquitetura do NPC são minimamente perturbadas, tornando este modelo adequado para microscopia quantitativa de super-resolução, rastreamento de moléculas únicas e análises cinéticas da montagem e renovação do NPC.
Esta linha celular fornece uma plataforma robusta para o estudo do transporte nuclear, da dinâmica do tráfego nucleocitoplasmático, da biogênese do NPC durante a interfase e a remontagem nuclear pós-mitótica e da organização estrutural do complexo Y dentro da estrutura do poro. O fundo U2OS oferece morfologia plana e núcleos grandes, facilitando a imagem de alta resolução. As células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 são particularmente adequadas para experiências de marcação pulse-chase, microscopia correlativa de luz e eletrónica e abordagens de imagem multicoloridas em combinação com nucleoporinas ou fatores de transporte endógenos marcados adicionalmente.

Tecido	Osso
Doença	Osteossarcoma
Local da metástase	Localização do tumor primário (osso)

Aplicações

Biologia do complexo de poros nucleares (NPC); Arquitetura do complexo Nup133/Y; biogénese do NPC; transporte nucleocitoplasmático; microscopia de super-resolução (STORM/PALM/STED); rastreio de partículas individuais; marcação SNAP por pulso-perseguição; microscopia correlativa de luz e eletrónica; estequiometria quantitativa do NPC

CLASSIFICAÇÃO

Organismo	Humano
Sexo	Feminino
Propriedades de crescimento	Aderente
Estatuto em matéria de OGM	GMO-S1

Detalhes sobre o estatuto dos OGM

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.

Nível de biossegurança	1

CARACTERÍSTICAS

Morfologia	De tipo epitelial

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

Tipo de célula	Células epiteliais (osteossarcoma)
Tempo de duplicação	aprox. 24 a 36 horas

IDENTIFICADORES

Referência

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (número de catálogo Cytion 300666)

Número de identificação fiscal do NCBI	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Depositante	O Laboratório Ellenberg (EMBL)

EXPRESSÃO E SUSCETIBILIDADE

Expressão proteica

Nup133, SNAPf-tag

MANUSEAMENTO E CULTURA

Meio de cultura

McCoys 5a, com: 3,0 g/L de glucose, com: glutamina estável, com: 2,0 mM de piruvato de sódio, com: 2,2 g/L de NaHCO3 (número de artigo Cytion 820200a)

Atmosfera de incubação	37°C, 5%CO2, atmosfera humidificada.

Suplementos

Suplementar o meio com 10% de FBS, 3,0 g/L de glucose, glutamina estável, 2,0 mM de piruvato de sódio, 2,2 g/L de NaHCO3, 1% de NEAA

Reagente de dissociação	Accutase

Subcultura

Retirar o meio antigo das células aderentes e lavá-las com PBS sem cálcio e magnésio. Nos frascos T25, utilizar 3-5 ml de PBS e nos frascos T75, 5-10 ml. Em seguida, cobrir completamente as células com Accutase, utilizando 1-2 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75. Deixar as células incubar à temperatura ambiente durante 8-10 minutos para as destacar. Após a incubação, misturar suavemente as células com 10 ml de meio para as ressuspender e, em seguida, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Deitar fora o sobrenadante, ressuspender as células em meio fresco e transferi-las para novos frascos que já contenham meio fresco.

Rácio de divisão	1 a 3
Densidade de sementeira	1 a 3 × 10^4 células/cm^2
Renovação de fluidos	2 a 3 vezes por semana

Descongelamento e cultura

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.

CONTROLO DE QUALIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO

Esterilidade

A contaminação por micoplasma é excluída utilizando ensaios baseados em PCR e métodos de deteção de micoplasma baseados em luminescência.
Para garantir que não há contaminação bacteriana, fúngica ou de leveduras, as culturas de células são sujeitas a inspecções visuais diárias.

Meio de congelação	Como meio de criopreservação, utilizamos um meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% DMSO para uma viabilidade pós-descongelamento adequada, ou CM-1 (número de catálogo Cytion 800100), que inclui osmoprotectores optimizados e estabilizadores metabólicos para melhorar a recuperação e reduzir o stress induzido pela crio.

Condições de armazenamento

Para conservação a longo prazo, colocar os frascos em azoto líquido em fase de vapor a uma temperatura entre -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como um curto passo intermédio antes da transferência para azoto líquido.

Condições de envio

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

DOADOR

Idade do dador	15 anos
Etnia	Caucasiano

ASPECTOS LEGAIS E DE SEGURANÇA

Precauções de segurança

Quando se planeia armazenar um criovial em nitrogénio líquido para descongelação futura, é obrigatório aderir a medidas de segurança rigorosas. Luvas e vestuário de proteção adequados são essenciais, e a utilização de uma máscara facial ou óculos de segurança é necessária durante a transferência de amostras congeladas para ou do tanque de nitrogénio líquido. Isto destina-se a mitigar o risco de ferimentos provocados por potenciais explosões de crioviais após a remoção, que podem resultar na projeção de fragmentos afiados.

Garantia

Na Cytion, nós garantimos a qualidade e a viabilidade de nossos produtos.
Garantimos que nossas células serão viáveis no início da cultura por 60 dias após o envio de nossas instalações.
Asseguramos que todos os materiais estão em conformidade com as especificações descritas no Certificado de Análise e/ou Folha de Produto
Para mais informações, consulte a nossa <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default"">Declaração de Garantia

Aplicam-se os acordos com terceiros	Yes