U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133

300666

ALLMÄN INFORMATION

Beskrivning

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 är en genetiskt modifierad human osteosarkomcellinje som härstammar från den ursprungliga U2OS-bakgrunden, där den endogena NUP133-lokusen har modifierats med hjälp av CRISPR/Cas9-medierad genomredigering för att koda en C-terminal SNAPf-tagg. NUP133 är en kärnkomponent i Y-komplexet (NUP107-160-komplexet), ett strukturellt subkomplex som är viktigt för montering och underhåll av kärnporekomplexet (NPC). Genom att införa SNAPf-kodningssekvensen in-frame vid den endogena lokusen uttrycks fusionsproteinet under naturlig regulatorisk kontroll, vilket bevarar fysiologiska expressionsnivåer och subcellulär lokalisering. SNAPf-taggen är en snabbmärkningsvariant av SNAP-taggen, en konstruerad O6-alkylguanin-DNA-alkyltransferas som reagerar kovalent med bensylguaninkonjugerade substrat. Detta möjliggör högspecifik och mångsidig fluorescerande märkning av Nup133 i levande eller fixerade celler med hjälp av cellpermeabla eller impermeabla SNAP-substrat. I U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler lokaliseras fusionsproteinet till kärnmembranet i ett punktmönster som är karakteristiskt för kärnporekomplex. Eftersom märkningen sker vid den endogena lokusen störs NPC-stökiometrin och arkitekturen minimalt, vilket gör denna modell lämplig för kvantitativ superupplösningsmikroskopi, spårning av enskilda molekyler och kinetiska analyser av NPC-montering och omsättning.
Denna cellinje utgör en robust plattform för studier av kärntransport, nukleocytoplasmatisk transportdynamik, NPC-biogenes under interfase och postmitotisk kärnåteruppbyggnad samt strukturell organisation av Y-komplexet inom porstommen. U2OS-bakgrunden erbjuder platt morfologi och stora kärnor, vilket underlättar högupplöst avbildning. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler är särskilt väl lämpade för puls-chase-märkningsexperiment, korrelativ ljus- och elektronmikroskopi samt flerfärgsavbildningsmetoder i kombination med ytterligare endogent märkta nukleoporiner eller transportfaktorer.

Vävnad	Ben
Sjukdom	Osteosarkom
Metastaseringsställe	Primärtumörens lokalisation (ben)

Ansökningar

Biologi kring kärnporkomplexet (NPC); Nup133/Y-komplexets arkitektur; NPC-biogenes; nukleocytoplasmatisk transport; superupplösningsmikroskopi (STORM/PALM/STED); spårning av enskilda partiklar; puls-chase-SNAP-märkning; korrelativ ljus- och elektronmikroskopi; kvantitativ NPC-stökiometri

KLASSIFICERING

Organism	Människa
Kön	Kvinna
Tillväxtegenskaper	Följsam
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.

Biosäkerhetsnivå	1

EGENSKAPER

Morfologi	Epitelliknande

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

Celltyp	Epithelceller (osteosarkom)
Fördubblingstid	ca 24 till 36 timmar

IDENTIFIERARE

Källa

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

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

UTTRYCK OCH MOTTAGLIGHET

Proteinexpression

Nup133, SNAPf-tagg

HANTERING OCH ODLING

Odlingsmedium

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

Inkubationsatmosfär	37°C, 5%CO2, befuktad atmosfär.

Kosttillskott

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

Dissociationsmedel	Accutase

Vidareodling

Ta bort det gamla mediet från de adherenta cellerna och tvätta dem med PBS som saknar kalcium och magnesium. Använd 3-5 ml PBS för T25-kolvar och 5-10 ml för T75-kolvar. Täck sedan cellerna helt med Accutase, använd 1-2 ml för T25-kolvar och 2,5 ml för T75-kolvar. Låt cellerna inkubera i rumstemperatur i 8-10 minuter så att de lossnar. Efter inkubationen, blanda cellerna försiktigt med 10 ml medium för att resuspendera dem och centrifugera sedan vid 300xg i 3 minuter. Kassera supernatanten, resuspendera cellerna i färskt medium och överför dem till nya kolvar som redan innehåller färskt medium.

Uppdelningsförhållande	1 till 3
Såtäthet	1 till 3 × 10^4 celler/cm^2
Vätskeförnyelse	2 till 3 gånger per vecka

Upptining och odling

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 OCH KRYOKONSERVERING

Sterilitet

Mykoplasmakontaminering utesluts med hjälp av både PCR-baserade analyser och luminiscensbaserade metoder för mykoplasmadiagnostik. För att säkerställa att det inte finns någon kontaminering av bakterier, svamp eller jäst utsätts cellkulturerna för dagliga visuella inspektioner.

Frysmedel	Som kryokonserveringsmedium använder vi komplett tillväxtmedium (inklusive FBS) + 10% DMSO för adekvat viabilitet efter upptining, eller CM-1 (Cytion katalognummer 800100), som innehåller optimerade osmoprotektanter och metaboliska stabilisatorer för att förbättra återhämtningen och minska kryoinducerad stress.

Förvaringsförhållanden

För långtidsförvaring, placera flaskorna i flytande kväve i ångfas vid ca -150 till -196 °C. Förvaring vid -80 °C är acceptabelt endast som ett kort mellanliggande steg innan överföring till flytande kväve.

Leveransvillkor

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka -78 °C under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

DONATOR

Donatorns ålder	15 år
Etnicitet	Kaukasisk

JURIDISKA FRÅGOR OCH SÄKERHET

Säkerhetsföreskrifter

När man planerar att förvara en kryovial i flytande kväve för framtida upptining är det obligatoriskt att följa strikta säkerhetsåtgärder. Lämpliga skyddshandskar och skyddskläder är nödvändiga, och ansiktsmask eller skyddsglasögon måste användas vid överföring av frysta prover till eller från tanken med flytande kväve. Detta för att minska risken för skador på grund av eventuella explosioner i frysbehållaren vid borttagning, vilket kan leda till att vassa fragment projiceras.

Garanti

På Cytion står vi bakom våra produkters kvalitet och livskraft.
Vi garanterar att våra celler är livsdugliga vid odlingens början i 60 dagar efter leverans från våra anläggningar.
Vi försäkrar att allt material överensstämmer med de specifikationer som beskrivs i analyscertifikatet och/eller produktbladet
För fullständig information, se vår <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default"">Garantiförklaring

Avtal med tredje part gäller	Yes