U2OS-CRISPR-TPR-SNAP

300667

INFORMACJE OGÓLNE

Opis

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP to zmodyfikowana genetycznie linia komórek ludzkiego osteosarcoma pochodząca z komórek U2OS, w której endogenny gen TPR (Translocated Promoter Region) został zmodyfikowany przy użyciu technologii CRISPR/Cas9 w celu zakodowania znacznika SNAP w ramce odczytu. TPR jest dużym białkiem nukleoporinowym o strukturze spiralnej, które lokalizuje się w koszyku jądrowym po stronie nukleoplazmatycznej kompleksu porów jądrowych (NPC). Dzięki oznaczeniu TPR w jego endogenicznym locus, białko fuzyjne jest wyrażane pod natywną kontrolą regulacyjną, zachowując fizjologiczne poziomy ekspresji i utrzymując prawidłowe włączenie do struktury koszyka jądrowego.
Znacznik SNAP umożliwia kowalencyjne znakowanie TPR substratami fluorescencyjnymi sprzężonymi z benzyloguaniną w żywych lub utrwalonych komórkach, co pozwala na wysoce specyficzną i stabilną wizualizację. W komórkach U2OS-CRISPR-TPR-SNAP znakowany TPR wykazuje charakterystyczny punktowy rozkład w kształcie pierścienia na otoczce jądrowej, odpowiadający strukturom koszyka jądrowego związanego z NPC. System ten dobrze nadaje się do ilościowej mikroskopii fluorescencyjnej, obrazowania w superrozdzielczości, znakowania metodą pulse-chase oraz dynamicznych badań dotyczących montażu i obrotu koszyka jądrowego. Płaska morfologia i duże jądra komórek U2OS ułatwiają obrazowanie w wysokiej rozdzielczości struktur związanych z otoczką jądrową.
TPR odgrywa kluczową rolę w eksporcie mRNA, regulacji transportu jądrowego, organizacji chromatyny na obrzeżach jądra komórkowego oraz przestrzennej organizacji genomu. TPR bierze również udział w tworzeniu podkomórek związanych z transportem jądrowym oraz w wykluczaniu heterochromatyny z regionów związanych z porami jądrowymi. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP stanowi fizjologicznie istotny model do analizy architektury i dynamiki koszyka jądrowego, badania mechanizmów transportu jądrowo-cytoplazmatycznego oraz badania interakcji chromatyny związanych z otoczką jądrową w warunkach endogenicznej ekspresji.

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

Zastosowania

Biologia koszyka jądrowego; eksport mRNA za pośrednictwem białka TPR; regulacja transportu jądrowo-cytoplazmatycznego; organizacja chromatyny na obrzeżach jądra; podkompartmenty transportu jądrowego; przestrzenna organizacja genomu; mikroskopia superrozdzielcza; znakowanie metodą SNAP „pulse-chase”; wykluczenie heterochromatyny z obszarów związanych z porami

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-TPR-SNAP) contains a CRISPR-engineered TPR-SNAP fusion enabling fluorescent and chemical labeling of the TPR nuclear basket protein. The construct is stably integrated. This classification applies only within Germany and may differ elsewhere.

Poziom bezpieczeństwa biologicznego	1

CECHY CHARAKTERYSTYCZNE

Morfologia	Podobny do nabłonka

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

Typ komórki	Komórki nabłonkowe (osteosarcoma)
Czas podwojenia	ok. 24–36 godzin

IDENTYFIKATORY

Źródło

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (numer katalogowy Cytion 300667)

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

TPR, SNAP-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

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