Product sheet

Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Обща информация

Description	U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 е геномно редактирана човешка остеосаркомна клетъчна линия, получена от U2OS клетки, в които ендогенният ген SEH1L (SEH1) е модифициран с помощта на CRISPR/Cas9 технология, за да кодира SNAPf таг в рамката. SEH1 е компонент на Y-комплекса (известен също като NUP107-160 комплекс), основен структурен модул на ядрения порен комплекс (NPC), който допринася за сглобяването и стабилността на порестата скафолд. Чрез вмъкване на SNAPf кодиращата последователност в ендогенния локус, маркираният SEH1 протеин се експресира под естествен регулаторен контрол, запазвайки физиологичните нива на експресия и минимизирайки смущенията в състава на ядрените пори. SNAPf тагът е инженерно създаден, бързо реагиращ вариант на SNAP-тага, който ковалентно се свързва с бензилгуанин-конюгирани субстрати, позволявайки селективно и стабилно флуоресцентно маркиране в живи или фиксирани клетки. В U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 клетките, фузионният протеин се локализира в ядрената мембрана в характерна за NPC разпределение точкова форма. Тъй като маркирането се извършва на нива на ендогенни протеини, тази система е подходяща за количествена флуоресцентна микроскопия, изображения със суперразделителна способност и анализи за проследяване на единични частици, насочени към разлагане на организацията и стехиометрията на NPC. Плоската морфология и големите ядра на U2OS клетките допълнително улесняват визуализацията с висока разделителна способност на структурите на ядрената мембрана. SEH1 участва в биогенезата на NPC и също така е свързан с процесите, свързани с кинетохорите по време на митозата. Съответно, тази клетъчна линия предоставя стабилна платформа за изследване на зависимата от клетъчния цикъл сглобка и разглобка на NPC, пространствената организация на Y-комплекса в порестата структура и потенциалните двойни роли на SEH1 в ядрената мембрана и митотичните кинетохори. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 позволява механистични изследвания на архитектурата и динамиката на ядрените пори при физиологично релевантни условия на експресия.
Organism	Човек
Tissue	Bone
Disease	Остеосарком
Metastatic site	Локация на първичния тумор (кост)
Applications	Биология на Y-комплекса/комплекса NUP107-160; ролята на SEH1 в сглобяването на скелета на NPC; компоненти на NPC, свързани с кинетохора; стехиометрия на NPC; маркиране чрез SNAP „пулс-чейс“; микроскопия със свръхвисока разделителна способност; биогенеза на NPC; разграждане и повторно сглобяване на NPC по време на митоза

Характеристики

Age	15 години

Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Gender	Жена
Ethnicity	Кавказки
Morphology	Подобни на епител
Cell type	Епителни клетки (остеосаркома)
Growth properties	Придържащи се

Регулаторни данни

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (каталожен номер 300664 на Cytion)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Не е определено (дериват на U2OS, модифициран чрез CRISPR; родителски U2OS CVCL_0042)
Depositor	Лабораторията на Елънбърг (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Тази човешка клетъчна линия на остеосарком (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) съдържа CRISPR-медииран синтез SNAPf-SEH1, който позволява селективно маркиране на нуклеопорина SEH1. Модификацията е стабилна. Тази класификация се прилага само в Германия и може да се различава в други страни.

Биомолекулярни данни

Protein expression	SEH1, SNAPf-таг

Работа с

Culture Medium	McCoys 5a, w: 3,0 g/L глюкоза, w: стабилен глутамин, w: 2,0 mM натриев пируват, w: 2,2 g/L NaHCO3 (номер на статията в Cytion 820200a)
Supplements	Допълнете средата с 10% FBS, 3,0 g/L глюкоза, стабилен глутамин, 2,0 mM натриев пируват, 2,2 g/L NaHCO3, 1% NEAA

Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	приблизително 24 до 36 часа
Subculturing	Отстранете старата среда от адхезивните клетки и ги промийте с PBS, която не съдържа калций и магнезий. За колби T25 използвайте 3-5 ml PBS, а за колби T75 - 5-10 ml. След това покрийте клетките изцяло с Accutase, като използвате 1-2 ml за колби T25 и 2,5 ml за колби T75. Оставете клетките да се инкубират на стайна температура за 8-10 минути, за да се отделят. След инкубацията внимателно разбъркайте клетките с 10 ml среда, за да ги ресуспендирате, след което центрофугирайте при 300xg за 3 минути. Изхвърлете супернатантата, ресуспендирайте клетките в прясна среда и ги прехвърлете в нови колби, които вече съдържат прясна среда.
Split ratio	от 1 до 3
Seeding density	от 1 до 3 × 10^4 клетки/$см^2$
Fluid renewal	2 до 3 пъти седмично
Freeze medium	Като среда за криоконсервация използваме пълна среда за растеж (включително FBS) + 10% DMSO за адекватна жизнеспособност след размразяване или CM-1 (каталожен номер 800100 на Cytion), която включва оптимизирани осмопротектори и метаболитни стабилизатори за подобряване на възстановяването и намаляване на криоиндуцирания стрес.

Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Thawing and Culturing Cells

1. Уверете се, че флаконът остава дълбоко замразен при доставката, тъй като клетките се транспортират със сух лед, за да се поддържат оптимални температури по време на транспортирането.

2. При получаване или съхранявайте незабавно криовиолата при температури под -150 °C, за да осигурите запазване на клетъчната цялост, или преминете към стъпка 3, ако е необходимо незабавно култивиране.

3. За незабавно култивиране бързо размразете флакона, като го потопите във водна баня с чиста вода и антимикробен агент с температура 37 °C, като разбърквате внимателно в продължение на 40-60 секунди, докато остане малка ледена бучка.

4. Извършвайте всички следващи стъпки при стерилни условия в аспиратор, като преди отваряне дезинфекцирате криовиолата със 70% етанол.

5. Внимателно отворете дезинфекцирания флакон и прехвърлете клетъчната суспензия в 15 ml центрофужна епруветка, съдържаща 8 ml хранителна среда със стайна температура, като разбъркате внимателно.

6. Центрофугирайте сместа при 300 x g в продължение на 3 минути, за да отделите клетките, и внимателно изхвърлете супернатантата, съдържаща остатъчна замразяваща среда.

7. Внимателно ресуспендирайте клетъчната пелета в 10 ml прясна хранителна среда. За адхезивни клетки разделете суспензията между две колби T25; за суспензионни култури прехвърлете цялата среда в една колба T25, за да стимулирате ефективното взаимодействие и растеж на клетките.

8. Придържайте се към установените протоколи за субкултивиране за непрекъснат растеж и поддържане на клетъчната линия, като гарантирате надеждни експериментални резултати.

Incubation Atmosphere	37°C, 5%$_{CO2}$, овлажнена атмосфера.
Flask Coating	Няма
Freezing Procedure	Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78 °C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.

Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Shipping Conditions	Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78 °C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.
Storage Conditions	За дълготрайно съхранение поставете флаконите в течен азот в парна фаза при температура около -150 до -196 °C. Съхранението при -80 °C е приемливо само като кратък междинен етап преди прехвърлянето в течен азот.

Контрол на качеството и молекулярен анализ

Sterility	Замърсяването с микоплазма се изключва както чрез PCR-базирани анализи, така и чрез луминесцентни методи за откриване на микоплазма. За да се гарантира, че няма бактериално, гъбично или дрождево замърсяване, клетъчните култури се подлагат на ежедневни визуални проверки.