

**Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664****Obecné informace****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 je genomově upravená lidská osteosarkomová buněčná linie odvozená z buněk U2OS, ve které byl endogenní gen SEH1L (SEH1) modifikován pomocí technologie CRISPR/Cas9 tak, aby kódoval in-frame SNAPf tag. SEH1 je součástí Y-komplexu (známého také jako komplex NUP107-160), základního strukturálního modulu jaderného pórového komplexu (NPC), který přispívá k sestavení a stabilitě pórové kostry. Vložení kódující sekvence SNAPf do endogenního lokusu se značený protein SEH1 exprimuje pod nativní regulační kontrolou, čímž se zachovávají fyziologické úrovně exprese a minimalizují se poruchy složení jaderných pórů.

Značka SNAPf je uměle vytvořená, rychle reagující varianta značky SNAP, která se kovalentně váže na substráty konjugované s benzylguaninem, což umožňuje selektivní a stabilní fluorescenční značení v živých nebo fixovaných buňkách. V buňkách U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 se fúzní protein lokalizuje do jaderné membrány v bodovém vzoru charakteristickém pro distribuci NPC. Protože značení probíhá na úrovni endogenních proteinů, je tento systém vhodný pro kvantitativní fluorescenční mikroskopii, superrozlišovací zobrazování a analýzy sledování jednotlivých částic zaměřené na rozbor organizace a stechiometrie NPC. Plochá morfologie a velká jádra buněk U2OS dále usnadňují vysokorozlišovací vizualizaci struktur jaderné obálky.

SEH1 se podílí na biogenezi NPC a je také zapojen do procesů spojených s kinetochory během mitózy. Tato buněčná linie proto poskytuje robustní platformu pro zkoumání sestavování a rozebírání NPC závislého na buněčném cyklu, prostorové organizace Y-komplexu v rámci pórovitého lešení a potenciální dvojí role SEH1 v jaderné obálce a mitotických kinetochorech. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 umožňuje mechanistické studie architektury a dynamiky jaderných pórů za fyziologicky relevantních expresních podmínek.

**Organism**

Člověk

**Tissue**

Kost

**Disease**

Osteosarkom

**Metastatic site**

Místo primárního nádoru (kost)

**Applications**

Biologie komplexu Y/komplexu NUP107-160; role SEH1 při sestavování kostry NPC; složky NPC asociované s kinetochorem; stechiometrie NPC; značení metodou SNAP pulse-chase; mikroskopie se superrozlišením; biogeneze NPC; mitotická demontáž a opětovná montáž NPC

**Charakteristika****Age**

15 let

**Gender**

Ženy

**Ethnicity**

Kavkazský

**Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664****Morphology** Epitelu podobné**Cell type** Epitelové buňky (osteosarkom)**Growth properties** Adherentní**Regulační údaje****Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (katalogové číslo Cytion 300664)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Není přiřazeno (derivát U2OS modifikovaný pomocí CRISPR; rodičovská linie U2OS CVCL\_0042)**Depositor** Ellenbergova laboratoř (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Tato lidská buněčná linie osteosarkomu (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) obsahuje fúzi SNAPf-SEH1 zprostředkovanou CRISPR, která umožňuje selektivní značení nukleoporinu SEH1. Modifikace je stabilně přítomná. Tato klasifikace platí pouze v Německu a může se lišit v jiných zemích.**Biomolekulární data****Protein expression** SEH1, SNAPf-tag**Zpracování****Culture Medium** McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilní glutamin, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub> (číslo článku Cytion 820200a)**Supplements** Doplněte médium o 10% FBS, 3,0 g/l glukózy, stabilní glutamin, 2,0 mM pyruvát sodný, 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 1% NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** přibližně 24 až 36 hodin

## Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

**Subculturing** Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstředte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpustte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.

**Split ratio** 1 až 3

**Seeding density** 1 až  $3 \times 10^4$  buněk/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal** 2 až 3krát týdně

**Freeze medium** Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryem.

**Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664****Thawing and  
Culturing Cells**

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkumavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředujte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělte suspenzi mezi dvě kultivační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkultivační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

**Incubation  
Atmosphere**

37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , zvlhčená atmosféra.

**Flask Coating**

Žádný

**Freezing  
Procedure**

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

**Shipping  
Conditions**

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

## Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

### Storage Conditions

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

## Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

### Sterility

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuálním kontrolám.