

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 rakud | 300664**Üldine teave****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 on genoomi redigeeritud inimese osteosarkoomi rakuliin, mis on saadud U2OS rakkudest, milles endogeenne SEH1L (SEH1) geen on modifitseeritud CRISPR/Cas9 tehnoloogia abil, et kodeerida in-frame SNAPf märgistust. SEH1 on Y-kompleksi (tuntud ka kui NUP107-160 kompleks) komponent, tuumapooride kompleksi (NPC) keskne struktuurimoodul, mis aitab kaasa pooride raamistiku kokkupanekule ja stabiilsusele. SNAPf kodeeriva järjestuse sisestamisega endogeensesse lokusesse ekspresseeritakse märgistatud SEH1 valku loomuliku regulatiivse kontrolli all, säilitades füsioloogilised ekspressioonitasemed ja minimeerides tuumapooride koostise häireid.

SNAPf-märgis on SNAP-märgise insenereeritud, kiiresti reageeriv variant, mis seondub kovalentselt bentsüülguaniiniga konjugeeritud substraatidega, võimaldades selektiivset ja stabiilset fluorestsentsmärgistamist elusates või fikseeritud rakkudes. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 rakkudes lokaliseerub fusioonvalk tuumaümbrise punktide muustrina, mis on iseloomulik NPC jaotusele. Kuna märgistamine toimub endogeensete valkude tasemel, sobib see süsteem hästi kvantitatiivseks fluorestsentsmikroskoopiaks, ülikõrge resolutsiooniga pildistamiseks ja ühe osakese jälgimise analüüsidesse, mille eesmärk on NPC organisatsiooni ja stoikiomeetria analüüsimine. U2OS rakkude lame morfoloogia ja suured tuumad hõlbustavad veelgi tuumaümbrise struktuuride kõrge resolutsiooniga visualiseerimist.

SEH1 osaleb NPC biogeneesis ja on seotud ka mitotoiliste protsessidega, mis on seotud kinetokooridega. Seega pakub see rakuliin tugevat platvormi raku tsüklist sõltuva NPC kokkupaneku ja lahtivõtmise, Y-kompleksi ruumilise organiseerumise uurimiseks pooride raamistikus ning SEH1 potentsiaalse kahepoolse rolli uurimiseks tuumaümbrise ja mitotoiliste kinetokooride puhul. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 võimaldab uurida tuumapooride arhitektuuri ja dünaamikat füsioloogiliselt asjakohastes ekspressioonitingimustes.

Organism Inimene**Tissue** Bone**Disease** Osteosarkoom**Metastatic site** Esmane kasvaja asukoht (luu)**Applications** Y-kompleksi/NUP107-160 kompleksi bioloogia; SEH1 NPC raamistiku moodustumisel; kinetokooriga seotud NPC komponendid; NPC stoikiomeetria; SNAP-impulss-jälgimise märgistamine; ülireolutsiooniline mikroskoopia; NPC biogenees; mitotoiline NPC lagunemine ja taaskogunemine**Omadused****Age** 15 aastat**Gender** Naised**Ethnicity** Kaukaasia

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 rakud | 300664

Morphology Epiteelilaadsed

Cell type Epiteelrakud (osteosarkoom)

Growth properties Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytioni katalooginumbr 300664)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession Määramata (CRISPR-ga modifitseeritud U2OS-derivaat; algne U2OS CVCL_0042)

Depositor Ellenbergi labor (EMBL)

GMO Status GMO-S1: See inimese osteosarkoomi rakuliin (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) sisaldab CRISPR-vahendatud SNAPf-SEH1-fusiooni, mis võimaldab SEH1-nukleoporiini selektiivset märgistamist. Modifikatsioon on stabiilselt olemas. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

Biomolekulaarsed andmed

Protein expression SEH1, SNAPf-tag

Töötlemine

Culture Medium McCoy's 5a, w: 3,0 g/L glükoos, w: stabiilne glutamiin, w: 2,0 mM naatriumpüruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (Cytioni artikli number 820200a)

Supplements Täiendada söötme 10% FBS, 3,0 g/L glükoosi, stabiilse glutamiini, 2,0 mM naatriumpüruvaadi, 2,2 g/L NaHCO₃, 1% NEAAga

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time umbes 24–36 tundi

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 rakud | 300664

Subculturing Eemaldage kleepunud rakkudelt vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspendeerida, seejärel tsentrifuugige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.

Split ratio 1-3

Seeding density $1-3 \times 10^4$ rakku/cm²

Fluid renewal 2 kuni 3 korda nädalas

Freeze medium Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

Thawing and Culturing Cells

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla -150 °C, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage vial kiiresti, kastes selle 37 °C veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud vial ettevaatlikult ja viige raku suspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu 300 x g juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 rakud | 300664

Incubation Atmosphere 37°C, 5% CO₂, niisutatud atmosfäär.

Flask Coating Puudub

Freezing Procedure Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78 °C. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige viaalid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

Shipping Conditions Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78 °C. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige viaalid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

Storage Conditions Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA

Sterility Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminescentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.