

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

## Yleisiä tietoja

## Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 on genomin muokattu ihmisen osteosarkoomasolulinja, joka on peräisin U2OS-soluista, joissa endogeeninen SEH1L (SEH1) -geeni on muokattu CRISPR/Cas9-tekniikalla koodaamaan in-frame SNAPf-tunniste. SEH1 on osa Y-kompleksia (tunnetaan myös nimellä NUP107-160-kompleksi), joka on ydinporokompleksin (NPC) ydinrakenteellinen moduuli, joka edistää porojen tukirakenteen kokoamista ja vakautta. Lisäämällä SNAPf-koodaussekvenssin endogeeniseen lokukseen, merkitty SEH1-proteiini ilmaistään natiivin säätelyn alaisena, säilyttäen fysiologiset ilmentymistasot ja minimoiden häiriöt ydinporojen koostumuksessa.

SNAPf-tag on muokattu, nopeasti reagoiva SNAP-tagin variantti, joka sitoutuu kovalenttisesti bentsyyliguaninikonjugoitujen substraattien kanssa, mikä mahdollistaa selektiivisen ja stabiilin fluoresoivan leimauksen elävissä tai kiinnitetyissä soluissa. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-soluissa fuusioproteiini lokalisoituu ydinvaipaan NPC:n jakautumiselle tyypillisessä pistekuvioisessa rakenteessa. Koska merkintä tapahtuu endogeenisten proteiinitasojen tasolla, tämä järjestelmä sopii hyvin kvantitatiiviseen fluoresenssimikroskopiaan, superresoluutioiseen kuvantamiseen ja yksittäisten hiukkasten seuranta-analyysiin, joiden tarkoituksena on analysoida NPC:n organisaatio ja stoikiometria. U2OS-solujen tasainen morfologia ja suuret tumat helpottavat entisestään ytimen kuoren rakenteiden korkean resoluution visualisointia.

SEH1 osallistuu NPC:n biogeneesiin ja on myös ollut mukana mitoosissa tapahtuvissa kinetokoorin prosesseissa. Näin ollen tämä solulinja tarjoaa vankan alustan solusyklistä riippuvaisen NPC:n kokoamisen ja purkamisen, Y-kompleksin spatiaalisen organisaation huokosrakenteessa sekä SEH1:n mahdollisten kaksoisroolien tutkimiseen ydinkotelossa ja mitoosikinetokoorissa. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 mahdollistaa ydinporojen arkkitehtuurin ja dynamiikan mekanistisen tutkimuksen fysiologisesti merkityksellisissä ilmentymisolosuhteissa.

**Organism** Ihminen

**Tissue** Luu

**Disease** Osteosarkooma

## Ominaisuudet

**Age** 15 vuotta

**Gender** Nainen

**Ethnicity** Kaukasialainen

**Morphology** Epiteelin kaltainen

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

**Growth properties** Tarttuva

## Säätelytiedot

**Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytionin luettelonumero 300664)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**Depositor** Ellenbergin laboratorio (EMBL)

**GMO Status** GMO-S1: Tämä ihmisen osteosarkoomasolulinja (U2OS-CRISPR-CRISPR-SNAPf-SEH1) sisältää CRISPR-välitteisen SNAPf-SEH1-fusion, joka mahdollistaa SEH1-nukleoporiinin selektiivisen merkitsemisen. Modifikaatio on stabiilisti läsnä. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

## Biomolekyyli tiedot

**Protein expression** SEH1, SNAPf-tag

## Käsittely

**Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukoosia, w: vakaa glutamiini, w: 2,0 mM natriumpyruvaattia, w: 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub> (Cytionin artikkelinumero 820200a)

**Supplements** Täydennetään elatusainetta 10 % FBS:llä, 3,0 g/l glukoosilla, stabiililla glutamiinilla, 2,0 mM natriumpyruvaatilla, 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>:lla, 1 % NEAA:lla

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreessa väliaineessa ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

**U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-solut | 300664****Freeze medium**

Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotectantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

**Thawing and Culturing Cells**

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetytynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäässä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanotettaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja antimikrobista ainetta, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisellä etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvia, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

**Incubation Atmosphere**

37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , kostutettu ilmakehä.

**Flask Coating**

Ei mitään

**Freezing Procedure**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäässä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

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

### Shipping Conditions

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäissä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

### Storage Conditions

Pitkäaikaisäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

## Laadunvalvonta / Geneettinen profiili / HLA

### Sterility

Mykoplasma- ja kontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrityksillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.