

Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Informations générales

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 est une lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome génétiquement modifiée dérivée de cellules U2OS dans lesquelles le gène endogène SEH1L (SEH1) a été modifié à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 afin de coder un marqueur SNAPf dans le cadre de lecture. SEH1 est un composant du complexe Y (également connu sous le nom de complexe NUP107-160), un module structural central du complexe des pores nucléaires (NPC) qui contribue à l'assemblage et à la stabilité de la structure des pores. En insérant la séquence codante SNAPf au locus endogène, la protéine SEH1 marquée est exprimée sous contrôle régulateur natif, ce qui préserve les niveaux d'expression physiologiques et minimise les perturbations de la composition des pores nucléaires.

Le marqueur SNAPf est une variante modifiée et à réaction rapide du marqueur SNAP qui se lie de manière covalente aux substrats conjugués à la benzylguanine, permettant un marquage fluorescent sélectif et stable dans les cellules vivantes ou fixées. Dans les cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1, la protéine de fusion se localise dans l'enveloppe nucléaire selon un motif ponctuel caractéristique de la distribution du NPC. Comme le marquage se produit au niveau des protéines endogènes, ce système est bien adapté à la microscopie à fluorescence quantitative, à l'imagerie à super-résolution et aux analyses de suivi de particules individuelles visant à disséquer l'organisation et la stœchiométrie des NPC. La morphologie plate et les grands noyaux des cellules U2OS facilitent encore davantage la visualisation haute résolution des structures de l'enveloppe nucléaire.

SEH1 participe à la biogenèse des NPC et a également été impliqué dans les processus associés aux kinétochores pendant la mitose. En conséquence, cette lignée cellulaire constitue une plateforme robuste pour étudier l'assemblage et le désassemblage des NPC en fonction du cycle cellulaire, l'organisation spatiale du complexe Y au sein de la structure poreuse et les doubles rôles potentiels de SEH1 au niveau de l'enveloppe nucléaire et des kinétochores mitotiques. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 permet des études mécanistiques de l'architecture et de la dynamique des pores nucléaires dans des conditions d'expression physiologiquement pertinentes.

Organism Humain

Tissue Os

Disease Ostéosarcome

Caractéristiques

Age 15 ans

Gender Femme

Ethnicity Caucasien

Morphology De type épithélial

Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Growth properties Adhérent

Données réglementaires

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (numéro de catalogue Cytion 300664)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Le laboratoire Ellenberg (EMBL)

GMO Status OGM-S1 : Cette lignée cellulaire d'ostéosarcome humain (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) contient une fusion SNAPf-SEH1 médiée par CRISPR qui permet le marquage sélectif de la nucléopore SEH1. La modification est présente de manière stable. Cette classification ne s'applique qu'à l'Allemagne et peut différer dans d'autres pays.

Données biomoléculaires

Protein expression SEH1, SNAPf-tag

Manipulation

Culture Medium McCoys 5a, w : 3.0 g/L Glucose, w : Glutamine stable, w : 2.0 mM Pyruvate de sodium, w : 2.2 g/L NaHCO₃ (numéro d'article Cytion 820200a)

Supplements Compléter le milieu avec 10 % de FBS, 3,0 g/L de glucose, de la glutamine stable, 2,0 mM de pyruvate de sodium, 2,2 g/L de NaHCO₃, 1 % de NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Retirer l'ancien milieu des cellules adhérentes et les laver avec du PBS dépourvu de calcium et de magnésium. Pour les flacons T25, utiliser 3-5 ml de PBS, et pour les flacons T75, 5-10 ml. Ensuite, recouvrir complètement les cellules avec Accutase, en utilisant 1 à 2 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75. Laisser les cellules incuber à température ambiante pendant 8-10 minutes pour les détacher. Après incubation, mélanger délicatement les cellules avec 10 ml de milieu pour les remettre en suspension, puis centrifuger à 300xg pendant 3 minutes. Jeter le surnageant, remettre les cellules en suspension dans du milieu frais et les transférer dans de nouveaux flacons contenant déjà du milieu frais.

Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Freeze medium

Comme milieu de cryoconservation, nous utilisons un milieu de croissance complet (comprenant du FBS) + 10 % de DMSO pour une viabilité adéquate après décongélation, ou CM-1 (numéro de catalogue 800100 de Cytion), qui comprend des osmoprotectants et des stabilisateurs métaboliques optimisés pour améliorer la récupération et réduire le stress induit par la cryogénéisation.

Thawing and Culturing Cells

1. Confirmer que le flacon est toujours congelé à la livraison, car les cellules sont expédiées sur de la glace sèche pour maintenir des températures optimales pendant le transport.
2. Dès réception, soit conserver immédiatement le cryovial à des températures inférieures à -150°C pour assurer la préservation de l'intégrité cellulaire, soit passer à l'étape 3 si une mise en culture immédiate est nécessaire.
3. Pour une mise en culture immédiate, décongeler rapidement le flacon en l'immergeant dans un bain-marie à 37°C avec de l'eau propre et un agent antimicrobien, en l'agitant doucement pendant 40 à 60 secondes jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un petit amas de glace.
4. Effectuer toutes les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux, en désinfectant le cryovial avec de l'éthanol à 70 % avant de l'ouvrir.
5. Ouvrir soigneusement le flacon désinfecté et transférer la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger de 15 ml contenant 8 ml de milieu de culture à température ambiante, en mélangeant doucement.
6. Centrifuger le mélange à 300 x g pendant 3 minutes pour séparer les cellules et jeter soigneusement le surnageant contenant le milieu de congélation résiduel.
7. Remettre doucement en suspension le culot cellulaire dans 10 ml de milieu de culture frais. Pour les cellules adhérentes, répartir la suspension entre deux flacons de culture T25 ; pour les cultures en suspension, transférer tout le milieu dans un seul flacon T25 afin de favoriser une interaction et une croissance efficaces des cellules.
8. Respecter les protocoles de sous-culture établis pour une croissance et un entretien continus de la lignée cellulaire, garantissant ainsi des résultats expérimentaux fiables.

Incubation Atmosphere

37°C, 5%_{CO2}, atmosphère humidifiée.

Flask Coating

Aucun

Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Freezing Procedure

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Shipping Conditions

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Storage Conditions

Pour une conservation à long terme, placer les flacons dans de l'azote liquide en phase vapeur à une température comprise entre -150 et -196 °C environ. Le stockage à -80 °C n'est acceptable qu'en tant qu'étape intermédiaire de courte durée avant le transfert dans l'azote liquide.

Contrôle de qualité / Profil génétique / HLA

Sterility

La contamination par les mycoplasmes est exclue à l'aide de tests basés sur la PCR et de méthodes de détection des mycoplasmes basées sur la luminescence.

Pour s'assurer de l'absence de contamination bactérienne, fongique ou levurienne, les cultures cellulaires font l'objet d'inspections visuelles quotidiennes.