

Cellule U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Informazioni generali****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 è una linea cellulare di osteosarcoma umano modificata genomicamente derivata dalle cellule U2OS in cui il gene endogeno SEH1L (SEH1) è stato modificato utilizzando la tecnologia CRISPR/Cas9 per codificare un tag SNAPf in-frame. SEH1 è un componente del complesso Y (noto anche come complesso NUP107-160), un modulo strutturale centrale del complesso dei pori nucleari (NPC) che contribuisce all'assemblaggio e alla stabilità dell'impalcatura dei pori. Inserendo la sequenza codificante SNAPf nel locus endogeno, la proteina SEH1 marcata viene espressa sotto il controllo regolatorio nativo, preservando i livelli di espressione fisiologica e riducendo al minimo le perturbazioni della composizione dei pori nucleari.

Il tag SNAPf è una variante ingegnerizzata e a reazione rapida del tag SNAP che si lega in modo covalente ai substrati coniugati con benzilguanina, consentendo una marcatura fluorescente selettiva e stabile in cellule vive o fissate. Nelle cellule U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1, la proteina di fusione si localizza nell'involucro nucleare con un pattern puntiforme caratteristico della distribuzione dell'NPC. Poiché l'etichettatura avviene a livelli proteici endogeni, questo sistema è particolarmente adatto per la microscopia a fluorescenza quantitativa, l'imaging a super risoluzione e le analisi di tracciamento di singole particelle volte a sezionare l'organizzazione e la stechiometria degli NPC. La morfologia piatta e i nuclei grandi delle cellule U2OS facilitano ulteriormente la visualizzazione ad alta risoluzione delle strutture dell'involucro nucleare.

SEH1 partecipa alla biogenesi NPC ed è stato anche implicato nei processi associati al cinetocoro durante la mitosi. Di conseguenza, questa linea cellulare fornisce una solida piattaforma per lo studio dell'assemblaggio e del disassemblaggio NPC dipendente dal ciclo cellulare, dell'organizzazione spaziale del complesso Y all'interno dello scaffold poroso e dei potenziali ruoli duali di SEH1 nell'involucro nucleare e nei cinetocori mitotici. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 consente studi meccanicistici dell'architettura e della dinamica dei pori nucleari in condizioni di espressione fisiologicamente rilevanti.

Organism Umano**Tissue** Osso**Disease** Osteosarcoma**Caratteristiche****Age** 15 anni**Gender** Donna**Ethnicity** Caucasico**Morphology** Simile all'epitelio**Growth properties** Aderente

Cellule U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Dati normativi**

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (numero di catalogo Cytion 300664)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Il laboratorio Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: questa linea cellulare di osteosarcoma umano (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) contiene una fusione SNAPf-SEH1 mediata da CRISPR che consente l'etichettatura selettiva della nucleoporina SEH1. La modifica è presente in modo stabile. Questa classificazione si applica solo in Germania e può differire altrove.

Dati biomolecolari

Protein expression	SEH1, tag SNAPf
---------------------------	-----------------

Manipolazione

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glucosio, w: Glutamina stabile, w: 2,0 mM Sodio piruvato, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (articolo Cytion numero 820200a)
Supplements	Integrare il terreno di coltura con 10% FBS, 3,0 g/L di glucosio, Glutamina stabile, 2,0 mM di piruvato di sodio, 2,2 g/L di NaHCO ₃ , 1% di NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Rimuovere il vecchio terreno dalle cellule aderenti e lavarle con PBS privo di calcio e magnesio. Per le fiasche T25, utilizzare 3-5 ml di PBS e per le fiasche T75, 5-10 ml. Quindi, coprire completamente le cellule con Accutase, utilizzando 1-2 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75. Lasciare incubare le cellule a temperatura ambiente per 8-10 minuti per staccarle. Dopo l'incubazione, mescolare delicatamente le cellule con 10 ml di terreno per risospenderle, quindi centrifugare a 300xg per 3 minuti. Scartare il surnatante, risospendere le cellule in terreno fresco e trasferirle in nuove fiasche contenenti terreno fresco.
Freeze medium	Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo (incluso FBS) + 10% DMSO per un'adeguata vitalità post-scongelo, o CM-1 (numero di catalogo Cytion 800100), che include osmoprotettori e stabilizzatori metabolici ottimizzati per migliorare il recupero e ridurre lo stress crio-indotto.

Cellule U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Thawing and Culturing Cells

1. Verificare che la fiala rimanga profondamente congelata al momento della consegna, poiché le cellule vengono spedite con ghiaccio secco per mantenere le temperature ottimali durante il trasporto.
2. Al ricevimento, conservare immediatamente la criovial a temperature inferiori a -150°C per garantire la conservazione dell'integrità cellulare, oppure procedere al punto 3 se è necessaria una coltura immediata.
3. Per la coltura immediata, scongelare rapidamente la fiala immergendola in un bagno d'acqua a 37°C con acqua pulita e un agente antimicrobico, agitando delicatamente per 40-60 secondi finché non rimane un piccolo grumo di ghiaccio.
4. Eseguire tutte le fasi successive in condizioni di sterilità in una cappa a flusso, disinfettando la criovial con etanolo al 70% prima dell'apertura.
5. Aprire con cautela la fiala disinfettata e trasferire la sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente 8 ml di terreno di coltura a temperatura ambiente, mescolando delicatamente.
6. Centrifugare la miscela a 300 x g per 3 minuti per separare le cellule e scartare con cura il surnatante contenente il terreno di coltura residuo.
7. Risospendere delicatamente il pellet cellulare in 10 ml di terreno di coltura fresco. Per le cellule aderenti, dividere la sospensione tra due fiasche di coltura T25; per le colture in sospensione, trasferire tutto il terreno in una fiasca T25 per promuovere l'interazione e la crescita delle cellule.
8. Attenersi ai protocolli di subcoltura stabiliti per la crescita e il mantenimento continui della linea cellulare, garantendo risultati sperimentali affidabili.

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO₂, atmosfera umidificata.

Flask Coating

Nessuno

Freezing Procedure

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Shipping Conditions

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Cellule U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Storage Conditions

Per la conservazione a lungo termine, porre le fiale in azoto liquido in fase vapore a una temperatura compresa tra -150 e -196 °C circa. La conservazione a -80 °C è accettabile solo come breve fase intermedia prima del trasferimento in azoto liquido.

Controllo di qualità / Profilo genetico / HLA

Sterility

La contaminazione da micoplasma viene esclusa utilizzando sia saggi basati sulla PCR sia metodi di rilevamento del micoplasma basati sulla luminescenza.

Per garantire l'assenza di contaminazione batterica, fungina o da lieviti, le colture cellulari sono sottoposte a ispezioni visive quotidiane.