

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

## Bendra informacija

## Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 yra genomo redaguota žmogaus osteosarkomos ląstelių linija, gauta iš U2OS ląstelių, kuriose endogeninis SEH1L (SEH1) genas buvo modifikuotas naudojant CRISPR/Cas9 technologiją, kad koduotų in-frame SNAPf žymę. SEH1 yra Y komplekso (taip pat žinomo kaip NUP107-160 kompleksas) komponentas, branduolinio porų komplekso (NPC) pagrindinis struktūrinis modulis, kuris prisideda prie porų karkaso surinkimo ir stabilumo. Įterpiant SNAPf kodavimo seką į endogeninį lokusą, žymėtas SEH1 baltymas yra ekspresuojamas pagal natūralų reguliavimo kontrolę, išlaikant fiziologinius ekspresijos lygius ir sumažinant branduolinio porų sudėties sutrikimus.

SNAPf žymė yra inžinerinis, greitai reaguojantis SNAP žymės variantas, kuris kovalentiškai jungiasi su benzilguaninu konjuguotais substratais, leidžiantis selektyvų ir stabilų fluorescencinį žymėjimą gyvoje arba fiksuotose ląstelėse. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 ląstelėse jungtinis baltymas lokalizuojasi branduolinėje apvalkale, būdingame NPC pasiskirstymui. Kadangi žymėjimas vyksta endogeninių baltymų lygiu, ši sistema puikiai tinka kiekybinei fluorescencinei mikroskopijai, super-rezoliucijos vaizdams ir vienos dalelės sekimo analizėms, kurių tikslas yra išanalizuoti NPC organizavimą ir stochiometriją. Plokščia morfologija ir dideli U2OS ląstelių branduoliai dar labiau palengvina branduolinės apvalkalo struktūrų vizualizavimą aukšta rezoliucija.

SEH1 dalyvauja NPC biogenezėje ir taip pat yra susijęs su kinetochorais susijusiais procesais mitozės metu. Atitinkamai, ši ląstelių linija suteikia tvirtą platformą ląstelių ciklo priklausomo NPC surinkimo ir išardymo, Y-komplekso erdvinės organizacijos porų karkase ir potencialių SEH1 dvigubų vaidmenų branduolinėje apvalkale ir mitoziniuose kinetochoruose tyrimams. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 leidžia atlikti mechanistinius branduolinės poros architektūros ir dinamikos tyrimus fiziologiškai reikšmingomis ekspresijos sąlygomis.

**Organism** Žmogus

**Tissue** Kaulas

**Disease** Osteosarkoma

**Metastatic site** Pirminio naviko lokalizacija (kaulai)

**Applications** Y-komplekso / NUP107-160 komplekso biologija; SEH1 vaidmuo NPC karkaso formavimosi procese; su kinetochoru susiję NPC komponentai; NPC stochiometrija; SNAP „pulse-chase“ žymėjimas; superrezoliucijos mikroskopija; NPC biogenezė; mitozinis NPC išardymas ir pakartotinis surinkimas

## Charakteristikos

**Age** 15 metų

**Gender** Moteris

**Ethnicity** Kaukazičių

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

**Morphology** | epitelį panašus

**Cell type** Epitelio ląstelės (osteosarkoma)

**Growth properties** Prigludęs

## Reguliavimo duomenys

**Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytion katalogo numeris 300664)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**CellosaurusAccession** Nepaskirtas (CRISPR modifikuotas U2OS darinys; pirminis U2OS CVCL\_0042)

**Depositor** Ellenbergo laboratorija (EMBL)

**GMO Status** GMO-S1: šioje žmogaus osteosarkomos ląstelių linijoje (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) yra CRISPR tarpininkaujama SNAPf-SEH1 sintezė, leidžianti selektyviai žymėti SEH1 nukleoporiną. Modifikacija yra stabili. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir gali skirtis kitose šalyse.

## Biomolekuliniai duomenys

**Protein expression** SEH1, SNAPf žymuo

## Tvarkymas

**Culture Medium** McCoy's 5a, w: 3,0 g/l gliukozės, w: stabilus glutaminas, w: 2,0 mM natrio piruvatas, w: 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub> (Cytion gaminio numeris 820200a)

**Supplements** Papildykite terpę 10 % FBS, 3,0 g/l gliukozės, stabilium glutaminu, 2,0 mM natrio piruvato, 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 1 % NEAA

**Dissociation Reagent** Accutase

**Doubling time** maždaug nuo 24 iki 36 valandų

**U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 ląstelės | 300664**

**Subculturing** Pašalinkite seną terpę nuo prilipusių ląstelių ir nuplaukite jas PBS, kuriame nėra kalcio ir magnio. T25 kolboms naudokite 3-5 ml PBS, o T75 kolboms - 5-10 ml. Tuomet visiškai užpilkite ląsteles "Accutase", naudodami 1-2 ml T25 kolboms ir 2,5 ml T75 kolboms. Leiskite ląstelėms inkubuotis kambario temperatūroje 8-10 minučių, kad jos atsiskirtų. Po inkubacijos atsargiai sumaišykite ląsteles su 10 ml terpės, kad jos vėl suspenduotų, tada 3 minutes centrifuguokite 300xg greičiu. Išmeskite supernatantą, vėl sutirpinkite ląsteles šviežioje terpėje ir perkelkite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.

**Split ratio** 1-3

**Seeding density** nuo 1 iki  $3 \times 10^4$  ląstelių/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal** 2-3 kartus per savaitę

**Freeze medium** Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę (įskaitant FBS) + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo, arba CM-1 (Cytion katalogo numeris 800100), kurioje yra optimizuotų osmoprotektorių ir medžiagų apykaitos stabilizatorių, kad būtų pagerintas atsigavimas ir sumažintas kriokonservavimo sukeltas stresas.

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

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei  $-150^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į  $37^{\circ}\text{C}$  temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 300 x g greičiu 3 minutes, kad atsiskirtų ląstelės, ir atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpės likučiais.
7. Švelniai resuspenduokite ląstelių granules 10 ml šviežios mitybinės terpės. Jei ląstelės yra prigludusios, suspensiją padalykite į dvi T25 kolbas; jei tai suspensinės kultūros, visą terpę perkelti į vieną T25 kolbą, kad paskatintumėte veiksmingą ląstelių sąveiką ir augimą.
8. Laikykitės nustatytų subkultūrų protokolų, kad ląstelių linija nuolat augtų ir būtų palaikoma, taip užtikrinant patikimus eksperimentų rezultatus.

**Incubation  
Atmosphere**

$37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , drėkintoje atmosferoje.

**Flask Coating**

Nėra

**Freezing  
Procedure**

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug  $-78^{\circ}\text{C}$  temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

**Shipping  
Conditions**

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug  $-78^{\circ}\text{C}$  temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

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

### Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug -150-196 °C temperatūroje. Laikymas -80 °C temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeliant į skystą azotą.

## Kokybės kontrolė / Genetinis profilis / HLA

### Sterility

Mikoplazmos užterštumas atmetamas taikant PGR pagrįstus tyrimus ir liuminescencinius mikoplazmos aptikimo metodus.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų užteršimo bakterijomis, grybeliais ar mielėmis, ląstelių kultūros kasdien vizualiai tikrinamos.