

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

## Vispārīga informācija

## Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 ir genomā rediģēta cilvēka osteosarkomas šūnu līnija, kas iegūta no U2OS šūnām, kurās endogēnais SEH1L (SEH1) gēns ir modificēts, izmantojot CRISPR/Cas9 tehnoloģiju, lai kodētu in-frame SNAPf tagu. SEH1 ir Y-kompleksa (pazīstams arī kā NUP107-160 komplekss) komponents, kas ir kodola poru kompleksa (NPC) galvenais strukturālais modulis, kas veicina poru skeleta montāžu un stabilitāti. Ievietojot SNAPf kodējošo sekvenci endogēnajā lokusā, marķētā SEH1 proteīna ekspresija notiek saskaņā ar dabisko regulējošo kontroli, saglabājot fizioloģiskos ekspresijas līmeņus un minimizējot traucējumus kodola poru sastāvā.

SNAPf marķieris ir inženierijas izstrādāts, ātri reaģējošs SNAP marķiera variants, kas kovalenti saistās ar benzilguanīna konjugātiem substrātiem, ļaujot selektīvi un stabili marķēt dzīvas vai fiksētas šūnas ar fluorescences marķieri. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 šūnās fūzijas proteīns lokalizējas kodola apvalkā punktveida modelī, kas ir raksturīgs NPC izplatībai. Tā kā marķēšana notiek endogēno proteīnu līmenī, šī sistēma ir labi piemērota kvantitatīvai fluorescences mikroskopijai, superizšķirtspējas attēlveidošanai un vienu daļiņu izsekošanas analīzēm, kuru mērķis ir izpētīt NPC organizāciju un stehiometriju. U2OS šūnu plakana morfoloģija un lielie kodoli vēl vairāk atvieglo kodola apvalka struktūru vizualizāciju augstā izšķirtspējā.

SEH1 piedalās NPC biogēnēzē un ir iesaistīts arī kinetohoru saistītajos procesos mitozes laikā. Tādējādi šī šūnu līnija nodrošina stabilu platformu, lai pētītu šūnu cikla atkarīgo NPC montāžu un demontāžu, Y kompleksa telpisko organizāciju poru skeleta ietvaros un SEH1 potenciālo dubulto lomu kodola apvalkā un mitotiskajos kinetohoros. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 ļauj veikt mehāniskos pētījumus par kodola poru arhitektūru un dinamiku fizioloģiski atbilstošos ekspresijas apstākļos.

<b>Organism</b>	Cilvēks
<b>Tissue</b>	Bone
<b>Disease</b>	Osteosarkoma

## Raksturojums

<b>Age</b>	15 gadi
<b>Gender</b>	Sievietes
<b>Ethnicity</b>	Kaukāzietis
<b>Morphology</b>	Epitēlijveidīgs
<b>Growth properties</b>	Adherent

## Normatīvie dati

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

<b>Citation</b>	U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytion kataloga numurs 300664)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>Depositor</b>	Ellenberga laboratorija (EMBL)
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: Šī cilvēka osteosarkomas šūnu līnija (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) satur CRISPR mediētu SNAPf-SEH1 saplūšanu, kas nodrošina SEH1 nukleopora selektīvu marķēšanu. Šī modifikācija ir stabila. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un var atšķirties citur.

## Biomolekulārie dati

<b>Protein expression</b>	SEH1, SNAPf-tag
---------------------------	-----------------

## Darbs ar

<b>Culture Medium</b>	McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glikoze, w: stabils glutamīns, w: 2,0 mM nātrija piruvāts, w: 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> (Cytion izstrādājuma numurs 820200a)
<b>Supplements</b>	Papildināt barotni ar 10% FBS, 3,0 g/l glikozes, stabilu glutamīnu, 2,0 mM nātrija piruvāta, 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 1% NEAA
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Subculturing</b>	Noņem veco barotni no pielipušajām šūnām un mazgāt tās ar PBS, kurā nav kalcija un magnija. T25 kolbām izmantojiet 3-5 ml PBS, bet T75 kolbām - 5-10 ml. Pēc tam pilnībā pārklājiet šūnas ar Accutase, izmantojot 1-2 ml T25 kolbām un 2,5 ml T75 kolbām. Ļaujiet šūnām inkubēties istabas temperatūrā 8-10 minūtes, lai tās atdalītos. Pēc inkubācijas uzmanīgi samaisiet šūnas ar 10 ml barotnes, lai tās atkārtoti suspendētu, pēc tam centrifugējiet 3 minūtes ar 300xg. Izmetiet supernatantu, atkārtoti suspendējiet šūnas svaigā barotnē un pārvietojiet tās jaunās kolbās, kurās jau ir svaiga barotne.
<b>Freeze medium</b>	Kā kriokonservēšanas barotni mēs izmantojam pilnvērtīgu augšanas barotni (ieskaitot FBS) + 10 % DMSO, lai nodrošinātu pietiekamu dzīvotspēju pēc atkausēšanas, vai CM-1 (Cytion kataloga numurs 800100), kas ietver optimizētus osmoprotektorus un metaboliskos stabilizatorus, lai uzlabotu atveseļošanu un samazinātu krioinducēto stresu.

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

1. Pārliecinieties, ka pēc piegādes flakons paliek dziļi sasaldēts, jo šūnas tiek sūtītas uz sausā ledus, lai pārvadāšanas laikā saglabātu optimālu temperatūru.
2. Pēc saņemšanas vai nu nekavējoties uzglabāt kriovialu temperatūrā, kas zemāka par -150 °C, lai nodrošinātu šūnu integritātes saglabāšanu, vai arī turpināt 3. posmu, ja nepieciešama tūlītēja kultivēšana.
3. Tūlītējas kultivēšanas gadījumā ātri atkausējiet flakonu, iegremdējot to 37°C ūdens vannā ar tīru ūdeni un antibakteriālu līdzekli, viegli maisot 40-60 sekundes, līdz paliek neliels ledus gabaliņš.
4. Visas turpmākās darbības veiciet sterilos apstākļos plūsmas nosūcējā, pirms atvēršanas dezinficējot kriovialu ar 70% etanolu.
5. Uzmanīgi atveriet dezinficēto flakonu un pārnesiet šūnu suspensiju 15 ml centrifūgas mēģenē, kurā ir 8 ml istabas temperatūras barotnes, uzmanīgi samaisot.
6. Centrifugējiet maisījumu ar 300 x g 3 minūtes, lai atdalītu šūnas, un uzmanīgi izmetiet virskārtu, kas satur saldēšanas barotnes atlikumus.
7. Viegli resuspendēt šūnu granulas 10 ml svaigas barotnes. Adhēzijas šūnu gadījumā suspensiju sadalīt divās T25 kolbās; suspensijas kultūrām visu barotni pārnest vienā T25 kolbā, lai veicinātu efektīvu šūnu mijiedarbību un augšanu.
8. Ievērojiet noteiktos subkultūru protokolus, lai nodrošinātu nepārtrauktu šūnu līnijas augšanu un uzturēšanu, tādējādi nodrošinot uzticamus eksperimentu rezultātus.

**Incubation  
Atmosphere**

37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , mitrināta atmosfēra.

**Flask Coating**

Neviens

**Freezing  
Procedure**

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

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

### Shipping Conditions

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

### Storage Conditions

Ilgstošai uzglabāšanai flakonus ievietojiet šķidrā slāpekļī ar tvaika fāzi aptuveni -150 līdz -196 °C temperatūrā. Uzglabāšana -80 °C temperatūrā ir pieļaujama tikai kā īss starposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

## Kvalitātes kontrole / Ģenētiskais profils / HLA

### Sterility

Mikoplazmas piesārņojums tiek izslēgts, izmantojot gan uz PCR balstītus testus, gan uz luminiscenci balstītas mikoplazmas noteikšanas metodes.

Lai pārlicinātos, ka nav baktēriju, sēnīšu vai rauga piesārņojuma, šūnu kultūras katru dienu vizuāli pārbauda.