

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664**Generell informasjon****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 er en genomredigert human osteosarkomcellelinje avledet fra U2OS-celler, hvor det endogene SEH1L (SEH1)-genet er modifisert ved hjelp av CRISPR/Cas9-teknologi for å kode for en in-frame SNAPf-tag. SEH1 er en komponent i Y-komplekset (også kjent som NUP107-160-komplekset), en sentral strukturell modul i kjerneporekomplekset (NPC) som bidrar til porestativets sammensetning og stabilitet. Ved å sette inn SNAPf-kodingssekvensen på det endogene lokuset, uttrykkes det merkede SEH1-proteinet under naturlig regulatorisk kontroll, noe som bevarer fysiologiske uttrykksnivåer og minimerer forstyrrelser i kjerneporekomposisjonen.

SNAPf-taggen er en konstruert, hurtig reagerende variant av SNAP-taggen som kovalent binder benzyguaninkonjugerte substrater, noe som muliggjør selektiv og stabil fluorescerende merking i levende eller fikserte celler. I U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler lokaliseres fusjonsproteinet til kjernemembranen i et punktformet mønster som er karakteristisk for NPC-fordelingen. Fordi merking skjer på endogene proteinnivåer, er dette systemet godt egnet for kvantitativ fluorescensmikroskopi, superoppløsningsavbildning og enkeltpartikkel-sporingsanalyser med sikte på å dissekere NPC-organisering og støkiometri. Den flate morfologien og de store kjernene til U2OS-celler letter ytterligere høyoppløselig visualisering av kjernemembranstrukturer.

SEH1 deltar i NPC-biogenese og har også vært involvert i kinetokorrelaterte prosesser under mitose. Følgelig gir denne cellelinjen en robust plattform for å undersøke cellecyklusavhengig NPC-montering og demontering, romlig organisering av Y-komplekset innenfor porestrukturen og potensielle doble roller for SEH1 ved kjernemembranen og mitotiske kinetokorer. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 muliggjør mekanistiske studier av kjerneporens arkitektur og dynamikk under fysiologisk relevante ekspresjonsforhold.

Organism

Menneskelig

Tissue

Bein

Disease

Osteosarkom

Metastatic site

Primærsvulstens lokalisering (bein)

Applications

Biologien bak Y-komplekset/NUP107-160-komplekset; SEH1 i oppbyggingen av NPC-stativet; kinetokor-assosierte NPC-komponenter; NPC-støkiometri; SNAP-puls-chase-merking; superoppløsningsmikroskopi; NPC-biogenese; mitotisk nedbrytning og gjenoppbygging av NPC

Kjennetegn**Age**

15 år

Gender

Kvinne

Ethnicity

Kaukasisk

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664**Morphology** Epitel-lignende**Cell type** Epitelceller (osteosarkom)**Growth properties** Vedhengende**Regulatoriske data****Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytion-katalognummer 300664)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Ikke tildelt (CRISPR-modifisert U2OS-derivat; foreldrecelle U2OS CVCL_0042)**Depositor** Ellenberg-laboratoriet (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Denne humane osteosarkomcellelinjen (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) inneholder en CRISPR-mediert SNAPf-SEH1-fusjon som muliggjør selektiv merking av SEH1-nukleoporinet. Modifikasjonen er stabilt til stede. Denne klassifiseringen gjelder bare i Tyskland og kan variere andre steder.**Biomolekylære data****Protein expression** SEH1, SNAPf-tag**Håndtering****Culture Medium** McCoy's 5a, m: 3,0 g/L glukose, m: stabil glutamin, m: 2,0 mM natriumpyruvat, m: 2,2 g/L NaHCO₃ (Cytion artikkelnummer 820200a)**Supplements** Suppler med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO₃, 1 % NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** ca. 24 til 36 timer

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664

Subculturing Fjern det gamle mediet fra de adherente cellene, og vask dem med PBS uten kalsium og magnesium. Bruk 3-5 ml PBS for T25-kolber og 5-10 ml for T75-kolber. Dekk deretter cellene helt med Accutase, med 1-2 ml for T25-kolber og 2,5 ml for T75-kolber. La cellene inkubere i romtemperatur i 8-10 minutter for å løsne dem. Etter inkubasjon blandes cellene forsiktig med 10 ml medium for å resuspendere dem, og sentrifuger deretter ved 300xg i 3 minutter. Kast supernatanten, resuspendere cellene i nytt medium, og overfør dem til nye kolber som allerede inneholder nytt medium.

Split ratio 1 til 3

Seeding density 1 til 3×10^4 celler/cm²

Fluid renewal 2 til 3 ganger per uke

Freeze medium Som kryopreserveringsmedium bruker vi komplett vekstmedium (inkludert FBS) + 10 % DMSO for tilstrekkelig levedyktighet etter optiming, eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som inneholder optimaliserte osmobeskyttende midler og metabolske stabilisatorer for å øke utvinningen og redusere kryoinduisert stress.

Thawing and Culturing Cells

1. Kontroller at hetteglasset er dypfrost ved levering, ettersom cellene sendes på tørris for å opprettholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved mottak skal hetteglasset enten oppbevares umiddelbart ved temperaturer under -150 °C for å sikre at cellenes integritet bevares, eller gå videre til trinn 3 hvis umiddelbar dyrking er nødvendig.
3. Ved umiddelbar dyrking tiner du hetteglasset raskt ved å senke det ned i et 37 °C varmt vannbad med rent vann og et antimikrobielt middel, og røre forsiktig i 40-60 sekunder til det blir en liten isklump igjen.
4. Utfør alle påfølgende trinn under sterile forhold i en strømningshette, og desinfiser kryoflasken med 70 % etanol før du åpner den.
5. Åpne det desinfiserte hetteglasset forsiktig, og overfør cellesuspensjonen til et 15 ml sentrifugerør som inneholder 8 ml romtemperert dyrkingsmedium, og bland forsiktig.
6. Sentrifuger blandingen ved 300 x g i 3 minutter for å separere cellene, og kast supernatanten som inneholder rester av frysemedium, forsiktig.
7. Resuspendere cellepelletten forsiktig i 10 ml nytt dyrkningsmedium. For adherente celler, del suspensjonen mellom to T25-kulturkolber; for suspensjonskulturer, overfør alt mediet til én T25-kolbe for å fremme effektiv celleinteraksjon og vekst.
8. Følg etablerte subkulturprotokoller for fortsatt vekst og vedlikehold av cellelinjen, noe som sikrer pålitelige eksperimentelle resultater.

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664

Incubation Atmosphere 37 °C, 5 %_{CO2}, befuktet atmosfære.

Flask Coating Ingen

Freezing Procedure Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. -78 °C under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

Shipping Conditions Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. -78 °C under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

Storage Conditions For langtidsoppbevaring plasseres hetteglassene i flytende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Lagring ved -80 °C er kun akseptabelt som et kort mellomtrinn før overføring til flytende nitrogen.

Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

Sterility Mykoplasma-kontaminering utelukkes ved hjelp av både PCR-baserte analyser og luminescensbaserte metoder for påvisning av mykoplasma.

For å sikre at det ikke finnes bakterie-, sopp- eller gjærkontaminering, blir cellekulturene inspisert visuelt hver dag.