

Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Informacje ogólne****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 to zmodyfikowana genetycznie linia komórek ludzkiego osteosarcoma pochodząca z komórek U2OS, w której endogenny gen SEH1L (SEH1) został zmodyfikowany przy użyciu technologii CRISPR/Cas9 w celu zakodowania znacznika SNAPf w ramce. SEH1 jest składnikiem kompleksu Y (znanego również jako kompleks NUP107-160), podstawowego modułu strukturalnego kompleksu porów jądrowych (NPC), który przyczynia się do tworzenia szkieletu porów i ich stabilności. Dzięki wstawieniu sekwencji kodującej SNAPf w endogennym locus, oznaczone białko SEH1 jest ekspresjonowane pod kontrolą naturalnych mechanizmów regulacyjnych, co pozwala zachować fizjologiczne poziomy ekspresji i zminimalizować zaburzenia w składzie porów jądrowych.

Tag SNAPf jest zmodyfikowaną, szybko reagującą odmianą tagu SNAP, która kowalencyjnie wiąże substraty sprzężone z benzyloguaniną, umożliwiając selektywne i stabilne znakowanie fluorescencyjne w żywych lub utrwalonych komórkach. W komórkach U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 białko fuzyjne lokalizuje się w otoczce jądra komórkowego w postaci charakterystycznego dla rozmieszczenia NPC wzoru punktowego. Ponieważ znakowanie odbywa się na poziomie białek endogennych, system ten dobrze nadaje się do ilościowej mikroskopii fluorescencyjnej, obrazowania w superrozdzielczości oraz analiz śledzenia pojedynczych cząstek, mających na celu rozłożenie organizacji i stechiometrii NPC. Płaska morfologia i duże jądra komórek U2OS dodatkowo ułatwiają wizualizację struktur otoczki jądrowej w wysokiej rozdzielczości.

SEH1 uczestniczy w biogenezie NPC, a także bierze udział w procesach związanych z kinetochorem podczas mitozy. W związku z tym ta linia komórkowa stanowi solidną platformę do badania zależnego od cyklu komórkowego montażu i demontażu NPC, przestrzennej organizacji kompleksu Y w ramach szkieletu porów oraz potencjalnej podwójnej roli SEH1 w otoczce jądrowej i kinetochorach mitotycznych. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 umożliwia badania mechanistyczne architektury i dynamiki porów jądrowych w warunkach ekspresji istotnych z fizjologicznego punktu widzenia.

Organism Człowiek**Tissue** Kość**Disease** Mięsak kościopochodny**Metastatic site** Miejsce występowania guza pierwotnego (kość)**Applications** Biologia kompleksu Y/kompleksu NUP107-160; rola białka SEH1 w tworzeniu szkieletu NPC; składniki NPC związane z kinetochorem; stechiometria NPC; znakowanie metodą „pulse-chase” z użyciem SNAP; mikroskopia superrozdzielcza; biogeneza NPC; rozpad i ponowne tworzenie NPC podczas mitozy**Charakterystyka****Age** 15 lat**Gender** Kobieta

Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Ethnicity	Kaukaski
Morphology	Podobny do nabłonka
Cell type	Komórki nabłonkowe (osteosarcoma)
Growth properties	Adherent

Dane regulacyjne

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (numer katalogowy Cytion 300664)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Nieprzypisane (odmiana komórek U2OS zmodyfikowana metodą CRISPR; komórki macierzyste U2OS CVCL_0042)
Depositor	Laboratorium Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Ta ludzka linia komórek kostniakomięsaka (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) zawiera fuzję SNAPf-SEH1 za pośrednictwem CRISPR, która umożliwia selektywne znakowanie nukleoporyny SEH1. Modyfikacja jest stabilnie obecna. Ta klasyfikacja ma zastosowanie tylko w Niemczech i może się różnić w innych krajach.

Dane biomolekularne

Protein expression	SEH1, znacznik SNAPf
---------------------------	----------------------

Obsługa

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukozy, w: stabilna glutamina, w: 2,0 mM pirogronianu sodu, w: 2,2 g/l NaHCO ₃ (numer artykułu Cytion 820200a)
Supplements	Uzupełnić pożywkę o 10% FBS, 3,0 g/l glukozy, stabilną glutaminę, 2,0 mM pirogronianu sodu, 2,2 g/l NaHCO ₃ , 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase

Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Doubling time ok. 24–36 godzin

Subculturing Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Split ratio od 1 do 3

Seeding density od 1 do 3×10^4 komórek/cm²

Fluid renewal 2 do 3 razy w tygodniu

Freeze medium Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

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

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $300 \times g$ przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawieszonych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Flask Coating

Brak

**Freezing
Procedure**

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196°C . Przechowywanie w temperaturze -80°C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA

Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.