

Cellule U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Informații generale****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 este o linie celulară de osteosarcom uman editată genetic, derivată din celule U2OS, în care gena endogenă SEH1L (SEH1) a fost modificată folosind tehnologia CRISPR/Cas9 pentru a codifica o etichetă SNAPf în cadru. SEH1 este o componentă a complexului Y (cunoscut și sub numele de complexul NUP107-160), un modul structural central al complexului porilor nucleari (NPC) care contribuie la asamblarea și stabilitatea scheletului porilor. Prin inserarea secvenței de codificare SNAPf la locusul endogen, proteina SEH1 marcată este exprimată sub controlul regulator nativ, păstrând nivelurile de expresie fiziologică și minimizând perturbările compoziției porilor nucleari.

Eticheta SNAPf este o variantă modificată genetic, cu reacție rapidă, a etichetei SNAP, care se leagă covalent de substraturi conjugate cu benzilguanină, permițând marcarea fluorescență selectivă și stabilă în celule vii sau fixate. În celulele U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1, proteina de fuziune se localizează în învelișul nuclear într-un model punctiform caracteristic distribuției NPC. Deoarece marcarea are loc la nivelurile proteice endogene, acest sistem este foarte potrivit pentru microscopia fluorescență cantitativă, imagistica de super-rezoluție și analizele de urmărire a particulelor individuale care vizează disecarea organizării și stoichiometriei NPC. Morfologia plată și nucleele mari ale celulelor U2OS facilitează și mai mult vizualizarea de înaltă rezoluție a structurilor învelișului nuclear.

SEH1 participă la biogeneza NPC și a fost implicat și în procesele asociate kinetocorului în timpul mitozei. În consecință, această linie celulară oferă o platformă robustă pentru investigarea asamblării și dezasamblării NPC dependente de ciclul celular, a organizării spațiale a complexului Y în cadrul scheletului porilor și a potențialelor roluri duale ale SEH1 la nivelul învelișului nuclear și al kinetocorilor mitotici. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 permite studiile mecaniciste ale arhitecturii și dinamicii porilor nucleari în condiții de expresie relevante din punct de vedere fiziologic.

Organism Om**Tissue** Os**Disease** Osteosarcom**Caracteristici****Age** 15 ani**Gender** Femei**Ethnicity** Caucazian**Morphology** De tip epitelial**Growth properties** Aderent

Celule U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Date de reglementare**

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (număr de catalog Cytion 300664)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Laboratorul Ellenberg (EMBL)
GMO Status	OMG-S1: Această linie celulară de osteosarcom uman (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) conține o fuziune SNAPf-SEH1 mediată de CRISPR care permite marcarea selectivă a nucleoporinei SEH1. Modificarea este prezentă în mod stabil. Această clasificare se aplică numai în Germania și poate diferi în alte țări.

Date biomoleculare

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

Manipulare

Culture Medium	McCoys 5a, cu: 3,0 g/L glucoză, cu: glutamină stabilă, cu: 2,0 mM piruvat de sodiu, cu: 2,2 g/L NaHCO ₃ (numărul articolului Cytion 820200a)
Supplements	Suplimentați mediul cu 10% FBS, 3,0 g/L glucoză, glutamină stabilă, 2,0 mM piruvat de sodiu, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Îndepărtați mediul vechi de pe celulele aderente și spălați-le cu PBS care nu conține calciu și magneziu. Pentru flacoanele T25, se utilizează 3-5 ml de PBS, iar pentru flacoanele T75, 5-10 ml. Apoi, se acoperă celulele complet cu Accutase, folosind 1-2 ml pentru flacoanele T25 și 2,5 ml pentru flacoanele T75. Lăsați celulele la incubare la temperatura camerei timp de 8-10 minute pentru a le detașa. După incubare, amestecați ușor celulele cu 10 ml de mediu pentru a le resuspenda, apoi centrifugați la 300xg timp de 3 minute. Aruncați supernatantul, resuspendați celulele în mediu proaspăt și transferați-le în flacoane noi care conțin deja mediu proaspăt.
Freeze medium	Ca mediu de crioconservare, folosim mediu de creștere complet (inclusiv FBS) + 10% DMSO pentru o viabilitate adecvată după dezghețare sau CM-1 (număr de catalog Cytion 800100), care include osmoprotectanți optimizați și stabilizatori metabolici pentru a spori recuperarea și a reduce stresul indus de criogenie.

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

1. Confirmați că flaconul rămâne profund înghețat la livrare, deoarece celulele sunt expediate pe gheață carbonică pentru a menține temperaturi optime în timpul transportului.
2. La primire, fie depozitați crioviola imediat la temperaturi sub -150 °C pentru a asigura păstrarea integrității celulare, fie treceți la etapa 3 dacă este necesară cultivarea imediată.
3. Pentru cultivarea imediată, dezghețați rapid flaconul prin scufundarea acestuia într-o baie de apă la 37 °C cu apă curată și un agent antimicrobian, agitându-l ușor timp de 40-60 de secunde până când rămâne o mică aglomerare de gheață.
4. Se efectuează toate etapele ulterioare în condiții sterile, într-o hotă cu flux, dezinfectând crioviola cu etanol 70% înainte de deschidere.
5. Se deschide cu grijă flaconul dezinfectat și se transferă suspensia celulară într-un tub de centrifugare de 15 ml care conține 8 ml de mediu de cultură la temperatura camerei, amestecând ușor.
6. Se centrifughează amestecul la 300 x g timp de 3 minute pentru a separa celulele și se aruncă cu grijă supernatantul care conține mediul de congelare rezidual.
7. Se resuspendă ușor peletul celular în 10 ml de mediu de cultură proaspăt. Pentru celulele aderente, împărțiți suspensia între două flacoane de cultură T25; pentru culturile în suspensie, transferați tot mediul într-un flacon T25 pentru a promova interacțiunea și creșterea celulară eficientă.
8. Respectați protocoalele de subcultură stabilite pentru creșterea și menținerea continuă a liniei celulare, asigurând rezultate experimentale fiabile.

**Incubation
Atmosphere**

37°C, 5% CO_2 , atmosferă umidificată.

Flask Coating

Niciuna

**Freezing
Procedure**

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

**Shipping
Conditions**

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

Celule U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Storage Conditions

Pentru conservarea pe termen lung, flacoanele se plasează în azot lichid în fază de vapori la o temperatură cuprinsă între -150 și -196 °C. Păstrarea la -80 °C este acceptabilă doar ca o scurtă etapă intermediară înainte de transferul în azot lichid.

Controlul calității / Profil genetic / HLA

Sterility

Contaminarea cu micoplasmă este exclusă utilizând atât teste bazate pe PCR, cât și metode de detectare a micoplasmei bazate pe luminescență.

Pentru a se asigura că nu există contaminare bacteriană, fungică sau de drojdie, culturile celulare sunt supuse unor inspecții vizuale zilnice.