

Bunky U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Všeobecné informácie****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 je génovo upravená ľudská osteosarkómová bunka odvodená z buniek U2OS, v ktorej bol endogénny gén SEH1L (SEH1) modifikovaný pomocou technológie CRISPR/Cas9 tak, aby kódoval in-frame SNAPf tag. SEH1 je súčasťou komplexu Y (známeho aj ako komplex NUP107-160), základného štrukturálneho modulu komplexu jadrových pórov (NPC), ktorý prispieva k zostaveniu a stabilite pórového lešenia. Vložením kódujúcej sekvencie SNAPf do endogénneho lokusu sa označený proteín SEH1 exprimuje pod pôvodnou regulačnou kontrolou, čím sa zachovávajú fyziologické hladiny expzie a minimalizujú sa poruchy zloženia jadrových pórov.

Značka SNAPf je umelo vytvorená, rýchlo reagujúca varianta značky SNAP, ktorá kovalentne viaže substráty konjugované s benzylguanínom, čo umožňuje selektívne a stabilné fluorescenčné značenie v živých alebo fixovaných bunkách. V bunkách U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 sa fúzny proteín lokalizuje do jadrovej membrány v bodkovitom vzore charakteristickom pre distribúciu NPC. Keďže značenie prebieha na úrovni endogénnych proteínov, tento systém je vhodný na kvantitatívnu fluorescenčnú mikroskopiu, zobrazovanie s vysokým rozlíšením a analýzy sledovania jednotlivých častíc zamerané na rozbor organizácie a stechiometrie NPC. Plochá morfológia a veľké jadrá buniek U2OS ďalej uľahčujú vizualizáciu štruktúr jadrovej membrány s vysokým rozlíšením.

SEH1 sa podieľa na biogenéze NPC a je tiež zapojený do procesov spojených s kinetochórom počas mitózy. Táto bunková línia preto poskytuje robustnú platformu na skúmanie montáže a demontáže NPC závislej od bunkového cyklu, priestorovej organizácie Y-komplexu v rámci pórovitej kostry a potenciálnej dvojitej úlohy SEH1 v jadrovej membráne a mitotických kinetochóroch. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 umožňuje mechanistické štúdie architektúry a dynamiky jadrových pórov za fyziologicky relevantných podmienok expzie.

Organism Ľudské**Tissue** Kosti**Disease** Osteosarkóm**Metastatic site** Miesto primárneho nádoru (kosť)**Applications** Biológia komplexu Y/komplexu NUP107-160; úloha proteínu SEH1 pri zostavovaní kostry NPC; zložky NPC asociované s kinetochórom; stechiometria NPC; značenie metódou SNAP pulse-chase; mikroskopia so superrozlíšením; biogenéza NPC; mitotická dezintegrácia a opätovná integrácia NPC**Charakteristika****Age** 15 rokov**Gender** Ženy**Ethnicity** Kaukazský

Bunky U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Morphology** Epitelu podobné**Cell type** Epitelové bunky (osteosarkóm)**Growth properties** Adherent**Regulačné údaje****Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (katalógové číslo Cytion 300664)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Nepriadené (derivát U2OS modifikovaný pomocou CRISPR; rodičovská bunka U2OS CVCL_0042)**Depositor** Ellenbergova laboratória (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Táto línia ľudských osteosarkómových buniek (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) obsahuje fúziu SNAPf-SEH1 sprostredkovanú CRISPR, ktorá umožňuje selektívne značenie nukleoporínu SEH1. Modifikácia je stabilne prítomná. Táto klasifikácia platí len v Nemecku a môže sa líšiť v iných krajinách.**Biomolekulárne údaje****Protein expression** SEH1, značka SNAPf**Spracovanie****Culture Medium** McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilný glutamín, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (číslo článku Cytion 820200a)**Supplements** Doplníte médium o 10 % FBS, 3,0 g/l glukózy, stabilný glutamín, 2,0 mM pyruvát sodný, 2,2 g/l NaHCO₃, 1 % NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** približne 24 až 36 hodín

Bunky U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Subculturing Odstráňte staré médium z adherovaných buniek a premyte ich PBS, ktorý neobsahuje vápnik a horčík. Pre banky T25 použite 3 - 5 ml PBS a pre banky T75 použite 5 - 10 ml. Potom bunky úplne pokryte Accutase, pričom použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75. Nechajte bunky inkubovať pri izbovej teplote 8-10 minút, aby sa oddelili. Po inkubácii jemne premiešajte bunky s 10 ml média, aby boli znovu suspendované, a potom ich 3 minúty odstredujte pri 300xg. Supernatant zlikvidujte, bunky znovu rozmiešajte v čerstvom médiu a preneste ich do nových fliaš, ktoré už obsahujú čerstvé médium.

Split ratio 1 až 3

Seeding density 1 až 3×10^4 buniek/cm²

Fluid renewal 2 až 3-krát týždenne

Freeze medium Ako kryokonzervačné médium používame kompletne rastové médium (vrátane FBS) + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení alebo CM-1 (katalógové číslo 800100 spoločnosti Cytion), ktoré obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory na zlepšenie regenerácie a zníženie stresu spôsobeného kryom.

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

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako -150 °C, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri 300 x g počas 3 minút, aby sa bunky oddelili, a opatrne zlikvidujte supernatant obsahujúci zvyšky zmrazovacieho média.
7. Pelet buniek jemne resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačného média. V prípade adherentných buniek rozdeľte suspenziu medzi dve kultivačné banky T25; v prípade suspenzných kultúr preneste všetko médium do jednej banky T25, aby ste podporili účinnú interakciu a rast buniek.
8. Dodržiavajte zavedené subkultivačné protokoly na nepretržitý rast a udržiavanie bunkovej línie, čím sa zabezpečia spoľahlivé výsledky experimentov.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žiadne

**Freezing
Procedure**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

**Shipping
Conditions**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Bunky U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminácia mykoplazmami sa vylučuje pomocou testov založených na PCR a metód detekcie mykoplazmiem založených na luminiscencii.

Aby sa zabezpečilo, že nedošlo ku kontaminácii baktériami, hubami alebo kvasinkami, bunkové kultúry sa denne vizuálne kontrolujú.