

Celice U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Splošne informacije****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 je genomsko spremenjena človeška osteosarkomska celična linija, pridobljena iz celic U2OS, v kateri je bil endogeni gen SEH1L (SEH1) spremenjen s tehnologijo CRISPR/Cas9, da kodira SNAPf oznako v okviru. SEH1 je sestavni del Y-kompleksa (znanega tudi kot NUP107-160 kompleks), osnovnega strukturne modula jedrskega por kompleksa (NPC), ki prispeva k sestavi in stabilnosti por. Z vstavitvijo kodirne sekvence SNAPf v endogeni lokus se označeni protein SEH1 izraža pod naravnim regulativnim nadzorom, kar ohranja fiziološke ravni izražanja in zmanjšuje motnje v sestavi jedrskih por.

Oznaka SNAPf je inženirsko zasnovana, hitro reagirajoča različica oznake SNAP, ki se kovalentno veže na bencilguanin-konjugirane substrata, kar omogoča selektivno in stabilno fluorescenčno označevanje v živih ali fiksiranih celicah. V celicah U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 se fuzijski protein lokalizira v jedrski ovojnici v pikastem vzorcu, značilnem za porazdelitev NPC. Ker se označevanje odvija na ravni endogenih proteinov, je ta sistem primeren za kvantitativno fluorescenčno mikroskopijo, slikanje z visoko ločljivostjo in analize sledenja posameznih delcev, namenjene razčlenitvi organizacije in stehiometrije NPC. Ploščata morfologija in velika jedra celic U2OS dodatno olajšujejo vizualizacijo struktur jedrske ovojnice z visoko ločljivostjo.

SEH1 sodeluje v biogenezi NPC in je vpleten tudi v procese, povezane s kinetokori, med mitozo. Skladno s tem ta celična linija zagotavlja robustno platformo za preučevanje sestavljanja in razstavljanja NPC, odvisnega od celičnega cikla, prostorske organizacije Y-kompleksa znotraj porešne ogrodje in potencialnih dvojnih vlog SEH1 na jedrski ovojnici in mitotičnih kinetokorih. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 omogoča mehanistične študije arhitekture in dinamike jedrskih por pod fiziološko relevantnimi pogoji izražanja.

Organism Človek**Tissue** Kosti**Disease** Osteosarkom**Metastatic site** Mesto primarnega tumorja (kost)**Applications** Biologija kompleksa Y/kompleksa NUP107-160; vloga SEH1 pri sestavljanju ogrodja NPC; komponente NPC, povezane s kinetokorom; stehiometrija NPC; označevanje s tehniko SNAP pulse-chase; mikroskopija s superresolucijo; biogeneza NPC; razgradnja in ponovna sestava NPC med mitozno fazo**Značilnosti****Age** 15 let**Gender** Ženske**Ethnicity** Kavkaški**Morphology** Epitelijam podobni

Celice U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Cell type** Epitelijske celice (osteosarkom)**Growth properties** Pripadajoče**Regulativni podatki****Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (kataloška številka Cytion 300664)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Ni dodeljeno (derivat celic U2OS, spremenjen s tehnologijo CRISPR; izvorne celice U2OS CVCL_0042)**Depositor** Laboratorij Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GSO-S1: Ta celična linija človeškega osteosarkoma (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) vsebuje s CRISPR posredovano sintezo SNAPf-SEH1, ki omogoča selektivno označevanje nukleoporina SEH1. Modifikacija je stabilno prisotna. Ta razvrstitev velja samo v Nemčiji in se lahko drugje razlikuje.**Biomolekularni podatki****Protein expression** SEH1, oznaka SNAPf**Ravnanje s spletno stranjo****Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/L glukoze, w: stabilen glutamin, w: 2,0 mM natrijevega piruvata, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (številka izdelka Cytion 820200a)**Supplements** Gojišče dopolnite z 10 % FBS, 3,0 g/L glukoze, stabilnim glutaminom, 2,0 mM natrijevega piruvata, 2,2 g/L NaHCO₃, 1 % NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** približno 24 do 36 ur

Celice U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Subculturing Odstranite staro gojišče z adherentnih celic in jih sperite s PBS, ki ne vsebuje kalcija in magnezija. Za bučke T25 uporabite 3-5 ml PBS, za bučke T75 pa 5-10 ml. Nato celice popolnoma prekrijte z Accutase, pri čemer uporabite 1-2 ml za bučke T25 in 2,5 ml za bučke T75. Celice pustite inkubirati pri sobni temperaturi 8-10 minut, da se ločijo. Po inkubaciji celice nežno premešajte z 10 ml gojišča, da se ponovno suspendirajo, nato jih 3 minute centrifugirajte pri 300xg. Zavržite supernatant, ponovno suspendirajte celice v svežem gojišču in jih prenesite v nove bučke, ki že vsebujejo sveže gojišče.

Split ratio 1 do 3

Seeding density 1 do 3×10^4 celic/cm²

Fluid renewal 2 do 3-krat na teden

Freeze medium Kot gojišče za kriokonzervacijo uporabljamo popolno rastno gojišče (vključno s FBS) + 10 % DMSO za ustrezno vitalnost po odmrznitvi ali CM-1 (kataloška številka 800100 podjetja Cytion), ki vključuje optimizirane osmoprotektante in presnovne stabilizatorje za izboljšanje okrevanja in zmanjšanje stresa, povzročene s kriom.

Celice U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Thawing and Culturing Cells

1. Prepričajte se, da je viala ob dostavi globoko zamrznjena, saj se celice pošiljajo na suhem ledu, da se med prevozom ohranijo optimalne temperature.
2. Po prejemu krioviala takoj shranite pri temperaturi pod $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, da zagotovite ohranitev celične celovitosti, ali pa nadaljujte s korakom 3, če je potrebno takojšnje gojenje.
3. Za takojšnje gojenje vialo hitro odtalite tako, da jo potopite v vodno kopel s čisto vodo in protimikrobnim sredstvom pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter 40-60 sekund nežno mešate, dokler ne ostane majhen ledeni kepica.
4. Vse nadaljnje korake izvajajte v sterilnih pogojih v pretočni nape, pred odprtjem pa kriovial razkužite s 70 % etanolom.
5. Previdno odprite razkuženo vialo in celično suspenzijo prenesite v 15-mililitrsko centrifugirno epruveto, ki vsebuje 8 ml gojišča sobne temperature, ter nežno premešajte.
6. Mešanico centrifugirajte pri $300 \times g$ 3 minute, da ločite celice, in previdno zavržite supernatant, ki vsebuje ostanke zamrzovalnega gojišča.
7. Pelet celic nežno ponovno suspendirajte v 10 ml svežega gojišča. Pri adherentnih celicah suspenzijo razdelite med dve bučki T25; pri suspenzijskih kulturah prenesite vse gojišče v eno bučko T25, da spodbudite učinkovito interakcijo in rast celic.
8. Upoštevajte uveljavljene protokole subkultur za nadaljnjo rast in vzdrževanje celične linije ter tako zagotovite zanesljive rezultate poskusov.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , vlažno ozračje.

Flask Coating

Nič

Freezing Procedure

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Shipping Conditions

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Celice U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Storage Conditions

Za dolgotrajno shranjevanje vial postavite v tekoči dušik v parni fazi pri približno -150 do -196 °C. Shranjevanje pri -80 °C je sprejemljivo le kot kratek vmesni korak pred prenosom v tekoči dušik.

Nadzor kakovosti / Genetski profil / HLA

Sterility

Kontaminacija z mikoplazmo se izključi z uporabo testov na podlagi PCR in metod za odkrivanje mikoplazme na podlagi luminiscence.

Da se zagotovi, da ni kontaminacije z bakterijami, glivami ali kvasovkami, se celične kulture dnevno vizualno pregledujejo.