

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 Hücreleri | 300664**Genel bilgi****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1, endojen SEH1L (SEH1) geninin CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak bir çerçeve içi SNAPf etiketini kodlamak üzere modifiye edildiği U2OS hücrelerinden türetilmiş, genom düzenlemesi yapılmış bir insan osteosarkom hücre hattıdır. SEH1, gözenek iskeletinin montajına ve stabilitesine katkıda bulunan nükleer gözenek kompleksinin (NPC) temel yapısal modülü olan Y kompleksinin (NUP107-160 kompleksi olarak da bilinir) bir bileşenidir. SNAPf kodlama dizisini endojen lokusa ekleyerek, etiketli SEH1 proteini doğal düzenleyici kontrol altında eksprese edilir, fizyolojik ekspresyon seviyeleri korunur ve nükleer gözenek bileşimindeki bozulmalar en aza indirilir.

SNAPf etiketi, benzyguanyin konjuge substratları kovalent olarak bağlayan, canlı veya sabit hücrelerde seçici ve stabil floresan etiketleme sağlayan, mühendislik ürünü, hızlı reaksiyon gösteren bir SNAP etiketi varyantıdır. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 hücrelerinde, füzyon proteini NPC dağılımının karakteristik noktalı deseninde nükleer zarfta lokalize olur. Etiketleme endojen protein seviyelerinde gerçekleştiğinden, bu sistem NPC organizasyonunu ve stokiyometrisini incelemek amacıyla yapılan kantitatif floresan mikroskopi, süper çözünürlüklü görüntüleme ve tek parçacık izleme analizleri için çok uygundur. U2OS hücrelerinin düz morfolojisi ve büyük çekirdekleri, nükleer zarf yapılarının yüksek çözünürlüklü görselleştirilmesini daha da kolaylaştırır.

SEH1, NPC biyogenezine katılır ve ayrıca mitoz sırasında kinetokor ile ilişkili süreçlerde rol oynar. Buna göre, bu hücre hattı, hücre döngüsüne bağlı NPC montajı ve demontajı, gözenek iskeleti içindeki Y kompleksinin uzamsal organizasyonu ve SEH1'in nükleer zarf ve mitotik kinetokorlarda potansiyel ikili rollerini araştırmak için sağlam bir platform sağlar. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1, fizyolojik olarak ilgili ekspresyon koşulları altında nükleer gözenek mimarisi ve dinamiğinin mekaniksel çalışmalarını mümkün kılar.

Organism

İnsan

Tissue

Kemik

Disease

Osteosarkom

Metastatic site

Birincil tümör yeri (kemik)

Applications

Y-kompleksi/NUP107-160 kompleksinin biyolojisi; NPC iskeletinin oluşumunda SEH1'in rolü; kinetokorla ilişkili NPC bileşenleri; NPC stokiyometrisi; SNAP puls-chase etiketleme; süper çözünürlüklü mikroskopi; NPC biyogenez; mitotik NPC'nin sökülmesi ve yeniden birleşmesi

Özellikler**Age**

15 yıl

Gender

Kadın

Ethnicity

Kafkas

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 Hücreleri | 300664**Morphology** Epitel benzeri**Cell type** Epitel hücreleri (osteosarkom)**Growth properties** Yapışık**Düzenleyici Veriler****Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytion katalog numarası 300664)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Atanmamış (CRISPR ile modifiye edilmiş U2OS türevi; ana U2OS CVCL_0042)**Depositor** Ellenberg Laboratuvarı (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Bu insan osteosarkom hücre hattı (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1), SEH1 nükleoporininin seçici olarak etiketlenmesini sağlayan CRISPR aracılı bir SNAPf-SEH1 füzyonu içerir. Modifikasyon stabil olarak mevcuttur. Bu sınıflandırma sadece Almanya içinde geçerlidir ve başka yerlerde farklılık gösterebilir.**Biyomoleküler Veriler****Protein expression** SEH1, SNAPf-tag**Elleçleme****Culture Medium** McCoy's 5a, w: 3.0 g/L Glukoz, w: stabil Glutamin, w: 2.0 mM Sodyum piruvat, w: 2.2 g/L NaHCO₃ (Cytion makale numarası 820200a)**Supplements** Ortamı %10 FBS, 3,0 g/L Glukoz, stabil Glutamin, 2,0 mM Sodyum piruvat, 2,2 g/L NaHCO₃, %1 NEAA ile takviye edin**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** yaklaşık 24 ila 36 saat

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 Hücreleri | 300664

Subculturing Yapışık hücrelerden eski ortamı çıkarın ve kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile yıkayın. T25 şişeleri için 3-5 ml PBS ve T75 şişeleri için 5-10 ml kullanın. Ardından, T25 flasklar için 1-2 ml ve T75 flasklar için 2,5 ml kullanarak hücreleri Accutase ile tamamen kaplayın. Hücreleri ayırmak için oda sıcaklığında 8-10 dakika inkübasyona bırakın. İnkübasyondan sonra, hücreleri yeniden süspansiyon etmek için 10 ml besiyeriyle hafifçe karıştırın, ardından 300xg'de 3 dakika santrifüjleyin. Süpernatantı atın, hücreleri taze besiyerinde yeniden süspansiyon edin ve zaten taze besiyeri içeren yeni şişelere aktarın.

Split ratio 1'den 3'e kadar

Seeding density 1 ila 3×10^4 hücre/cm²

Fluid renewal haftada 2 ila 3 kez

Freeze medium Kriyoprezervasyon ortamı olarak, yeterli çözülme sonrası canlılık için tam büyüme ortamı (FBS dahil) + %10 DMSO veya iyileşmeyi artırmak ve kriyo-indüklenmiş stresi azaltmak için optimize edilmiş ozmoprotektanlar ve metabolik stabilizatörler içeren CM-1 (Cytion katalog numarası 800100) kullanıyoruz.

Thawing and Culturing Cells

1. Hücreler taşıma sırasında optimum sıcaklıkları korumak için kuru buz üzerinde gönderildiğinden, flakonun teslimat sırasında derin dondurulmuş halde kaldığını teyit edin.
2. Teslim aldıktan sonra, hücresel bütünlüğün korunmasını sağlamak için kriyovialı hemen -150°C'nin altındaki sıcaklıklarda saklayın veya hemen kültürleme gerekiyorsa 3. adıma geçin.
3. Derhal kültürleme için flakonun temiz su ve antimikrobiyal bir madde içeren 37°C'lik bir su banyosuna daldırıp küçük bir buz kümesi kalana kadar 40-60 saniye boyunca hafifçe çalkalayarak hızlıca çözün.
4. Sonraki tüm adımları steril koşullar altında bir akış başlığı içinde gerçekleştirin ve açmadan önce kriyoviyalleri %70 etanol ile dezenfekte edin.
5. Dezenfekte edilmiş flakonun dikkatlice açın ve hücre süspansiyonunu 8 ml oda sıcaklığında kültür ortamı içeren 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarın ve hafifçe karıştırın.
6. Hücreleri ayırmak için karışımı 300 x g'de 3 dakika santrifüjleyin ve artık dondurma ortamı içeren süpernatantı dikkatlice atın.
7. Hücre pelletini 10 ml taze kültür ortamında yavaşça yeniden süspansiyon edin. Yapışık hücreler için, süspansiyonu iki T25 kültür şişesi arasında bölün; süspansiyon kültürleri için, etkili hücre etkileşimini ve büyümesini teşvik etmek üzere tüm ortamı tek bir T25 şişesine aktarın.
8. Hücre hattının sürekli büyümesi ve bakımı için belirlenmiş alt kültür protokollerine uyun ve güvenilir deneysel sonuçlar elde edin.

Product sheet

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 Hücreleri | 300664

Incubation Atmosphere 37°C, %5_{CO2}, nemlendirilmiş atmosfer.

Flask Coating Yok

Freezing Procedure Kriyoprezerve edilmiş hücre hatları, nakliye boyunca yaklaşık -78 °C'yi korumak için yeterli soğutucu akışkan içeren, onaylanmış, yalıtılmış ambalajlarda kuru buz üzerinde gönderilir. Teslim aldığınızda, kabı hemen inceleyin ve flakonları gecikmeden uygun depoya aktarın.

Shipping Conditions Kriyoprezerve edilmiş hücre hatları, nakliye boyunca yaklaşık -78 °C'yi korumak için yeterli soğutucu akışkan içeren, onaylanmış, yalıtılmış ambalajlarda kuru buz üzerinde gönderilir. Teslim aldığınızda, kabı hemen inceleyin ve flakonları gecikmeden uygun depoya aktarın.

Storage Conditions Uzun süreli muhafaza için flakonları yaklaşık -150 ila -196 °C'de buhar fazlı sıvı nitrojen içine yerleştirin. 80 °C'de saklama yalnızca sıvı nitrojene aktarılmadan önce kısa bir ara adım olarak kabul edilebilir.

Kalite kontrol / Genetik profil / HLA

Sterility Mikoplazma kontaminasyonu hem PCR tabanlı tahliller hem de lüminesans tabanlı mikoplazma tespit yöntemleri kullanılarak dışlanır.

Bakteriyel, fungal veya maya kontaminasyonu olmadığından emin olmak için hücre kültürleri günlük görsel incelemelere tabi tutulur.