Product sheet

Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Загальна інформація

Description	U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 — це генетично модифікована лінія клітин остеосаркоми людини, отримана з клітин U2OS, в яких ендогенний ген SEH1L (SEH1) був модифікований за допомогою технології CRISPR/Cas9 для кодування вбудованого тегу SNAPf. SEH1 є компонентом Y-комплексу (також відомого як комплекс NUP107-160), основного структурного модуля ядерного пористого комплексу (NPC), який сприяє збірці та стабільності пористої структури. Шляхом вставки кодуючої послідовності SNAPf в ендогенний локус, мічений білок SEH1 експресується під нативним регуляторним контролем, зберігаючи фізіологічні рівні експресії та мінімізуючи порушення складу ядерних пор. Мітка SNAPf — це інженерний, швидкореагуючий варіант мітки SNAP, який ковалентно зв'язує субстрати, кон'юговані з бензилгуаніном, що дозволяє здійснювати селективне та стабільне флуоресцентне маркування в живих або фіксованих клітинах. У клітинах U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 фузійний білок локалізується в ядерній оболонці у вигляді крапчастих плям, характерних для розподілу NPC. Оскільки мічення відбувається на рівні ендогенних білків, ця система добре підходить для кількісної флуоресцентної мікроскопії, надвисокої роздільної здатності зображення та аналізу відстеження окремих частинок, спрямованих на розчленування організації та стехіометрії NPC. Плоска морфологія та великі ядра клітин U2OS ще більше полегшують візуалізацію структур ядерної оболонки з високою роздільною здатністю. SEH1 бере участь у біогенезі NPC, а також бере участь у процесах, пов'язаних з кінетохорами під час мітозу. Відповідно, ця клітинна лінія забезпечує надійну платформу для дослідження залежного від клітинного циклу складання та розкладання NPC, просторової організації Y-комплексу в пористій структурі та потенційної подвійної ролі SEH1 у ядерній оболонці та мітотичних кінетохорах. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 дозволяє проводити механістичні дослідження архітектури та динаміки ядерних пор у фізіологічно релевантних умовах експресії.
Organism	Людина
Tissue	Кость
Disease	Остеосаркома
Metastatic site	Локалізація первинної пухлини (кістка)
Applications	Біологія комплексу Y/комплексу NUP107-160; роль SEH1 у формуванні каркаса NPC; компоненти NPC, пов’язані з кінетохорами; стехіометрія NPC; мічення методом «пульс-чейз» за допомогою SNAP; мікроскопія надвисокої роздільної здатності; біогенез NPC; розпад і повторне формування NPC під час мітозу

Характеристики

Age	15 років
Gender	Жінка

Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Ethnicity	Кавказець
Morphology	Епітеліальноподібні
Cell type	Епітеліальні клітини (остеосаркома)
Growth properties	Адепт

Нормативні дані

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (номер за каталогом Cytion 300664)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Не визначено (похідна лінії U2OS, модифікована за допомогою CRISPR; батьківська лінія U2OS CVCL_0042)
Depositor	Лабораторія Елленберга (EMBL)
GMO Status	ГМО-S1: Ця лінія клітин остеосаркоми людини (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) містить злиття SNAPf-SEH1, опосередковане CRISPR, що дозволяє селективне мічення нуклеопорину SEH1. Модифікація стабільно присутня. Ця класифікація застосовується лише в Німеччині і може відрізнятися в інших країнах.

Біомолекулярні дані

Protein expression	SEH1, SNAPf-тег

Обробка

Culture Medium	McCoys 5a, w: 3,0 г/л Глюкоза, w: стабільна Глютамін, w: 2,0 мМ Піруват натрію, w: 2,2 г/л NaHCO3 (Cytion article number 820200a)
Supplements	Додайте до середовища 10% FBS, 3,0 г/л глюкози, стабільний глютамін, 2,0 мМ пірувату натрію, 2,2 г/л NaHCO3, 1% NEAA
Dissociation Reagent	Аккутаза

Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Doubling time	приблизно від 24 до 36 годин
Subculturing	Видаліть старе середовище з прилиплих клітин і промийте їх PBS, в якому бракує кальцію і магнію. Для колб T25 використовуйте 3-5 мл PBS, а для колб T75 - 5-10 мл. Потім повністю покрийте клітини аккутазою, використовуючи 1-2 мл для колб T25 і 2,5 мл для колб T75. Залиште клітини інкубуватися при кімнатній температурі протягом 8-10 хвилин, щоб відокремити їх. Після інкубації обережно змішайте клітини з 10 мл середовища, щоб ресуспендувати їх, а потім центрифугуйте при 300xg протягом 3 хвилин. Викиньте надосадову рідину, ресуспендуйте клітини у свіжому середовищі та перенесіть їх у нові колби, які вже містять свіже середовище.
Split ratio	від 1 до 3
Seeding density	від 1 до 3 × 10^4 клітин/$см^2$
Fluid renewal	2-3 рази на тиждень
Freeze medium	Як середовище кріоконсервування ми використовуємо повне живильне середовище (включаючи FBS) + 10% ДМСО для адекватної життєздатності після відтавання або CM-1 (номер за каталогом Cytion 800100), до складу якого входять оптимізовані осмопротектори та метаболічні стабілізатори для прискорення відновлення та зменшення кріоіндукованого стресу.

Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Thawing and Culturing Cells

1. Переконайтеся, що віал залишається глибоко замороженим після доставки, оскільки клітини транспортуються на сухому льоду для підтримання оптимальної температури під час транспортування.

2. Після отримання негайно зберігайте кріовіал при температурі нижче -150°C, щоб забезпечити збереження клітинної цілісності, або перейдіть до кроку 3, якщо потрібне негайне культивування.

3. Для негайного культивування швидко розморозьте віал, зануривши його у водяну баню з чистою водою і антимікробним засобом при температурі 37°C, обережно перемішуючи протягом 40-60 секунд, поки не залишиться невелика крижана грудка.

4. Всі наступні кроки виконуйте в стерильних умовах у проточній витяжній шафі, дезінфікуючи кріовіал 70% етанолом перед відкриттям.

5. Обережно відкрийте продезінфікований флакон і перенесіть клітинну суспензію в 15 мл центрифужну пробірку, що містить 8 мл культурального середовища кімнатної температури, обережно перемішуючи.

6. Відцентрифугуйте суміш при 300 x g протягом 3 хвилин, щоб відокремити клітини, і обережно викиньте надосадову рідину, що містить залишки заморожувального середовища.

7. Обережно ресуспендуйте осад клітин у 10 мл свіжого культурального середовища. Для адгезивних клітин розділіть суспензію між двома культуральними колбами T25; для суспензійних культур перенесіть все середовище в одну колбу T25, щоб сприяти ефективній взаємодії та росту клітин.

8. Дотримуйтесь встановлених протоколів субкультивування для продовження росту і підтримання клітинної лінії, забезпечуючи надійні результати експерименту.

Incubation Atmosphere	37°C, 5% $_{CO2}$, волога атмосфера.
Flask Coating	Ні
Freezing Procedure	Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевіреній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78 °C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і негайно перемістіть віали у відповідне місце для зберігання.

Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Shipping Conditions	Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевіреній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78 °C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і без зволікань перемістіть флакони у відповідне місце зберігання.
Storage Conditions	Для тривалого зберігання помістіть флакони в парофазний рідкий азот при температурі від -150 до -196 °C. Зберігання при -80 °C допустиме лише як короткий проміжний етап перед перенесенням у рідкий азот.

Контроль якості та молекулярний аналіз

Sterility	Зараження мікоплазмою виключається за допомогою аналізів на основі ПЛР та люмінесцентних методів виявлення мікоплазми. Щоб переконатися у відсутності бактеріального, грибкового або дріжджового забруднення, клітинні культури піддаються щоденному візуальному контролю.