

Tế bào U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Thông tin chung****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 là dòng tế bào ung thư xương người được chỉnh sửa gen từ dòng tế bào U2OS, trong đó gen SEH1L (SEH1) nội sinh đã được sửa đổi bằng công nghệ CRISPR/Cas9 để mã hóa một thẻ SNAPf trong khung đọc. SEH1 là một thành phần của phức hợp Y (còn được gọi là phức hợp NUP107-160), một mô-đun cấu trúc chính của phức hợp lỗ nhân (NPC), góp phần vào việc lắp ráp và ổn định khung lỗ nhân. Bằng cách chèn trình tự mã hóa SNAPf vào vị trí nội sinh, protein SEH1 được gắn thẻ được biểu hiện dưới sự kiểm soát điều hòa tự nhiên, duy trì mức biểu hiện sinh lý và giảm thiểu sự xáo trộn trong thành phần lỗ nhân.

Thẻ SNAPf là biến thể được thiết kế, phản ứng nhanh của thẻ SNAP, có khả năng liên kết cộng hóa trị với các chất nền được liên kết benzylguanine, cho phép đánh dấu huỳnh quang chọn lọc và ổn định trong tế bào sống hoặc cố định. Trong tế bào U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1, protein liên hợp định vị tại màng nhân theo mô hình chấm đặc trưng cho phân bố của phức hợp lỗ nhân. Vì quá trình đánh dấu diễn ra ở mức độ protein nội sinh, hệ thống này rất phù hợp cho các phân tích kính hiển vi huỳnh quang định lượng, hình ảnh siêu phân giải và theo dõi hạt đơn nhằm phân tích cấu trúc và tỷ lệ thành phần của NPC. Hình thái phẳng và nhân lớn của tế bào U2OS cũng giúp dễ dàng quan sát cấu trúc màng nhân với độ phân giải cao.

SEH1 tham gia vào quá trình sinh tổng hợp NPC và cũng được cho là có liên quan đến các quá trình liên quan đến kinetochore trong quá trình phân bào. Do đó, dòng tế bào này cung cấp một nền tảng mạnh mẽ để nghiên cứu sự lắp ráp và tháo dỡ NPC phụ thuộc vào chu kỳ tế bào, tổ chức không gian của phức hợp Y trong khung lỗ, và các vai trò kép tiềm năng của SEH1 tại màng nhân và kinetochore phân bào. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 cho phép nghiên cứu cơ chế về kiến trúc và động học của lỗ nhân dưới điều kiện biểu hiện phù hợp với sinh lý.

Organism Con người**Tissue** Xương**Disease** U xương**Metastatic site** Vị trí khối u nguyên phát (xương)**Applications** Sinh học phức hợp Y/phức hợp NUP107-160; vai trò của SEH1 trong quá trình lắp ráp khung NPC; các thành phần NPC liên quan đến kinetochore; tỷ lệ thành phần của NPC; phương pháp đánh dấu SNAP pulse-chase; kính hiển vi siêu phân giải; quá trình hình thành NPC; quá trình phân giải và tái lắp ráp NPC trong giai đoạn mitosis**Đặc điểm****Age** 15 năm**Gender** Nữ**Ethnicity** Người da trắng**Morphology** Tương tự biểu mô

Tế bào U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664**Cell type** Tế bào biểu mô (u xương ác tính)**Growth properties** Người tuân thủ**Dữ liệu quy định****Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Số catalog của Cytion: 300664)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Chưa được chỉ định (dòng tế bào U2OS biến đổi bằng CRISPR; dòng tế bào gốc U2OS CVCL_0042)**Depositor** Phòng thí nghiệm Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Dòng tế bào ung thư xương người này (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) chứa một sự kết hợp SNAPf-SEH1 được tạo ra bởi CRISPR, cho phép đánh dấu chọn lọc protein SEH1 nucleoporin. Sự biến đổi này được duy trì ổn định. Phân loại này chỉ áp dụng trong phạm vi Đức và có thể khác nhau ở các khu vực khác.**Dữ liệu sinh học phân tử****Protein expression** SEH1, SNAPf-tag**Xử lý****Culture Medium** McCoy's 5a, chứa: 3,0 g/L glucose, chứa: glutamine ổn định, chứa: 2,0 mM natri pyruvate, chứa: 2,2 g/L NaHCO₃ (Số hiệu sản phẩm Cytion 820200a)**Supplements** Bổ sung vào môi trường nuôi cấy 10% huyết thanh bò (FBS), 3,0 g/L glucose, glutamine ổn định, 2,0 mM natri pyruvate, 2,2 g/L NaHCO₃, 1% NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** khoảng 24 đến 36 giờ

Tế bào U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Subculturing Loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ khỏi các tế bào bám dính và rửa chúng bằng PBS không chứa canxi và magiê. Đối với bình T25, sử dụng 3-5 ml PBS, và đối với bình T75, sử dụng 5-10 ml. Sau đó, phủ hoàn toàn các tế bào bằng Accutase, sử dụng 1-2 ml cho bình T25 và 2,5 ml cho bình T75. Để tế bào ủ ở nhiệt độ phòng trong 8-10 phút để tách chúng ra. Sau khi ủ, nhẹ nhàng trộn tế bào với 10 ml môi trường để tái phân tán chúng, sau đó ly tâm ở 300xg trong 3 phút. Loại bỏ dịch trên, tái phân tán tế bào trong môi trường tươi và chuyển chúng vào các bình mới đã chứa môi trường tươi.

Split ratio 1 đến 3

Seeding density 1 đến 3×10^4 tế bào/cm²

Fluid renewal 2 đến 3 lần mỗi tuần

Freeze medium Như một môi trường bảo quản đông lạnh, chúng tôi sử dụng môi trường tăng trưởng hoàn chỉnh (bao gồm FBS) + 10% DMSO để đảm bảo độ sống sau khi rã đông, hoặc CM-1 (mã sản phẩm Cytion 800100), bao gồm các chất bảo vệ thẩm thấu và chất ổn định chuyển hóa được tối ưu hóa để nâng cao khả năng phục hồi và giảm stress do đông lạnh gây ra.

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

1. Xác nhận rằng ống nghiệm vẫn được đông lạnh sâu khi giao hàng, vì tế bào được vận chuyển trên đá khô để duy trì nhiệt độ tối ưu trong quá trình vận chuyển.
2. Khi nhận hàng, hãy bảo quản ống nghiệm đông lạnh ngay lập tức ở nhiệt độ dưới -150°C để đảm bảo tính toàn vẹn của tế bào, hoặc tiến hành bước 3 nếu cần nuôi cấy ngay lập tức.
3. Để nuôi cấy ngay lập tức, hãy rã đông ống nghiệm nhanh chóng bằng cách ngâm nó trong bồn nước 37°C với nước sạch và chất kháng khuẩn, khuấy nhẹ trong 40-60 giây cho đến khi còn lại một khối băng nhỏ.
4. Thực hiện tất cả các bước tiếp theo trong điều kiện vô trùng trong tủ hút khí, khử trùng ống cryovial bằng cồn 70% trước khi mở.
5. Mở ống đã khử trùng một cách cẩn thận và chuyển hỗn hợp tế bào vào ống ly tâm 15 ml chứa 8 ml môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ phòng, khuấy nhẹ.
6. Ly tâm hỗn hợp ở $300 \times g$ trong 3 phút để tách tế bào và cẩn thận loại bỏ dịch siêu âm chứa môi trường đông lạnh còn lại.
7. Nhẹ nhàng hòa tan lại khối tế bào trong 10 ml môi trường nuôi cấy tươi. Đối với tế bào bám dính, chia hỗn hợp vào hai bình nuôi cấy T25; đối với tế bào nuôi cấy lơ lửng, chuyển toàn bộ môi trường vào một bình T25 để thúc đẩy tương tác và phát triển tế bào hiệu quả.
8. Tuân thủ các quy trình nuôi cấy con được thiết lập để duy trì sự phát triển và bảo quản dòng tế bào, đảm bảo kết quả thí nghiệm đáng tin cậy.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , môi trường ẩm.

Flask Coating

Không có

**Freezing
Procedure**

Các dòng tế bào được bảo quản bằng phương pháp đông lạnh được vận chuyển trên đá khô trong bao bì cách nhiệt đã được kiểm định, kèm theo lượng chất làm lạnh đủ để duy trì nhiệt độ khoảng -78°C trong suốt quá trình vận chuyển. Khi nhận hàng, hãy kiểm tra ngay lập tức bao bì và chuyển các ống nghiệm sang nơi lưu trữ phù hợp mà không chậm trễ.

**Shipping
Conditions**

Các dòng tế bào được bảo quản bằng phương pháp đông lạnh được vận chuyển trên đá khô trong bao bì cách nhiệt đã được kiểm định, kèm theo lượng chất làm lạnh đủ để duy trì nhiệt độ khoảng -78°C trong suốt quá trình vận chuyển. Khi nhận hàng, hãy kiểm tra ngay lập tức bao bì và chuyển các ống nghiệm sang nơi lưu trữ phù hợp mà không chậm trễ.

Tế bào U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664

Storage Conditions

Để bảo quản lâu dài, hãy đặt ống nghiệm vào nitơ lỏng ở pha hơi ở nhiệt độ khoảng -150 đến -196 °C. Việc bảo quản ở -80 °C chỉ được chấp nhận như một bước trung gian ngắn hạn trước khi chuyển sang nitơ lỏng.

Kiểm soát chất lượng / Hồ sơ di truyền / HLA

Sterility

Sự nhiễm khuẩn Mycoplasma được loại trừ bằng cả các phương pháp xét nghiệm dựa trên PCR và các phương pháp phát hiện Mycoplasma dựa trên phát quang.

Để đảm bảo không có nhiễm khuẩn vi khuẩn, nấm hoặc men, các mẫu nuôi cấy tế bào được kiểm tra trực quan hàng ngày.