

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664**Generel information****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 er en genomredigeret human osteosarkomcellelinje afledt af U2OS-celler, hvor det endogene SEH1L (SEH1)-gen er blevet modificeret ved hjælp af CRISPR/Cas9-teknologi til at kode for et in-frame SNAPf-tag. SEH1 er en komponent i Y-komplekset (også kendt som NUP107-160-komplekset), et centralt strukturelt modul i det nukleare porekompleks (NPC), der bidrager til porestrukturens samling og stabilitet. Ved at indsætte SNAPf-kodningssekvensen på det endogene locus udtrykkes det mærkede SEH1-protein under naturlig regulering, hvilket bevarer de fysiologiske ekspressionsniveauer og minimerer forstyrrelser i det nukleare porekompleks' sammensætning.

SNAPf-tagget er en konstrueret, hurtigt reagerende variant af SNAP-tagget, der kovalent binder benzyguanin-konjugerede substrater, hvilket muliggør selektiv og stabil fluorescerende mærkning i levende eller fiksede celler. I U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler lokaliseres fusionsproteinet til kernehinden i et punktformet mønster, der er karakteristisk for NPC-fordelingen. Da mærkningen finder sted på endogene proteinniveauer, er dette system velegnet til kvantitativ fluorescensmikroskopi, superopløsningsbilleddannelse og enkeltpartikelsporingsanalyser med det formål at dissekere NPC-organisering og stoichiometri. Den flade morfologi og de store kerner i U2OS-celler letter yderligere højopløsningsvisualisering af kernehindestrukturer.

SEH1 deltager i NPC-biogenese og har også været impliceret i kinetokor-associerede processer under mitose. Derfor udgør denne cellelinje en robust platform for undersøgelse af cellecyklusafhængig NPC-samling og -adskillelse, rumlig organisering af Y-komplekset inden for porestrukturen og SEH1's potentielle dobbeltrolle i kernehinden og mitotiske kinetokorer. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 muliggør mekanistiske studier af kerneporearkitektur og -dynamik under fysiologisk relevante ekspressionsbetingelser.

Organism Menneske**Tissue** Knogle**Disease** Osteosarkom**Metastatic site** Primær tumorlokalisering (knogle)**Applications** Y-komplekset/NUP107-160-kompleksets biologi; SEH1 i opbygningen af NPC-skelettet; kinetokor-associerede NPC-komponenter; NPC-stoichiometri; SNAP-pulse-chase-mærkning; superopløsningsmikroskopi; NPC-biogenese; mitotisk nedbrydning og genopbygning af NPC**Karakteristika****Age** 15 år**Gender** Kvinde**Ethnicity** Kaukasisk

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664**Morphology** Epitel-lignende**Cell type** Epithelceller (osteosarkom)**Growth properties** Vedhæftende**Regulatoriske data****Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytion katalognummer 300664)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Ikke tildelt (CRISPR-modificeret U2OS-derivat; forælder-U2OS CVCL_0042)**Depositor** Ellenberg-laboratoriet (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Denne humane osteosarkomcellelinje (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) indeholder en CRISPR-medieret SNAPf-SEH1-fusion, der muliggør selektiv mærkning af SEH1-nukleoporinet. Modifikationen er stabilt til stede. Denne klassificering gælder kun i Tyskland og kan variere andre steder.**Biomolekylære data****Protein expression** SEH1, SNAPf-tag**Håndtering****Culture Medium** McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glukose, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (Cytion artikelnummer 820200a)**Supplements** Suppler mediet med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO₃, 1 % NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** ca. 24 til 36 timer

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664

Subculturing Fjern det gamle medium fra de klæbende celler, og vask dem med PBS, der ikke indeholder calcium og magnesium. Brug 3-5 ml PBS til T25-kolber og 5-10 ml til T75-kolber. Dæk derefter cellerne helt med Accutase, brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber. Lad cellerne inkubere ved stuetemperatur i 8-10 minutter for at løsne dem. Efter inkubationen blandes cellerne forsigtigt med 10 ml medium for at resuspendere dem, og centrifugeres derefter ved 300xg i 3 minutter. Kassér supernatanten, resuspender cellerne i frisk medium, og overfør dem til nye kolber, der allerede indeholder frisk medium.

Split ratio 1 til 3

Seeding density 1 til 3×10^4 celler/cm²

Fluid renewal 2 til 3 gange om ugen

Freeze medium Som kryopræservationsmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmoreskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryo-induceret stress.

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664

Thawing and Culturing Cells

1. Bekræft, at hætteglasset forbliver dybfrosset ved levering, da cellerne sendes på tøris for at opretholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved modtagelsen skal du enten straks opbevare kryohætteglasset ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at sikre, at cellernes integritet bevares, eller gå videre til trin 3, hvis øjeblikkelig dyrkning er påkrævet.
3. Ved øjeblikkelig dyrkning optøs hætteglasset hurtigt ved at nedsænke det i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vandbad med rent vand og et antimikrobielt middel og røre forsigtigt i 40-60 sekunder, indtil der kun er en lille isklump tilbage.
4. Udfør alle efterfølgende trin under sterile forhold i en flowhætte, og desinficer kryovialet med 70 % ethanol, før det åbnes.
5. Åbn forsigtigt det desinficerede hætteglas, og overfør cellesuspensionen til et 15 ml centrifugerør, der indeholder 8 ml kulturmedium ved stuetemperatur, og bland forsigtigt.
6. Centrifuger blandingen ved $300 \times g$ i 3 minutter for at adskille cellerne, og kassér omhyggeligt supernatanten, der indeholder resterende frysemedium.
7. Resuspender forsigtigt cellepelleten i 10 ml frisk dyrkningsmedium. For klæbende celler deles suspensionen mellem to T25-kulturkolber; for suspensionskulturer overføres alt mediet til en T25-kolbe for at fremme effektiv celleinteraktion og -vækst.
8. Overhold etablerede subkulturprotokoller for fortsat vækst og vedligeholdelse af cellelinjen, hvilket sikrer pålidelige eksperimentelle resultater.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , befugtet atmosfære.

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

Shipping Conditions

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664

Storage Conditions

For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

Kvalitetskontrol / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder.

For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.