

**U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-Zellen | 300664**

**Allgemeine Informationen**

**Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 ist eine genomeditierte humane Osteosarkom-Zelllinie, die aus U2OS-Zellen gewonnen wurde, in denen das endogene SEH1L (SEH1)-Gen mithilfe der CRISPR/Cas9-Technologie modifiziert wurde, um ein In-Frame-SNAPf-Tag zu kodieren. SEH1 ist ein Bestandteil des Y-Komplexes (auch bekannt als NUP107-160-Komplex), einem zentralen Strukturmodul des Kernporenkomplexes (NPC), das zur Bildung und Stabilität des Porengerüsts beiträgt. Durch Einfügen der SNAPf-Kodierungssequenz an der endogenen Stelle wird das markierte SEH1-Protein unter nativer regulatorischer Kontrolle exprimiert, wodurch die physiologischen Expressionsniveaus erhalten bleiben und Störungen der Kernporenzusammensetzung minimiert werden.

Das SNAPf-Tag ist eine künstlich hergestellte, schnell reagierende Variante des SNAP-Tags, das kovalent an Benzylguanin-konjugierte Substrate bindet und eine selektive und stabile Fluoreszenzmarkierung in lebenden oder fixierten Zellen ermöglicht. In U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-Zellen lokalisiert sich das Fusionsprotein in einem für die NPC-Verteilung charakteristischen punktförmigen Muster an der Kernhülle. Da die Markierung auf endogener Proteinebene erfolgt, eignet sich dieses System gut für quantitative Fluoreszenzmikroskopie, Superauflösungsbildgebung und Einzelpartikel-Tracking-Analysen, die darauf abzielen, die NPC-Organisation und -Stöchiometrie zu untersuchen. Die flache Morphologie und die großen Kerne der U2OS-Zellen erleichtern zusätzlich die hochauflösende Visualisierung der Kernhüllenstrukturen.

SEH1 ist an der NPC-Biogenese beteiligt und spielt auch eine Rolle bei kinetochorassoziierten Prozessen während der Mitose. Dementsprechend bietet diese Zelllinie eine robuste Plattform für die Untersuchung der zellzyklusabhängigen NPC-Assemblierung und -Disassemblierung, der räumlichen Organisation des Y-Komplexes innerhalb des Porengerüsts und der potenziellen Doppelrolle von SEH1 an der Kernhülle und den mitotischen Kinetochoren. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 ermöglicht mechanistische Untersuchungen der Architektur und Dynamik von Kernporen unter physiologisch relevanten Expressionsbedingungen.

**Organism** Menschen

**Tissue** Knochen

**Disease** Osteosarkom

**Metastatic site** Primärtumorlokalisation (Knochen)

**Applications** Biologie des Y-Komplexes/NUP107-160-Komplexes; SEH1 beim Aufbau des NPC-Gerüsts; kinetochorassoziierte NPC-Komponenten; NPC-Stöchiometrie; SNAP-Pulse-Chase-Markierung; Superauflösungsmikroskopie; NPC-Biogenese; Abbau und Wiederaufbau des NPC während der Mitose

**Merkmale**

**Age** 15 Jahre

**Gender** Weiblich

**U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-Zellen | 300664**

|                          |                             |
|--------------------------|-----------------------------|
| <b>Ethnicity</b>         | Kaukasisch                  |
| <b>Morphology</b>        | Epithelähnlich              |
| <b>Cell type</b>         | Epithelzellen (Osteosarkom) |
| <b>Growth properties</b> | Adhärent                    |

**Regulatorische Daten**

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>Citation</b>             | U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytion-Katalognummer 300664)  |
| <b>Biosafety level</b>      | 1   |
| <b>NCBI_TaxID</b>           | 9606  |
| <b>CellosaurusAccession</b> | Nicht zugeordnet (CRISPR-modifiziertes U2OS-Derivat; Elternzelllinie U2OS CVCL_0042)  |
| <b>Depositor</b>            | Das Ellenberg-Labor (EMBL)  |
| <b>GMO Status</b>           | GMO-S1: Diese menschliche Osteosarkom-Zelllinie (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) enthält eine CRISPR-vermittelte SNAPf-SEH1-Fusion, die eine selektive Markierung des Nukleoporins SEH1 ermöglicht. Die Modifikation ist stabil vorhanden. Diese Klassifizierung gilt nur innerhalb Deutschlands und kann in anderen Ländern abweichen. |

**Biomolekulare Daten**

|                           |                 |
|---------------------------|-----------------|
| <b>Protein expression</b> | SEH1, SNAPf-Tag |
|---------------------------|-----------------|

**Handhabung**

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>Culture Medium</b>       | McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glucose, w: stabiles Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> (Cytion-Artikelnummer 820200a) |
| <b>Supplements</b>          | Ergänzen Sie das Medium mit 10% FBS, 3,0 g/L Glucose, stabilem Glutamin, 2,0 mM Natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 1% NEAA         |
| <b>Dissociation Reagent</b> | Accutase   |

## U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-Zellen | 300664

**Doubling time** ca. 24 bis 36 Stunden

**Subculturing** Entfernen Sie das alte Medium von den adhären Zellen und waschen Sie sie mit PBS, das kein Kalzium und Magnesium enthält. Für T25-Kolben 3-5 ml PBS und für T75-Kolben 5-10 ml verwenden. Anschließend werden die Zellen vollständig mit Accutase bedeckt, wobei 1-2 ml für T25-Kolben und 2,5 ml für T75-Kolben verwendet werden. Lassen Sie die Zellen 8-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, um sie abzulösen. Nach der Inkubation mischen Sie die Zellen vorsichtig mit 10 ml Medium, um sie zu resuspendieren, und zentrifugieren sie dann 3 Minuten lang bei 300xg. Den Überstand verwerfen, die Zellen in frischem Medium resuspendieren und in neue Kolben überführen, die bereits frisches Medium enthalten.

**Split ratio** 1 bis 3

**Seeding density** 1 bis  $3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal** 2 bis 3 Mal pro Woche

**Freeze medium** Als Kryokonservierungsmedium verwenden wir komplettes Wachstumsmedium (einschließlich FBS) + 10 % DMSO für eine angemessene Lebensfähigkeit nach dem Auftauen oder CM-1 (Cytion Katalognummer 800100), das optimierte Osmoprotektoren und Stoffwechselstabilisatoren enthält, um die Erholung zu verbessern und kryoinduzierten Stress zu reduzieren.

## U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-Zellen | 300664

### Thawing and Culturing Cells

1. Vergewissern Sie sich, dass das Fläschchen bei der Lieferung tiefgefroren ist, da die Zellen auf Trockeneis versandt werden, um während des Transports optimale Temperaturen zu erhalten.
2. Lagern Sie das Kryofläschchen nach Erhalt entweder sofort bei Temperaturen unter  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , um die Unversehrtheit der Zellen zu gewährleisten, oder fahren Sie mit Schritt 3 fort, wenn eine sofortige Kultivierung erforderlich ist.
3. Für eine sofortige Kultivierung tauen Sie das Fläschchen schnell auf, indem Sie es in ein  $37^{\circ}\text{C}$  warmes Wasserbad mit sauberem Wasser und einem antimikrobiellen Mittel eintauchen und 40-60 Sekunden lang vorsichtig schütteln, bis ein kleiner Eisklumpen zurückbleibt.
4. Führen Sie alle weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen in einer Abzugshaube durch und desinfizieren Sie das Kryo-Fläschchen vor dem Öffnen mit 70%igem Ethanol.
5. Das desinfizierte Fläschchen vorsichtig öffnen und die Zellsuspension unter vorsichtigem Mischen in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 8 ml Kulturmedium bei Raumtemperatur überführen.
6. Zentrifugieren Sie das Gemisch 3 Minuten lang bei  $300 \times g$ , um die Zellen abzutrennen, und werfen Sie den Überstand mit dem restlichen Gefriermedium vorsichtig.
7. Das Zellpellet vorsichtig in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendieren. Bei adhärennten Zellen die Suspension auf zwei T25-Kulturflaschen aufteilen; bei Suspensionskulturen das gesamte Medium in eine T25-Flasche überführen, um eine effektive Zellinteraktion und ein effektives Wachstum zu fördern.
8. Halten Sie sich an die festgelegten Subkulturprotokolle, um ein kontinuierliches Wachstum und die Aufrechterhaltung der Zelllinie zu gewährleisten und zuverlässige Versuchsergebnisse zu erzielen.

### Incubation Atmosphere

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , befeuchtete Atmosphäre.

### Flask Coating

Keine

### Freezing Procedure

Kryokonservierte Zelllinien werden auf Trockeneis in einer validierten, isolierten Verpackung mit ausreichend Kühlmittel versandt, um während des gesamten Transports eine Temperatur von etwa  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufrechtzuerhalten. Prüfen Sie den Behälter bei Erhalt sofort und bringen Sie die Fläschchen unverzüglich in ein geeignetes Lager.

## U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-Zellen | 300664

### Shipping Conditions

Kryokonservierte Zelllinien werden auf Trockeneis in einer validierten, isolierten Verpackung mit ausreichend Kühlmittel versandt, um während des gesamten Transports eine Temperatur von etwa -78 °C aufrechtzuerhalten. Prüfen Sie den Behälter bei Erhalt sofort und bringen Sie die Fläschchen unverzüglich in ein geeignetes Lager.

### Storage Conditions

Zur Langzeitkonservierung werden die Fläschchen in flüssigem Stickstoff bei etwa -150 bis -196 °C gelagert. Eine Lagerung bei -80 °C ist nur als kurzer Zwischenschritt vor der Überführung in flüssigen Stickstoff akzeptabel.

## Qualitätskontrolle / Genetisches Profil / HLA

### Sterility

Eine Kontamination mit Mykoplasmen wird sowohl durch PCR-basierte Assays als auch durch lumineszenzbasierte Mykoplasmen-Nachweisverfahren ausgeschlossen.

Um sicherzustellen, dass keine Kontamination mit Bakterien, Pilzen oder Hefen vorliegt, werden die Zellkulturen täglich visuell überprüft.