

**Células U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664****Información general****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 es una línea celular de osteosarcoma humano editada genómicamente derivada de células U2OS en la que se ha modificado el gen SEH1L (SEH1) endógeno mediante la tecnología CRISPR/Cas9 para codificar una etiqueta SNAPf en marco. SEH1 es un componente del complejo Y (también conocido como complejo NUP107-160), un módulo estructural central del complejo de poros nucleares (NPC) que contribuye al ensamblaje y la estabilidad del andamio de los poros. Al insertar la secuencia codificante SNAPf en el locus endógeno, la proteína SEH1 etiquetada se expresa bajo control regulador nativo, lo que preserva los niveles de expresión fisiológicos y minimiza las perturbaciones en la composición de los poros nucleares.

La etiqueta SNAPf es una variante modificada genéticamente y de rápida reacción de la etiqueta SNAP que se une covalentemente a sustratos conjugados con bencilguanina, lo que permite un marcaje fluorescente selectivo y estable en células vivas o fijadas. En las células U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1, la proteína de fusión se localiza en la envoltura nuclear con un patrón punteado característico de la distribución del NPC. Dado que el marcaje se produce a niveles de proteína endógena, este sistema es muy adecuado para la microscopía de fluorescencia cuantitativa, la obtención de imágenes de superresolución y los análisis de seguimiento de partículas individuales destinados a diseccionar la organización y la estequiometría de los NPC. La morfología plana y los núcleos grandes de las células U2OS facilitan aún más la visualización de alta resolución de las estructuras de la envoltura nuclear.

SEH1 participa en la biogénesis de los NPC y también se ha implicado en procesos asociados al cinetocoro durante la mitosis. En consecuencia, esta línea celular proporciona una plataforma sólida para investigar el ensamblaje y desensamblaje de los NPC dependientes del ciclo celular, la organización espacial del complejo Y dentro del andamio del poro y las posibles funciones duales de SEH1 en la envoltura nuclear y los cinetocoros mitóticos. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 permite realizar estudios mecánicos de la arquitectura y la dinámica de los poros nucleares en condiciones de expresión fisiológicamente relevantes.

**Organism** Humano**Tissue** Hueso**Disease** Osteosarcoma**Metastatic site** Localización del tumor primario (hueso)**Applications** Biología del complejo Y/NUP107-160; papel de SEH1 en el ensamblaje del andamio del NPC; componentes del NPC asociados al cinetocoro; estequiometría del NPC; marcaje SNAP por pulso-persecución; microscopía de superresolución; biogénesis del NPC; desmontaje y reensamblaje mitótico del NPC**Características****Age** 15 años**Gender** Mujer

**Células U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 | 300664****Ethnicity** Caucásico**Morphology** De tipo epitelial**Cell type** Células epiteliales (osteosarcoma)**Growth properties** Adherente**Datos reglamentarios****Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (número de catálogo de Cytion 300664)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Sin asignar (derivado de U2OS modificado con CRISPR; U2OS parental CVCL\_0042)**Depositor** Laboratorio Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Esta línea celular de osteosarcoma humano (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) contiene una fusión SNAPf-SEH1 mediada por CRISPR que permite el marcaje selectivo de la nucleoporina SEH1. La modificación está presente de forma estable. Esta clasificación sólo se aplica en Alemania y puede diferir en otros países.**Datos biomoleculares****Protein expression** SEH1, SNAPf-tag**Manejo de****Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucosa, w: Glutamina estable, w: 2,0 mM Piruvato sódico, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (número de artículo de Cytion 820200a)**Supplements** Suplementar el medio con 10% FBS, 3,0 g/L de Glucosa, Glutamina estable, 2,0 mM de Piruvato sódico, 2,2 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 1% de NEAA**Dissociation Reagent** Accutase

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

**Doubling time**      entre 24 y 36 horas, aproximadamente

**Subculturing**      Retire el medio antiguo de las células adheridas y lávelas con PBS que carezca de calcio y magnesio. Para matraces T25, utilice 3-5 ml de PBS, y para matraces T75, utilice 5-10 ml. A continuación, cubra completamente las células con Accutase, utilizando 1-2 ml para matraces T25 y 2,5 ml para matraces T75. Deje incubar las células a temperatura ambiente durante 8-10 minutos para desprenderlas. Tras la incubación, mezclar suavemente las células con 10 ml de medio para resuspenderlas y, a continuación, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Desechar el sobrenadante, resuspender las células en medio fresco y transferirlas a nuevos matraces que ya contengan medio fresco.

**Split ratio**      Del 1 al 3

**Seeding density**      De 1 a  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal**      de 2 a 3 veces por semana

**Freeze medium**      Como medio de criopreservación, utilizamos el medio de crecimiento completo (incluido FBS) + 10% DMSO para una viabilidad adecuada tras la descongelación, o CM-1 (número de catálogo 800100 de Cytion), que incluye osmoprotectores optimizados y estabilizadores metabólicos para mejorar la recuperación y reducir el estrés crioinducido.

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

### Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que el vial permanece profundamente congelado en el momento de la entrega, ya que las células se envían en hielo seco para mantener temperaturas óptimas durante el transporte.
2. Tras la recepción, almacene el criovial inmediatamente a temperaturas inferiores a  $-150^{\circ}\text{C}$  para garantizar la conservación de la integridad celular, o proceda al paso 3 si se requiere el cultivo inmediato.
3. Para el cultivo inmediato, descongele rápidamente el vial sumergiéndolo en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  con agua limpia y un agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos hasta que quede un pequeño grumo de hielo.
4. Realice todos los pasos siguientes en condiciones estériles en una campana de flujo, desinfectando el criovial con etanol al 70% antes de abrirlo.
5. Abrir con cuidado el vial desinfectado y transferir la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15 ml que contenga 8 ml de medio de cultivo a temperatura ambiente, mezclando suavemente.
6. Centrifugar la mezcla a  $300 \times g$  durante 3 minutos para separar las células y desechar cuidadosamente el sobrenadante que contiene medio de congelación residual.
7. Resuspender suavemente el sedimento celular en 10 ml de medio de cultivo fresco. Para las células adherentes, dividir la suspensión entre dos matraces de cultivo T25; para los cultivos en suspensión, transferir todo el medio a un matraz T25 para promover la interacción y el crecimiento celular efectivos.
8. Siga los protocolos de subcultivo establecidos para el crecimiento y mantenimiento continuos de la línea celular, garantizando resultados experimentales fiables.

### Incubation Atmosphere

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , atmósfera humidificada.

### Flask Coating

Ninguno

### Freezing Procedure

Las líneas celulares crioconservadas se envían en hielo seco en envases validados y aislados con suficiente refrigerante para mantener aproximadamente  $-78^{\circ}\text{C}$  durante el tránsito. A la recepción, inspeccione el envase inmediatamente y transfiera los viales sin demora al almacenamiento adecuado.

### Shipping Conditions

Las líneas celulares crioconservadas se envían en hielo seco en envases validados y aislados con suficiente refrigerante para mantener aproximadamente  $-78^{\circ}\text{C}$  durante el tránsito. A la recepción, inspeccione el envase inmediatamente y transfiera los viales sin demora al almacenamiento adecuado.

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

### Storage Conditions

Para la conservación a largo plazo, coloque los viales en nitrógeno líquido en fase vapor a una temperatura aproximada de -150 a -196 °C. El almacenamiento a -80 °C sólo es aceptable como breve paso intermedio antes de la transferencia al nitrógeno líquido.

## Control de calidad / Perfil genético / HLA

### Sterility

La contaminación por micoplasma se excluye utilizando tanto ensayos basados en la PCR como métodos de detección de micoplasma basados en la luminiscencia.

Para garantizar la ausencia de contaminación bacteriana, fúngica o por levaduras, los cultivos celulares se someten a inspecciones visuales diarias.