

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

## Algemene informatie

## Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 is een genoombewerkte menselijke osteosarcoomcellijn afgeleid van U2OS-cellen waarin het endogene SEH1L (SEH1)-gen is gemodificeerd met behulp van CRISPR/Cas9-technologie om een in-frame SNAPf-tag te coderen. SEH1 is een onderdeel van het Y-complex (ook bekend als het NUP107-160-complex), een kernstructuurmodule van het nucleaire poriëcomplex (NPC) dat bijdraagt aan de assemblage en stabiliteit van het poriënraamwerk. Door de SNAPf-coderende sequentie in te voegen op de endogene locus, wordt het gemarkeerde SEH1-eiwit tot expressie gebracht onder natuurlijke regulerende controle, waardoor de fysiologische expressieniveaus behouden blijven en verstoringen van de samenstelling van de nucleaire poriën tot een minimum worden beperkt.

De SNAPf-tag is een gemanipuleerde, snel reagerende variant van de SNAP-tag die covalent bindt aan benzylguanine-geconjugeerde substraten, waardoor selectieve en stabiele fluorescerende labeling in levende of gefixeerde cellen mogelijk is. In U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-cellen lokaliseert het fusie-eiwit zich in de kernmembraan in een puntvormig patroon dat kenmerkend is voor de NPC-distributie. Omdat de labeling plaatsvindt op endogeen eiwitniveau, is dit systeem zeer geschikt voor kwantitatieve fluorescentiemicroscopie, superresolutiebeeldvorming en single-particle tracking-analyses gericht op het ontleden van de NPC-organisatie en stoichiometrie. De vlakke morfologie en grote kernen van U2OS-cellen vergemakkelijken bovendien de visualisatie met hoge resolutie van nucleaire envelopstructuren.

SEH1 neemt deel aan de biogenese van NPC's en is ook betrokken bij kinetochore-gerelateerde processen tijdens de mitose. Deze cellijn biedt dan ook een robuust platform voor onderzoek naar de celcyclusafhankelijke assemblage en desassemblage van NPC's, de ruimtelijke organisatie van het Y-complex binnen het poriënraamwerk en de mogelijke dubbele rol van SEH1 bij de kernmembraan en mitotische kinetochoren. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 maakt mechanistisch onderzoek mogelijk naar de architectuur en dynamica van nucleaire poriën onder fysiologisch relevante expressieomstandigheden.

**Organism** Mens

**Tissue** Bot

**Disease** Osteosarcoom

## Kenmerken

**Age** 15 jaar

**Gender** Vrouw

**Ethnicity** Kaukasisch

**Morphology** Epitheelachtig

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

**Growth properties**      Aanhangend

## Regelgevende gegevens

**Citation**      U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytion catalogusnummer 300664)

**Biosafety level**      1

**NCBI\_TaxID**      9606

**Depositor**      Het Ellenberg Lab (EMBL)

**GMO Status**      GMO-S1: Deze menselijke osteosarcomcellijn (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) bevat een CRISPR-gemedieerde SNAPf-SEH1-fusie die selectieve labeling van de SEH1-nucleoporeine mogelijk maakt. De modificatie is stabiel aanwezig. Deze classificatie is alleen van toepassing binnen Duitsland en kan elders afwijken.

## Biomoleculaire gegevens

**Protein expression**      SEH1, SNAPf-tag

## Omgaan met

**Culture Medium**      McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucose, w: stabiel Glutamine, w: 2,0 mM Natriumpyruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Cytion artikelnummer 820200a)

**Supplements**      Vul het medium aan met 10% FBS, 3,0 g/L Glucose, stabiele Glutamine, 2,0 mM Natriumpyruvaat, 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1% NEAA

**Dissociation Reagent**      Accutase

**Subculturing**      Verwijder het oude medium van de adherente cellen en was ze met PBS zonder calcium en magnesium. Gebruik voor T25-flesjes 3-5 ml PBS en voor T75-flesjes 5-10 ml. Bedek de cellen vervolgens volledig met Accutase, met 1-2 ml voor T25-flesjes en 2,5 ml voor T75-flesjes. Laat de cellen gedurende 8-10 minuten bij kamertemperatuur incuberen om ze los te maken. Na incubatie de cellen voorzichtig mengen met 10 ml medium om ze te resuspenden en vervolgens centrifugerend bij 300xg gedurende 3 minuten. Gooi het supernatant weg, resuspendeer de cellen in vers medium en breng ze over in nieuwe kolven die al vers medium bevatten.

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

### Freeze medium

Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimeidium (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

### Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij  $300 \times g$  om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

### Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , bevochtigde atmosfeer.

### Flask Coating

Geen

### Freezing Procedure

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

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

### Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer -78 °C te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

### Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

## Kwaliteitscontrole / Genetisch profiel / HLA

### Sterility

Mycoplasma-verontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasma-detectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.