

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664**Generell informasjon****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 er en genomredigert human osteosarkomcellelinje avledet fra U2OS-celler, hvor det endogene SEH1L (SEH1)-genet er modifisert ved hjelp av CRISPR/Cas9-teknologi for å kode for en in-frame SNAPf-tag. SEH1 er en komponent i Y-komplekset (også kjent som NUP107-160-komplekset), en sentral strukturell modul i kjerneporekomplekset (NPC) som bidrar til porestativets sammensetning og stabilitet. Ved å sette inn SNAPf-kodingssekvensen på det endogene lokuset, uttrykkes det merkede SEH1-proteinet under naturlig regulatorisk kontroll, noe som bevarer fysiologiske uttrykksnivåer og minimerer forstyrrelser i kjerneporekomposisjonen.

SNAPf-taggen er en konstruert, hurtig reagerende variant av SNAP-taggen som kovalent binder benzyguaninkonjugerte substrater, noe som muliggjør selektiv og stabil fluorescerende merking i levende eller fikserte celler. I U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler lokaliseres fusjonsproteinet til kjernemembranen i et punktformet mønster som er karakteristisk for NPC-fordelingen. Fordi merking skjer på endogene proteinnivåer, er dette systemet godt egnet for kvantitativ fluorescensmikroskopi, superoppløsningsavbildning og enkeltpartikkel-sporingsanalyser med sikte på å dissekere NPC-organisasjon og støkiometri. Den flate morfologien og de store kjernene til U2OS-celler letter ytterligere høyoppløselig visualisering av kjernemembranstrukturer.

SEH1 deltar i NPC-biogenese og har også vært involvert i kinetokorrelerte prosesser under mitose. Følgelig gir denne cellelinjen en robust plattform for å undersøke cellecyklusavhengig NPC-montering og demontering, romlig organisering av Y-komplekset innenfor porestrukturen og potensielle doble roller for SEH1 ved kjernemembranen og mitotiske kinetokorer. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 muliggjør mekanistiske studier av kjerneporenes arkitektur og dynamikk under fysiologisk relevante ekspresjonsforhold.

Organism Menneskelig**Tissue** Bein**Disease** Osteosarkom**Kjennetegn****Age** 15 år**Gender** Kvinne**Ethnicity** Kaukasisk**Morphology** Epitel-lignende**Growth properties** Vedhengende

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664

Regulatoriske data

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytion-katalognummer 300664)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Denne humane osteosarkomcellelinjen (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) inneholder en CRISPR-mediert SNAPf-SEH1-fusjon som muliggjør selektiv merking av SEH1-nukleoporinet. Modifikasjonen er stabilt til stede. Denne klassifiseringen gjelder bare i Tyskland og kan variere andre steder.

Biomolekylære data

Protein expression	SEH1, SNAPf-tag
---------------------------	-----------------

Håndtering

Culture Medium	McCoy's 5a, m: 3,0 g/L glukose, m: stabil glutamin, m: 2,0 mM natriumpyruvat, m: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytion artikkelnummer 820200a)
Supplements	Suppler med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1 % NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Fjern det gamle mediet fra de adherente cellene, og vask dem med PBS uten kalsium og magnesium. Bruk 3-5 ml PBS for T25-kolber og 5-10 ml for T75-kolber. Dekk deretter cellene helt med Accutase, med 1-2 ml for T25-kolber og 2,5 ml for T75-kolber. La cellene inkubere i romtemperatur i 8-10 minutter for å løsne dem. Etter inkubasjon blandes cellene forsiktig med 10 ml medium for å resuspendere dem, og sentrifuger deretter ved 300xg i 3 minutter. Kast supernatanten, resuspendere cellene i nytt medium, og overfør dem til nye kolber som allerede inneholder nytt medium.
Freeze medium	Som kryopreserveringsmedium bruker vi komplett vekstmedium (inkludert FBS) + 10 % DMSO for tilstrekkelig levedyktighet etter opptining, eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som inneholder optimaliserte osmobeskyttende midler og metabolske stabilisatorer for å øke utvinningen og redusere kryoundusert stress.

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

1. Kontroller at hetteglasset er dypfrost ved levering, ettersom cellene sendes på tørris for å opprettholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved mottak skal hetteglasset enten oppbevares umiddelbart ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for å sikre at cellenes integritet bevares, eller gå videre til trinn 3 hvis umiddelbar dyrking er nødvendig.
3. Ved umiddelbar dyrking tiner du hetteglasset raskt ved å senke det ned i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vannbad med rent vann og et antimikrobielt middel, og røre forsiktig i 40-60 sekunder til det blir en liten isklump igjen.
4. Utfør alle påfølgende trinn under sterile forhold i en strømningshette, og desinfiser kryoflasken med 70 % etanol før du åpner den.
5. Åpne det desinfiserte hetteglasset forsiktig, og overfør cellesuspensjonen til et 15 ml sentrifugerør som inneholder 8 ml romtemperert dyrkingsmedium, og bland forsiktig.
6. Sentrifuger blandingen ved $300 \times g$ i 3 minutter for å separere cellene, og kast supernatanten som inneholder rester av frysemedium, forsiktig.
7. Resuspender cellepelletten forsiktig i 10 ml nytt dyrkingsmedium. For adherente celler, del suspensjonen mellom to T25-kulturkolber; for suspensjonskulturer, overfør alt mediet til én T25-kolbe for å fremme effektiv celleinteraksjon og vekst.
8. Følg etablerte subkulturprotokoller for fortsatt vekst og vedlikehold av cellelinjen, noe som sikrer pålitelige eksperimentelle resultater.

**Incubation
Atmosphere**

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

Flask Coating

Ingen

**Freezing
Procedure**

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

**Shipping
Conditions**

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664

Storage Conditions

For langtidsoppbevaring plasseres hetteglassene i flytende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Lagring ved -80 °C er kun akseptabelt som et kort mellomtrinn før overføring til flytende nitrogen.

Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mykoplasma-kontaminering utelukkes ved hjelp av både PCR-baserte analyser og luminescensbaserte metoder for påvisning av mykoplasma.

For å sikre at det ikke finnes bakterie-, sopp- eller gjærkontaminering, blir cellekulturene inspisert visuelt hver dag.