

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

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 är en genredigerad human osteosarkomcellinje som härrör från U2OS-celler, där det endogena SEH1L-genet (SEH1) har modifierats med hjälp av CRISPR/Cas9-teknik för att koda för en in-frame SNAPf-tag. SEH1 är en komponent i Y-komplexet (även känt som NUP107-160-komplexet), en central strukturell modul i kärnporekomplexet (NPC) som bidrar till porstommens sammansättning och stabilitet. Genom att infoga den SNAPf-kodande sekvensen vid den endogena lokusen uttrycks det taggade SEH1-proteinet under naturlig regulatorisk kontroll, vilket bevarar fysiologiska expressionsnivåer och minimerar störningar i kärnporens sammansättning.

SNAPf-taggen är en konstruerad, snabbverkande variant av SNAP-taggen som kovalent binder bensylguaninkonjugerade substrat, vilket möjliggör selektiv och stabil fluorescerande märkning i levande eller fixerade celler. I U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler lokaliserar fusionsproteinet till kärnmembranet i ett punktmönster som är karakteristiskt för NPC-distribution. Eftersom märkningen sker på endogena proteinnivåer är detta system väl lämpat för kvantitativ fluorescensmikroskopi, superupplösningsavbildning och enkelpartikelspårningsanalyser som syftar till att dissekera NPC-organisationen och stökiometrin. Den plana morfologin och de stora kärnorna i U2OS-celler underlättar ytterligare högupplöst visualisering av kärnmembranstrukturer.

SEH1 deltar i NPC-biogenes och har också kopplats till kinetokorassocierade processer under mitosen. Följaktligen utgör denna cellinje en robust plattform för att undersöka cellcykelberoende NPC-montering och -demontering, den rumsliga organisationen av Y-komplexet inom porstommen och SEH1:s potentiella dubbla roller vid kärnmembranet och mitotiska kinetokorer. U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 möjliggör mekanistiska studier av kärnporearkitekturen och dynamiken under fysiologiskt relevanta expressionsförhållanden.

Organism Människan**Tissue** Ben**Disease** Osteosarkom**Egenskaper****Age** 15 år**Gender** Kvinna**Ethnicity** Kaukasisk**Morphology** Epitelliknande**Growth properties** Följsam

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664

Lagstadgade uppgifter

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (Cytion katalognummer 300664)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Denna mänskliga osteosarkomcellinje (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) innehåller en CRISPR-medierad SNAPf-SEH1-fusion som möjliggör selektiv märkning av SEH1-nukleoporinet. Modifikationen är stabilt närvarande. Denna klassificering gäller endast inom Tyskland och kan skilja sig åt på andra håll.

Biomolekylära data

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

Hantering

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glukos, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytion artikelnummer 820200a)
Supplements	Komplettera med 10% FBS, 3,0 g/L glukos, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Ta bort det gamla mediet från de adherenta cellerna och tvätta dem med PBS som saknar kalcium och magnesium. Använd 3-5 ml PBS för T25-kolvar och 5-10 ml för T75-kolvar. Täck sedan cellerna helt med Accutase, använd 1-2 ml för T25-kolvar och 2,5 ml för T75-kolvar. Låt cellerna inkubera i rumstemperatur i 8-10 minuter så att de lossnar. Efter inkubationen, blanda cellerna försiktigt med 10 ml medium för att resuspendera dem och centrifugera sedan vid 300xg i 3 minuter. Kassera supernatanten, resuspendera cellerna i färskt medium och överför dem till nya kolvar som redan innehåller färskt medium.
Freeze medium	Som kryokonservationsmedium använder vi komplett tillväxtmedium (inklusive FBS) + 10% DMSO för adekvat viabilitet efter upptining, eller CM-1 (Cytion katalognummer 800100), som innehåller optimerade osmoprotektanter och metaboliska stabilisatorer för att förbättra återhämtningen och minska kryoinducerad stress.

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

1. Bekräfta att flaskan är djupfryst vid leverans, eftersom cellerna skickas på torris för att bibehålla optimala temperaturer under transporten.
2. Vid mottagandet ska du antingen förvara kryovialen omedelbart vid temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ för att säkerställa att cellernas integritet bevaras, eller gå vidare till steg 3 om omedelbar odling krävs.
3. Vid omedelbar odling ska injektionsflaskan snabbt tinas genom att den sänks ned i ett $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vattenbad med rent vatten och ett antimikrobiellt medel och omrörs försiktigt i 40-60 sekunder tills en liten isklump återstår.
4. Utför alla efterföljande steg under sterila förhållanden i en flödeshuv och desinficera kryovialerna med 70 % etanol innan de öppnas.
5. Öppna försiktigt den desinficerade flaskan och överför cellsuspensionen till ett 15 ml centrifugrör som innehåller 8 ml rumstempererat odlingsmedium och blanda försiktigt.
6. Centrifugera blandningen vid $300 \times g$ i 3 minuter för att separera cellerna och kassera försiktigt supernatanten som innehåller resterande frysmedium.
7. Resuspendera försiktigt cellpelleten i 10 ml färskt odlingsmedium. För adherenta celler, fördela suspensionen mellan två T25-kulturkolv; för suspensionskulturer, överför allt medium till en T25-kolv för att främja effektiv cellinteraktion och tillväxt.
8. Följ fastställda subkulturprotokoll för fortsatt tillväxt och underhåll av cellinjen, vilket säkerställer tillförlitliga experimentella resultat.

**Incubation
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , befuktad atmosfär.

Flask Coating

Ingen

**Freezing
Procedure**

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

**Shipping
Conditions**

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1-celler | 300664

Storage Conditions

För långtidsförvaring, placera flaskorna i flytande kväve i ångfas vid ca -150 till -196 °C. Förvaring vid -80 °C är acceptabelt endast som ett kort mellanliggande steg innan överföring till flytande kväve.

Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mykoplasmakontaminering utesluts med hjälp av både PCR-baserade analyser och luminiscensbaserade metoder för mykoplasmadiagnostik.

För att säkerställa att det inte finns någon kontaminering av bakterier, svamp eller jäst utsätts cellkulturerna för dagliga visuella inspektioner.