U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1

300664

GENERAL INFORMATION

Description

A U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 é uma linhagem celular de osteossarcoma humano editada geneticamente, derivada de células U2OS, na qual o gene endógeno SEH1L (SEH1) foi modificado por meio da tecnologia CRISPR/Cas9 para codificar uma marca SNAPf em-quadro. O SEH1 é um componente do complexo Y (também conhecido como complexo NUP107-160), um módulo estrutural central do complexo de poros nucleares (NPC) que contribui para a montagem e a estabilidade da estrutura dos poros. Ao inserir a sequência codificadora do SNAPf no locus endógeno, a proteína SEH1 marcada é expressa sob controle regulatório nativo, preservando os níveis fisiológicos de expressão e minimizando perturbações na composição dos poros nucleares.
A etiqueta SNAPf é uma variante modificada e de reação rápida da etiqueta SNAP, que se liga covalentemente a substratos conjugados com benzilguanina, permitindo a marcação fluorescente seletiva e estável em células vivas ou fixadas. Nas células U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1, a proteína de fusão se localiza no envelope nuclear em um padrão pontilhado característico da distribuição do NPC. Como a marcação ocorre nos níveis de proteína endógena, esse sistema é adequado para microscopia de fluorescência quantitativa, imagens de super-resolução e análises de rastreamento de partículas individuais com o objetivo de dissecar a organização e a estequiometria dos NPCs. A morfologia achatada e os núcleos grandes das células U2OS facilitam ainda mais a visualização em alta resolução das estruturas do envelope nuclear.
A SEH1 participa da biogênese do NPC e também tem sido associada a processos relacionados ao cinetocoro durante a mitose. Assim, essa linhagem celular oferece uma plataforma robusta para investigar a montagem e desmontagem do NPC dependentes do ciclo celular, a organização espacial do complexo Y dentro da estrutura do poro e os possíveis papéis duplos da SEH1 no envelope nuclear e nos cinetócitos mitóticos. A U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 permite estudos mecanísticos da arquitetura e da dinâmica dos poros nucleares sob condições de expressão fisiologicamente relevantes.

Tissue	Osso
Disease	Osteossarcoma
Metastatic site	Localização do tumor primário (osso)

Applications

Biologia do complexo Y/complexo NUP107-160; SEH1 na montagem da estrutura do NPC; componentes do NPC associados ao cinetocoro; estequiometria do NPC; marcação por pulso-perseguição com SNAP; microscopia de super-resolução; biogênese do NPC; desmontagem e remontagem do NPC durante a mitose

CLASSIFICATION

Organism	Human
Sex	Female
Growth properties	Adherent
GMO status	GMO-S1

GMO status details

GMO-S1: This human osteosarcoma cell line (U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1) contains a CRISPR-mediated SNAPf-SEH1 fusion that allows selective labeling of the SEH1 nucleoporin. The modification is stably present. This classification applies only within Germany and may differ elsewhere.

Biosafety level	1

CHARACTERISTICS

Morphology	De tipo epitelial
Cell type	Células epiteliais (osteossarcoma)
Doubling time	aproximadamente 24 a 36 horas

IDENTIFIERS

Citation

U2OS-CRISPR-SNAPf-SEH1 (número de catálogo da Cytion 300664)

NCBI TaxID	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Depositor	Laboratório Ellenberg (EMBL)

EXPRESSION AND SUSCEPTIBILITY

Protein expression

SEH1, SNAPf-tag

HANDLING AND CULTURE

Culture medium

McCoys 5a, p: 3,0 g/L de glicose, p: glutamina estável, p: 2,0 mM de piruvato de sódio, p: 2,2 g/L de $NaHCO_3$ (número de artigo da Cytion 820200a)

Incubation atmosphere	37 °C, 5% de CO_2, atmosfera umidificada.

Supplements

Adicione ao meio 10% de FBS, 3,0 g/L de glicose, glutamina estável, 2,0 mM de piruvato de sódio, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 1% de NEAA

Dissociation reagent	Accutase

Subculturing

Remova o meio antigo das células aderentes e lave-as com PBS sem cálcio nem magnésio. Para frascos T25, use 3 a 5 ml de PBS; para frascos T75, use 5 a 10 ml. Em seguida, cubra as células completamente com Accutase, utilizando 1 a 2 ml para frascos T25 e 2,5 ml para frascos T75. Deixe as células incubarem à temperatura ambiente por 8 a 10 minutos para que se desprendam. Após a incubação, misture delicadamente as células com 10 ml de meio para ressuspender, depois centrifugue a 300xg por 3 minutos. Descarte o sobrenadante, ressuspenda as células em meio fresco e transfira-as para novos frascos que já contenham meio fresco.

Split ratio	1 a 3
Seeding density	1 a 3 × 10^4 células/cm^2
Fluid renewal	2 a 3 vezes por semana

Thawing and culturing

Confirm that the vial remains deeply frozen upon delivery, as cells are shipped on dry ice to maintain optimal temperatures during transit.
Upon receipt, either store the cryovial immediately at temperatures below -150°C to ensure the preservation of cellular integrity, or proceed to step 3 if immediate culturing is required.
For immediate culturing, swiftly thaw the vial by immersing it in a 37°C water bath with clean water and an antimicrobial agent, agitating gently for 40-60 seconds until a small ice clump remains.
Perform all subsequent steps under sterile conditions in a flow hood, disinfecting the cryovial with 70% ethanol before opening.
Carefully open the disinfected vial and transfer the cell suspension into a 15 ml centrifuge tube containing 8 ml of room-temperature culture medium, mixing gently.
Centrifuge the mixture at 300 x g for 3 minutes to separate the cells and carefully discard the supernatant containing residual freezing medium.
Gently resuspend the cell pellet in 10 ml of fresh culture medium. For adherent cells, divide the suspension between two T25 culture flasks; for suspension cultures, transfer all the medium into one T25 flask to promote effective cell interaction and growth.
Adhere to established subculture protocols for continued growth and maintenance of the cell line, ensuring reliable experimental outcomes.

QUALITY CONTROL AND CRYOPRESERVATION

Sterility

A contaminação por micoplasma é descartada por meio de ensaios baseados em PCR e de métodos de detecção de micoplasma baseados em luminescência.
Para garantir que não haja contaminação por bactérias, fungos ou leveduras, as culturas celulares são submetidas a inspeções visuais diárias.

Freeze medium	Como meio de criopreservação, utilizamos meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% de DMSO para garantir viabilidade adequada após o descongelamento, ou CM-1 (número de catálogo da Cytion 800100), que inclui osmoprotetores e estabilizadores metabólicos otimizados para melhorar a recuperação e reduzir o estresse induzido pela criopreservação.

Storage conditions

Para preservação a longo prazo, coloque os frascos em nitrogênio líquido em fase de vapor a uma temperatura entre aproximadamente −150 e −196 °C. O armazenamento a −80 °C é aceitável apenas como uma etapa intermediária de curta duração antes da transferência para o nitrogênio líquido.

Shipping conditions

As linhagens celulares criopreservadas são enviadas em gelo seco, em embalagens isoladas e validadas, com refrigerante suficiente para manter a temperatura em aproximadamente −78 °C durante todo o transporte. Ao receber a remessa, inspecione o recipiente imediatamente e transfira os frascos sem demora para o local de armazenamento adequado.

DONOR

Donor age	15 anos
Ethnicity	caucasiano

LEGAL AND SAFETY

Safety precautions

Ao planejar o armazenamento de um criotubo em nitrogênio líquido para descongelamento futuro, é obrigatório seguir medidas de segurança rigorosas. É essencial o uso de luvas e roupas de proteção adequadas, além do uso obrigatório de máscara facial ou óculos de proteção durante a transferência de amostras congeladas para dentro ou para fora do tanque de nitrogênio líquido. Isso visa mitigar o risco de ferimentos decorrentes de possíveis explosões dos criotubos durante a remoção, o que pode resultar na projeção de fragmentos pontiagudos.

Warranty

Na Cytion, garantimos a qualidade e a viabilidade de nossos produtos.
Garantimos que nossas células permanecerão viáveis no início da cultura por
60 dias após o envio de nossas instalações.
Asseguramos que todos os materiais estão em conformidade com as especificações descritas no
Certificado de Análise e/ou na Ficha Técnica do Produto.
Para obter todos os detalhes, consulte nossa
Declaração de Garantia.

Third-party agreements apply	Yes