

## U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-Zellen | 300666

### Allgemeine Informationen

#### Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 ist eine gentechnisch veränderte humane Osteosarkom-Zelllinie, die aus dem parentalen U2OS-Hintergrund stammt, in dem der endogene NUP133-Locus mittels CRISPR/Cas9-vermittelter Genom-Editierung modifiziert wurde, um ein C-terminales SNAPf-Tag zu kodieren. NUP133 ist eine Kernkomponente des Y-Komplexes (NUP107-160-Komplex), einem strukturellen Subkomplex, der für den Aufbau und die Aufrechterhaltung des Kernporenkomplexes (NPC) unerlässlich ist. Durch die Einführung der SNAPf-Kodierungssequenz im In-Frame am endogenen Locus wird das Fusionsprotein unter nativer regulatorischer Kontrolle exprimiert, wodurch die physiologischen Expressionsniveaus und die subzelluläre Lokalisierung erhalten bleiben.

Das SNAPf-Tag ist eine schnell markierende Variante des SNAP-Tags, einer künstlich hergestellten O6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase, die kovalent mit Benzylguanin-konjugierten Substraten reagiert. Dies ermöglicht eine hochspezifische und vielseitige Fluoreszenzmarkierung von Nup133 in lebenden oder fixierten Zellen unter Verwendung von zellpermeablen oder impermeablen SNAP-Substraten. In U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-Zellen lokalisiert sich das Fusionsprotein in einem für Kernporenkomplexe charakteristischen punktförmigen Muster an der Kernhülle. Da die Markierung am endogenen Locus erfolgt, werden die Stöchiometrie und Architektur der NPC nur minimal gestört, sodass sich dieses Modell für quantitative Superauflösungsmikroskopie, Einzelmolekülverfolgung und kinetische Analysen des NPC-Aufbaus und -Umsatzes eignet.

Diese Zelllinie bietet eine robuste Plattform für die Untersuchung des Kerntransports, der Dynamik des nukleozytoplasmatischen Transports, der NPC-Biogenese während der Interphase und des postmitotischen Kernumbaus sowie der strukturellen Organisation des Y-Komplexes innerhalb des Porengerüsts. Der U2OS-Hintergrund bietet eine flache Morphologie und große Kerne, was eine hochauflösende Bildgebung erleichtert. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-Zellen eignen sich besonders gut für Pulse-Chase-Markierungsexperimente, korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie sowie Mehrfarben-Bildgebungsverfahren in Kombination mit zusätzlichen endogen markierten Nukleoporinen oder Transportfaktoren.

**Organism** Menschen

**Tissue** Knochen

**Disease** Osteosarkom

### Merkmale

**Age** 15 Jahre

**Gender** Weiblich

**Ethnicity** Kaukasisch

**Morphology** Epithelähnlich

**U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-Zellen | 300666**

**Growth properties** Adhärent

**Regulatorische Daten**

**Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytion-Katalognummer 300666)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**Depositor** Das Ellenberg-Labor (EMBL)

**GMO Status** GMO-S1: Diese menschliche Osteosarkom-Zelllinie (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) enthält eine mit CRISPR eingeführte SNAPf-Nup133-Fusion, die eine Fluoreszenzmarkierung des Nukleoporins Nup133 ermöglicht. Das Insert ist stabil vorhanden. Diese Klassifizierung gilt nur innerhalb Deutschlands und kann in anderen Ländern abweichen.

**Biomolekulare Daten**

**Protein expression** Nup133, SNAPf-Tag

**Handhabung**

**Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucose, w: stabiles Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Cytion-Artikelnummer 820200a)

**Supplements** Ergänzen Sie das Medium mit 10% FBS, 3,0 g/L Glucose, stabilem Glutamin, 2,0 mM Natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1% NEAA

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Entfernen Sie das alte Medium von den adhären Zellen und waschen Sie sie mit PBS, das kein Kalzium und Magnesium enthält. Für T25-Kolben 3-5 ml PBS und für T75-Kolben 5-10 ml verwenden. Anschließend werden die Zellen vollständig mit Accutase bedeckt, wobei 1-2 ml für T25-Kolben und 2,5 ml für T75-Kolben verwendet werden. Lassen Sie die Zellen 8-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, um sie abzulösen. Nach der Inkubation mischen Sie die Zellen vorsichtig mit 10 ml Medium, um sie zu resuspendieren, und zentrifugieren sie dann 3 Minuten lang bei 300xg. Den Überstand verwerfen, die Zellen in frischem Medium resuspendieren und in neue Kolben überführen, die bereits frisches Medium enthalten.

## U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-Zellen | 300666

### Freeze medium

Als Kryokonservierungsmedium verwenden wir komplettes Wachstumsmedium (einschließlich FBS) + 10 % DMSO für eine angemessene Lebensfähigkeit nach dem Auftauen oder CM-1 (Cytion Katalognummer 800100), das optimierte Osmoprotektoren und Stoffwechselstabilisatoren enthält, um die Erholung zu verbessern und kryoinduzierten Stress zu reduzieren.

### Thawing and Culturing Cells

1. Vergewissern Sie sich, dass das Fläschchen bei der Lieferung tiefgefroren ist, da die Zellen auf Trockeneis versandt werden, um während des Transports optimale Temperaturen zu erhalten.
2. Lagern Sie das Kryofläschchen nach Erhalt entweder sofort bei Temperaturen unter  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , um die Unversehrtheit der Zellen zu gewährleisten, oder fahren Sie mit Schritt 3 fort, wenn eine sofortige Kultivierung erforderlich ist.
3. Für eine sofortige Kultivierung tauen Sie das Fläschchen schnell auf, indem Sie es in ein  $37^{\circ}\text{C}$  warmes Wasserbad mit sauberem Wasser und einem antimikrobiellen Mittel eintauchen und 40-60 Sekunden lang vorsichtig schütteln, bis ein kleiner Eisklumpen zurückbleibt.
4. Führen Sie alle weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen in einer Abzugshaube durch und desinfizieren Sie das Kryo-Fläschchen vor dem Öffnen mit 70%igem Ethanol.
5. Das desinfizierte Fläschchen vorsichtig öffnen und die Zellsuspension unter vorsichtigem Mischen in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 8 ml Kulturmedium bei Raumtemperatur überführen.
6. Zentrifugieren Sie das Gemisch 3 Minuten lang bei  $300 \times g$ , um die Zellen abzutrennen, und werfen Sie den Überstand mit dem restlichen Gefriermedium vorsichtig.
7. Das Zellpellet vorsichtig in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendieren. Bei adhärennten Zellen die Suspension auf zwei T25-Kulturflaschen aufteilen; bei Suspensionskulturen das gesamte Medium in eine T25-Flasche überführen, um eine effektive Zellinteraktion und ein effektives Wachstum zu fördern.
8. Halten Sie sich an die festgelegten Subkulturprotokolle, um ein kontinuierliches Wachstum und die Aufrechterhaltung der Zelllinie zu gewährleisten und zuverlässige Versuchsergebnisse zu erzielen.

### Incubation Atmosphere

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , befeuchtete Atmosphäre.

### Flask Coating

Keine

### Freezing Procedure

Kryokonservierte Zelllinien werden auf Trockeneis in einer validierten, isolierten Verpackung mit ausreichend Kühlmittel versandt, um während des gesamten Transports eine Temperatur von etwa  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufrechtzuerhalten. Prüfen Sie den Behälter bei Erhalt sofort und bringen Sie die Fläschchen unverzüglich in ein geeignetes Lager.

## U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-Zellen | 300666

### Shipping Conditions

Kryokonservierte Zelllinien werden auf Trockeneis in einer validierten, isolierten Verpackung mit ausreichend Kühlmittel versandt, um während des gesamten Transports eine Temperatur von etwa -78 °C aufrechtzuerhalten. Prüfen Sie den Behälter bei Erhalt sofort und bringen Sie die Fläschchen unverzüglich in ein geeignetes Lager.

### Storage Conditions

Zur Langzeitkonservierung werden die Fläschchen in flüssigem Stickstoff bei etwa -150 bis -196 °C gelagert. Eine Lagerung bei -80 °C ist nur als kurzer Zwischenschritt vor der Überführung in flüssigen Stickstoff akzeptabel.

## Qualitätskontrolle / Genetisches Profil / HLA

### Sterility

Eine Kontamination mit Mykoplasmen wird sowohl durch PCR-basierte Assays als auch durch lumineszenzbasierte Mykoplasmen-Nachweisverfahren ausgeschlossen.

Um sicherzustellen, dass keine Kontamination mit Bakterien, Pilzen oder Hefen vorliegt, werden die Zellkulturen täglich visuell überprüft.