

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

### Información general

#### Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 es una línea celular de osteosarcoma humano modificada genéticamente derivada del fondo parental U2OS en la que se ha modificado el locus NUP133 endógeno mediante la edición del genoma mediada por CRISPR/Cas9 para codificar una etiqueta SNAPf C-terminal. NUP133 es un componente central del complejo Y (complejo NUP107-160), un subcomplejo estructural esencial para el ensamblaje y mantenimiento del complejo de poros nucleares (NPC). Al introducir la secuencia codificante SNAPf en el locus endógeno, la proteína de fusión se expresa bajo control regulador nativo, conservando los niveles de expresión fisiológicos y la localización subcelular.

La etiqueta SNAPf es una variante de etiquetado rápido de la etiqueta SNAP, una O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa modificada genéticamente que reacciona covalentemente con sustratos conjugados con bencilguanina. Esto permite un etiquetado fluorescente altamente específico y versátil de Nup133 en células vivas o fijadas utilizando sustratos SNAP permeables o impermeables a las células. En las células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, la proteína de fusión se localiza en la envoltura nuclear con un patrón punteado característico de los complejos de poros nucleares. Dado que el etiquetado se produce en el locus endógeno, la estequiometría y la arquitectura de los NPC se ven mínimamente perturbadas, lo que hace que este modelo sea adecuado para la microscopía cuantitativa de superresolución, el seguimiento de moléculas individuales y los análisis cinéticos del ensamblaje y el recambio de los NPC.

Esta línea celular proporciona una plataforma sólida para estudiar el transporte nuclear, la dinámica del tráfico nucleocitoplasmático, la biogénesis de los NPC durante la interfase y el reensamblaje nuclear posmitótico, y la organización estructural del complejo Y dentro del andamio del poro. El fondo U2OS ofrece una morfología plana y núcleos grandes, lo que facilita la obtención de imágenes de alta resolución. Las células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 son especialmente adecuadas para experimentos de marcaje por pulso-persecución, microscopía óptica y electrónica correlativa y técnicas de imagen multicolor en combinación con nucleoporinas o factores de transporte marcados de forma endógena adicionales.

**Organism** Humano

**Tissue** Hueso

**Disease** Osteosarcoma

### Características

**Age** 15 años

**Gender** Mujer

**Ethnicity** Caucásico

**Morphology** De tipo epitelial

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

**Growth properties** Adherente

**Datos reglamentarios**

**Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (número de catálogo de Cytion 300666)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**Depositor** Laboratorio Ellenberg (EMBL)

**GMO Status** GMO-S1: Esta línea celular de osteosarcoma humano (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) contiene una fusión SNAPf-Nup133 introducida por CRISPR, que permite el marcaje fluorescente de la nucleoporina Nup133. El inserto está presente de forma estable. Esta clasificación sólo se aplica en Alemania y puede diferir en otros países.

**Datos biomoleculares**

**Protein expression** Nup133, SNAPf-tag

**Manejo de**

**Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucosa, w: Glutamina estable, w: 2,0 mM Piruvato sódico, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (número de artículo de Cytion 820200a)

**Supplements** Suplementar el medio con 10% FBS, 3,0 g/L de Glucosa, Glutamina estable, 2,0 mM de Piruvato sódico, 2,2 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 1% de NEAA

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Retire el medio antiguo de las células adheridas y lávelas con PBS que carezca de calcio y magnesio. Para matraces T25, utilice 3-5 ml de PBS, y para matraces T75, utilice 5-10 ml. A continuación, cubra completamente las células con Accutase, utilizando 1-2 ml para matraces T25 y 2,5 ml para matraces T75. Deje incubar las células a temperatura ambiente durante 8-10 minutos para desprenderlas. Tras la incubación, mezclar suavemente las células con 10 ml de medio para resuspenderlas y, a continuación, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Desechar el sobrenadante, resuspender las células en medio fresco y transferirlas a nuevos matraces que ya contengan medio fresco.

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

### Freeze medium

Como medio de criopreservación, utilizamos el medio de crecimiento completo (incluido FBS) + 10% DMSO para una viabilidad adecuada tras la descongelación, o CM-1 (número de catálogo 800100 de Cytion), que incluye osmoprotectores optimizados y estabilizadores metabólicos para mejorar la recuperación y reducir el estrés crioinducido.

### Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que el vial permanece profundamente congelado en el momento de la entrega, ya que las células se envían en hielo seco para mantener temperaturas óptimas durante el transporte.
2. Tras la recepción, almacene el criovial inmediatamente a temperaturas inferiores a -150°C para garantizar la conservación de la integridad celular, o proceda al paso 3 si se requiere el cultivo inmediato.
3. Para el cultivo inmediato, descongele rápidamente el vial sumergiéndolo en un baño de agua a 37°C con agua limpia y un agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos hasta que quede un pequeño grumo de hielo.
4. Realice todos los pasos siguientes en condiciones estériles en una campana de flujo, desinfectando el criovial con etanol al 70% antes de abrirlo.
5. Abrir con cuidado el vial desinfectado y transferir la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15 ml que contenga 8 ml de medio de cultivo a temperatura ambiente, mezclando suavemente.
6. Centrifugar la mezcla a 300 x g durante 3 minutos para separar las células y desechar cuidadosamente el sobrenadante que contiene medio de congelación residual.
7. Resuspender suavemente el sedimento celular en 10 ml de medio de cultivo fresco. Para las células adherentes, dividir la suspensión entre dos matraces de cultivo T25; para los cultivos en suspensión, transferir todo el medio a un matraz T25 para promover la interacción y el crecimiento celular efectivos.
8. Siga los protocolos de subcultivo establecidos para el crecimiento y mantenimiento continuos de la línea celular, garantizando resultados experimentales fiables.

### Incubation Atmosphere

37°C, 5%<sub>CO2</sub>, atmósfera humidificada.

### Flask Coating

Ninguno

### Freezing Procedure

Las líneas celulares crioconservadas se envían en hielo seco en envases validados y aislados con suficiente refrigerante para mantener aproximadamente -78 °C durante el tránsito. A la recepción, inspeccione el envase inmediatamente y transfiera los viales sin demora al almacenamiento adecuado.

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

### Shipping Conditions

Las líneas celulares crioconservadas se envían en hielo seco en envases validados y aislados con suficiente refrigerante para mantener aproximadamente -78 °C durante el tránsito. A la recepción, inspeccione el envase inmediatamente y transfiera los viales sin demora al almacenamiento adecuado.

### Storage Conditions

Para la conservación a largo plazo, coloque los viales en nitrógeno líquido en fase vapor a una temperatura aproximada de -150 a -196 °C. El almacenamiento a -80 °C sólo es aceptable como breve paso intermedio antes de la transferencia al nitrógeno líquido.

## Control de calidad / Perfil genético / HLA

### Sterility

La contaminación por micoplasma se excluye utilizando tanto ensayos basados en la PCR como métodos de detección de micoplasma basados en la luminiscencia.

Para garantizar la ausencia de contaminación bacteriana, fúngica o por levaduras, los cultivos celulares se someten a inspecciones visuales diarias.