

## Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663

### Informations générales

#### Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 est une lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome génétiquement modifiée dérivée de cellules U2OS dans laquelle le locus endogène RANBP2 (également connu sous le nom de NUP358) a été modifié par CRISPR/Cas9 pour coder une étiquette SNAPf en phase avec la protéine native. Nup358/RanBP2 est une grande nucléoporine localisée dans les filaments cytoplasmiques du complexe des pores nucléaires (NPC) et joue un rôle essentiel dans le transport nucléocytoplasmique, la SUMOylation et les processus mitotiques. Le marquage endogène garantit que SNAPf-Nup358 est exprimé sous le contrôle physiologique du promoteur, maintenant les niveaux d'expression natifs et minimisant les artefacts associés aux systèmes de surexpression.

Le marqueur SNAPf est une variante à marquage rapide du marqueur SNAP qui se lie de manière covalente aux substrats conjugués à la benzylguanine, permettant un marquage fluorescent sélectif et stable de Nup358 dans des cellules vivantes ou fixées. Dans les cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, la protéine de fusion se localise dans l'enveloppe nucléaire selon une distribution ponctuelle caractéristique des filaments NPC cytoplasmiques. Cette configuration permet l'imagerie par fluorescence à haute résolution, la microscopie à super-résolution, le marquage par pulse-chase et le suivi de molécules individuelles pour étudier l'architecture et la dynamique des NPC. La morphologie plate et les grands noyaux des cellules U2OS facilitent encore davantage l'imagerie quantitative des structures de l'enveloppe nucléaire.

Ce modèle permet d'étudier les rôles spécifiques de Nup358 dans l'export nucléaire dépendant de CRM1/exportine, la régulation du cycle de la GTPase Ran et l'organisation spatiale des plateformes de transport cytoplasmiques. Compte tenu de l'implication de Nup358 dans l'assemblage du fuseau mitotique et la fonction kinétochore, la lignée cellulaire est également adaptée à l'étude de la redistribution des nucléoporines dépendante du cycle cellulaire et du désassemblage/réassemblage des NPC pendant la mitose. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 fournit une plateforme physiologiquement pertinente pour disséquer les aspects structurels et fonctionnels de la face cytoplasmique du complexe des pores nucléaires dans les cellules humaines.

**Organism** Humain

**Tissue** Os

**Disease** Ostéosarcome

**Metastatic site** Localisation de la tumeur primaire (os)

**Applications** Biologie des filaments cytoplasmiques du complexe des pores nucléaires ; rôle de Nup358/RanBP2 dans l'export nucléaire médié par CRM1 ; cycle de la GTPase Ran ; voie SUMO ; assemblage du fuseau mitotique ; suivi de particules individuelles ; microscopie à super-résolution ; marquage SNAP par impulsion-poursuite ; architecture de la face cytoplasmique du NPC

### Caractéristiques

**Age** 15 ans

**Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663****Gender** Femme**Ethnicity** Caucasien**Morphology** De type épithélial**Cell type** Cellules épithéliales (ostéosarcome)**Growth properties** Adhérent**Données réglementaires****Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (numéro de catalogue Cytion 300663)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Non attribué (dérivé de la lignée U2OS modifié par CRISPR ; lignée parentale U2OS CVCL\_0042)**Depositor** Le laboratoire Ellenberg (EMBL)**GMO Status** OGM-S1 : Cette lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) contient une fusion SNAPf-Nup358/RanBP2 modifiée par CRISPR permettant un marquage précis des fibrilles cytoplasmiques du pore nucléaire. La modification est intégrée de manière stable. Cette classification ne s'applique qu'en Allemagne et peut différer dans d'autres pays.**Données biomoléculaires****Protein expression** Nup358/RanBP2, SNAPf-tag**Manipulation****Culture Medium** McCoys 5a, w : 3,0 g/L Glucose, w : Glutamine stable, w : 2,0 mM Pyruvate de sodium, w : 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (numéro d'article Cytion 820200a)**Supplements** Compléter le milieu avec 10 % de FBS, 3,0 g/L de glucose, de la glutamine stable, 2,0 mM de pyruvate de sodium, 2,2 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 1 % de NEAA

**Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**

**Dissociation Reagent** Accutase

**Doubling time** environ 24 à 36 heures

**Subculturing** Retirer l'ancien milieu des cellules adhérentes et les laver avec du PBS dépourvu de calcium et de magnésium. Pour les flacons T25, utiliser 3-5 ml de PBS, et pour les flacons T75, 5-10 ml. Ensuite, recouvrir complètement les cellules avec Accutase, en utilisant 1 à 2 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75. Laisser les cellules incuber à température ambiante pendant 8-10 minutes pour les détacher. Après incubation, mélanger délicatement les cellules avec 10 ml de milieu pour les remettre en suspension, puis centrifuger à 300xg pendant 3 minutes. Jeter le surnageant, remettre les cellules en suspension dans du milieu frais et les transférer dans de nouveaux flacons contenant déjà du milieu frais.

**Split ratio** 1 à 3

**Seeding density** 1 à  $3 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal** 2 à 3 fois par semaine

**Freeze medium** Comme milieu de cryoconservation, nous utilisons un milieu de croissance complet (comprenant du FBS) + 10 % de DMSO pour une viabilité adéquate après décongélation, ou CM-1 (numéro de catalogue 800100 de Cytion), qui comprend des osmoprotectants et des stabilisateurs métaboliques optimisés pour améliorer la récupération et réduire le stress induit par la cryogénéisation.

## Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663

### Thawing and Culturing Cells

1. Confirmer que le flacon est toujours congelé à la livraison, car les cellules sont expédiées sur de la glace sèche pour maintenir des températures optimales pendant le transport.
2. Dès réception, soit conserver immédiatement le cryovial à des températures inférieures à -150°C pour assurer la préservation de l'intégrité cellulaire, soit passer à l'étape 3 si une mise en culture immédiate est nécessaire.
3. Pour une mise en culture immédiate, décongeler rapidement le flacon en l'immergeant dans un bain-marie à 37°C avec de l'eau propre et un agent antimicrobien, en l'agitant doucement pendant 40 à 60 secondes jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un petit amas de glace.
4. Effectuer toutes les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux, en désinfectant le cryovial avec de l'éthanol à 70 % avant de l'ouvrir.
5. Ouvrir soigneusement le flacon désinfecté et transférer la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger de 15 ml contenant 8 ml de milieu de culture à température ambiante, en mélangeant doucement.
6. Centrifuger le mélange à 300 x g pendant 3 minutes pour séparer les cellules et jeter soigneusement le surnageant contenant le milieu de congélation résiduel.
7. Remettre doucement en suspension le culot cellulaire dans 10 ml de milieu de culture frais. Pour les cellules adhérentes, répartir la suspension entre deux flacons de culture T25 ; pour les cultures en suspension, transférer tout le milieu dans un seul flacon T25 afin de favoriser une interaction et une croissance efficaces des cellules.
8. Respecter les protocoles de sous-culture établis pour une croissance et un entretien continus de la lignée cellulaire, garantissant ainsi des résultats expérimentaux fiables.

### Incubation Atmosphere

37°C, 5%<sub>CO2</sub>, atmosphère humidifiée.

### Flask Coating

Aucun

### Freezing Procedure

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

## Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663

### Shipping Conditions

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

### Storage Conditions

Pour une conservation à long terme, placer les flacons dans de l'azote liquide en phase vapeur à une température comprise entre -150 et -196 °C environ. Le stockage à -80 °C n'est acceptable qu'en tant qu'étape intermédiaire de courte durée avant le transfert dans l'azote liquide.

## Contrôle de qualité / Profil génétique / HLA

### Sterility

La contamination par les mycoplasmes est exclue à l'aide de tests basés sur la PCR et de méthodes de détection des mycoplasmes basées sur la luminescence.

Pour s'assurer de l'absence de contamination bactérienne, fongique ou levurienne, les cultures cellulaires font l'objet d'inspections visuelles quotidiennes.