

Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Informations générales

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 est une lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome génétiquement modifiée dérivée de la lignée parentale U2OS, dans laquelle le locus NUP133 endogène a été modifié à l'aide de l'édition génomique CRISPR/Cas9 afin de coder une étiquette SNAPf C-terminale. NUP133 est un composant central du complexe Y (complexe NUP107-160), un sous-complexe structurel essentiel à l'assemblage et au maintien du complexe des pores nucléaires (NPC). En introduisant la séquence codante SNAPf dans le cadre du locus endogène, la protéine de fusion est exprimée sous contrôle régulateur natif, préservant ainsi les niveaux d'expression physiologiques et la localisation subcellulaire.

Le marqueur SNAPf est une variante à marquage rapide du marqueur SNAP, une O6-alkylguanine-ADN alkyltransférase modifiée qui réagit de manière covalente avec des substrats conjugués à la benzylguanine. Cela permet un marquage fluorescent hautement spécifique et polyvalent de Nup133 dans des cellules vivantes ou fixées à l'aide de substrats SNAP perméables ou imperméables aux cellules. Dans les cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, la protéine de fusion se localise dans l'enveloppe nucléaire selon un motif ponctuel caractéristique des complexes de pores nucléaires. Comme le marquage se produit au niveau du locus endogène, la stœchiométrie et l'architecture des NPC sont très peu perturbées, ce qui rend ce modèle adapté à la microscopie quantitative à super-résolution, au suivi de molécules individuelles et aux analyses cinétiques de l'assemblage et du renouvellement des NPC.

Cette lignée cellulaire constitue une plateforme robuste pour l'étude du transport nucléaire, de la dynamique du trafic nucléocytoplasmique, de la biogenèse des NPC pendant l'interphase et le réassemblage nucléaire post-mitotique, ainsi que de l'organisation structurelle du complexe Y au sein de la structure poreuse. Le fond U2OS offre une morphologie plate et de grands noyaux, facilitant l'imagerie haute résolution. Les cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sont particulièrement bien adaptées aux expériences de marquage par impulsions-poursuite, à la microscopie optique et électronique corrélative et aux approches d'imagerie multicolore en combinaison avec des nucléoporines ou des facteurs de transport supplémentaires marqués de manière endogène.

Organism Humain

Tissue Os

Disease Ostéosarcome

Caractéristiques

Age 15 ans

Gender Femme

Ethnicity Caucasien

Morphology De type épithélial

Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

Growth properties Adhérent

Données réglementaires

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (numéro de catalogue Cytion 300666)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Le laboratoire Ellenberg (EMBL)

GMO Status OGM-S1 : Cette lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) contient une fusion SNAPf-Nup133 introduite par CRISPR, permettant le marquage fluorescent de la nucléoporeine Nup133. L'insert est présent de manière stable. Cette classification ne s'applique qu'en Allemagne et peut différer dans d'autres pays.

Données biomoléculaires

Protein expression Nup133, 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 NaHCO₃ (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 NaHCO₃, 1 % de NEAA

Dissociation Reagent Accutase

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.

Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

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.

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%_{CO2}, atmosphère humidifiée.

Flask Coating

Aucun

Cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

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.

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.