

**Cellule U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666****Informazioni generali****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 è una linea cellulare di osteosarcoma umano geneticamente modificata derivata dal background parentale U2OS in cui il locus NUP133 endogeno è stato modificato utilizzando l'editing genomico mediato da CRISPR/Cas9 per codificare un tag SNAPf C-terminale. NUP133 è un componente fondamentale del complesso Y (complesso NUP107-160), un sottocomplesso strutturale essenziale per l'assemblaggio e il mantenimento del complesso dei pori nucleari (NPC). Introducendo la sequenza codificante SNAPf in-frame nel locus endogeno, la proteina di fusione viene espressa sotto il controllo regolatorio nativo, preservando i livelli di espressione fisiologica e la localizzazione subcellulare.

Il tag SNAPf è una variante a marcatura rapida del tag SNAP, un O6-alchilguanina-DNA alchiltransferasi ingegnerizzato che reagisce in modo covalente con substrati coniugati con benzilguanina. Ciò consente una marcatura fluorescente altamente specifica e versatile di Nup133 in cellule vive o fissate utilizzando substrati SNAP permeabili o impermeabili alle cellule. Nelle cellule U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, la proteina di fusione si localizza nell'involucro nucleare con un pattern puntiforme caratteristico dei complessi dei pori nucleari. Poiché l'etichettatura avviene nel locus endogeno, la stechiometria e l'architettura dell'NPC sono minimamente perturbate, rendendo questo modello adatto alla microscopia quantitativa a super risoluzione, al tracciamento di singole molecole e alle analisi cinetiche dell'assemblaggio e del turnover dell'NPC.

Questa linea cellulare fornisce una solida piattaforma per lo studio del trasporto nucleare, delle dinamiche del traffico nucleocitoplasmatico, della biogenesi degli NPC durante l'interfase e il riassetto nucleare post-mitotico e dell'organizzazione strutturale del complesso Y all'interno dello scaffold dei pori. Il background U2OS offre una morfologia piatta e nuclei di grandi dimensioni, facilitando l'imaging ad alta risoluzione. Le cellule U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sono particolarmente adatte per esperimenti di marcatura pulse-chase, microscopia ottica ed elettronica correlativa e approcci di imaging multicolore in combinazione con nucleoporine o fattori di trasporto marcati endogenamente aggiuntivi.

**Organism** Umano**Tissue** Osso**Disease** Osteosarcoma**Caratteristiche****Age** 15 anni**Gender** Donna**Ethnicity** Caucasico**Morphology** Simile all'epitelio

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

**Growth properties** Aderente

## Dati normativi

**Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (numero di catalogo Cytion 300666)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**Depositor** Il laboratorio Ellenberg (EMBL)

**GMO Status** GMO-S1: questa linea cellulare di osteosarcoma umano (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) contiene una fusione SNAPf-Nup133 introdotta da CRISPR, che consente di etichettare in modo fluorescente la nucleoporina Nup133. L'inserto è presente in modo stabile. Questa classificazione si applica solo in Germania e può differire altrove.

## Dati biomolecolari

**Protein expression** Nup133, etichetta SNAPf

## Manipolazione

**Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucosio, w: Glutammina stabile, w: 2,0 mM Sodio piruvato, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (articolo Cytion numero 820200a)

**Supplements** Integrare il terreno di coltura con 10% FBS, 3,0 g/L di glucosio, Glutammina stabile, 2,0 mM di piruvato di sodio, 2,2 g/L di NaHCO<sub>3</sub>, 1% di NEAA

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Rimuovere il vecchio terreno dalle cellule aderenti e lavarle con PBS privo di calcio e magnesio. Per le fiasche T25, utilizzare 3-5 ml di PBS e per le fiasche T75, 5-10 ml. Quindi, coprire completamente le cellule con Accutase, utilizzando 1-2 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75. Lasciare incubare le cellule a temperatura ambiente per 8-10 minuti per staccarle. Dopo l'incubazione, mescolare delicatamente le cellule con 10 ml di terreno per risospenderle, quindi centrifugare a 300xg per 3 minuti. Scartare il surnatante, risospendere le cellule in terreno fresco e trasferirle in nuove fiasche contenenti terreno fresco.

**Freeze medium** Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo (incluso FBS) + 10% DMSO per un'adeguata vitalità post-scongelo, o CM-1 (numero di catalogo Cytion 800100), che include osmoprotettori e stabilizzatori metabolici ottimizzati per migliorare il recupero e ridurre lo stress crio-indotto.

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

### Thawing and Culturing Cells

1. Verificare che la fiala rimanga profondamente congelata al momento della consegna, poiché le cellule vengono spedite con ghiaccio secco per mantenere le temperature ottimali durante il trasporto.
2. Al ricevimento, conservare immediatamente la criovial a temperature inferiori a -150°C per garantire la conservazione dell'integrità cellulare, oppure procedere al punto 3 se è necessaria una coltura immediata.
3. Per la coltura immediata, scongelare rapidamente la fiala immergendola in un bagno d'acqua a 37°C con acqua pulita e un agente antimicrobico, agitando delicatamente per 40-60 secondi finché non rimane un piccolo grumo di ghiaccio.
4. Eseguire tutte le fasi successive in condizioni di sterilità in una cappa a flusso, disinfettando la criovial con etanolo al 70% prima dell'apertura.
5. Aprire con cautela la fiala disinfettata e trasferire la sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente 8 ml di terreno di coltura a temperatura ambiente, mescolando delicatamente.
6. Centrifugare la miscela a 300 x g per 3 minuti per separare le cellule e scartare con cura il surnatante contenente il terreno di coltura residuo.
7. Risospendere delicatamente il pellet cellulare in 10 ml di terreno di coltura fresco. Per le cellule aderenti, dividere la sospensione tra due fiasche di coltura T25; per le colture in sospensione, trasferire tutto il terreno in una fiasca T25 per promuovere l'interazione e la crescita delle cellule.
8. Attenersi ai protocolli di subcoltura stabiliti per la crescita e il mantenimento continui della linea cellulare, garantendo risultati sperimentali affidabili.

### Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO<sub>2</sub>, atmosfera umidificata.

### Flask Coating

Nessuno

### Freezing Procedure

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

### Shipping Conditions

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

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

### Storage Conditions

Per la conservazione a lungo termine, porre le fiale in azoto liquido in fase vapore a una temperatura compresa tra -150 e -196 °C circa. La conservazione a -80 °C è accettabile solo come breve fase intermedia prima del trasferimento in azoto liquido.

## Controllo di qualità / Profilo genetico / HLA

### Sterility

La contaminazione da micoplasma viene esclusa utilizzando sia saggi basati sulla PCR sia metodi di rilevamento del micoplasma basati sulla luminescenza.

Per garantire l'assenza di contaminazione batterica, fungina o da lieviti, le colture cellulari sono sottoposte a ispezioni visive quotidiane.