

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

## Algemene informatie

## Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 is een genetisch gemanipuleerde menselijke osteosarcoomcellijn afgeleid van de oorspronkelijke U2OS-achtergrond, waarin de endogene NUP133-locus is gemodificeerd met behulp van CRISPR/Cas9-gemedieerde genoombewerking om een C-terminale SNAPf-tag te coderen. NUP133 is een kerncomponent van het Y-complex (NUP107-160-complex), een structureel subcomplex dat essentieel is voor de assemblage en het onderhoud van het nucleaire poriëcomplex (NPC). Door de SNAPf-coderende sequentie in-frame in de endogene locus te introduceren, wordt het fusie-eiwit onder natuurlijke regulerende controle tot expressie gebracht, waardoor de fysiologische expressieniveaus en subcellulaire lokalisatie behouden blijven.

De SNAPf-tag is een snel labelende variant van de SNAP-tag, een gemanipuleerd O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase dat covalent reageert met benzylguanine-geconjugeerde substraten. Dit maakt een zeer specifieke en veelzijdige fluorescerende labeling van Nup133 in levende of gefixeerde cellen mogelijk met behulp van celpermeabele of impermeabele SNAP-substraten. In U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-cellen lokaliseert het fusie-eiwit zich in de kernmembraan in een puntvormig patroon dat kenmerkend is voor nucleaire poriëncomplexen. Omdat de tagging plaatsvindt op de endogene locus, worden de stoichiometrie en architectuur van NPC minimaal verstoord, waardoor dit model geschikt is voor kwantitatieve superresolutiemicroscopie, het volgen van afzonderlijke moleculen en kinetische analyses van NPC-assemblage en -omzet.

Deze cellijn biedt een robuust platform voor het bestuderen van nucleair transport, nucleocytoplasmatisch transport, NPC-biogenese tijdens interfase en postmitotische nucleaire herassemblage, en de structurele organisatie van het Y-complex binnen het poriënraamwerk. De U2OS-achtergrond biedt een vlakke morfologie en grote kernen, wat beeldvorming met hoge resolutie vergemakkelijkt. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-cellen zijn bijzonder geschikt voor pulse-chase-labeling-experimenten, correlatieve licht- en elektronenmicroscopie en multicolor beeldvorming in combinatie met aanvullende endogeen gelabelde nucleoporines of transportfactoren.

**Organism** Mens

**Tissue** Bot

**Disease** Osteosarcoom

## Kenmerken

**Age** 15 jaar

**Gender** Vrouw

**Ethnicity** Kaukasisch

**Morphology** Epitheelachtig

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

**Growth properties**      Aanhangend

## Regelgevende gegevens

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

**Biosafety level**      1

**NCBI\_TaxID**      9606

**Depositor**      Het Ellenberg Lab (EMBL)

**GMO Status**      GMO-S1: Deze menselijke osteosarcomcellijn (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) bevat een CRISPR-geïntroduceerde SNAPf-Nup133-fusie, die fluorescente markering van de nucleoporine Nup133 mogelijk maakt. Het insert is stabiel aanwezig. Deze classificatie is alleen van toepassing binnen Duitsland en kan elders afwijken.

## Biomoleculaire gegevens

**Protein expression**      Nup133, SNAPf-tag

## Omgaan met

**Culture Medium**      McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucose, w: stabiel Glutamine, w: 2,0 mM Natriumpyruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Cytion artikelnummer 820200a)

**Supplements**      Vul het medium aan met 10% FBS, 3,0 g/L Glucose, stabiele Glutamine, 2,0 mM Natriumpyruvaat, 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1% NEAA

**Dissociation Reagent**      Accutase

**Subculturing**      Verwijder het oude medium van de adherente cellen en was ze met PBS zonder calcium en magnesium. Gebruik voor T25-flesjes 3-5 ml PBS en voor T75-flesjes 5-10 ml. Bedek de cellen vervolgens volledig met Accutase, met 1-2 ml voor T25-flesjes en 2,5 ml voor T75-flesjes. Laat de cellen gedurende 8-10 minuten bij kamertemperatuur incuberen om ze los te maken. Na incubatie de cellen voorzichtig mengen met 10 ml medium om ze te resuspenderen en vervolgens centrifugereren bij 300xg gedurende 3 minuten. Gooi het supernatant weg, resuspendeer de cellen in vers medium en breng ze over in nieuwe kolven die al vers medium bevatten.

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

### Freeze medium

Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimeidium (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

### Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij  $300 \times g$  om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

### Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , bevochtigde atmosfeer.

### Flask Coating

Geen

### Freezing Procedure

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

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

### Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer -78 °C te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

### Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

## Kwaliteitscontrole / Genetisch profiel / HLA

### Sterility

Mycoplasma-verontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasma-detectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.