

**Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666****Informacje ogólne****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 to genetycznie zmodyfikowana linia komórek ludzkiego osteosarcoma pochodząca z macierzystego tła U2OS, w której endogenny locus NUP133 został zmodyfikowany za pomocą edycji genomu za pomocą CRISPR/Cas9 w celu zakodowania tagu C-terminalnego SNAPf. NUP133 jest podstawowym składnikiem kompleksu Y (kompleksu NUP107-160), podkompleksu strukturalnego niezbędnego do tworzenia i utrzymania kompleksu porów jądrowych (NPC). Dzięki wprowadzeniu sekwencji kodującej SNAPf w ramce odczytu w endogennym locus, białko fuzyjne jest wyrażane pod kontrolą naturalnych mechanizmów regulacyjnych, zachowując fizjologiczne poziomy ekspresji i lokalizację subkomórkową.

Tag SNAPf jest szybko znakującym wariantem tagu SNAP, inżynierijnej O6-alkilguaniny-DNA alkyltransferazy, która reaguje kowalencyjnie z substratami sprzężonymi z benzyloguaniną. Umożliwia to wysoce specyficzne i wszechstronne znakowanie fluorescencyjne Nup133 w żywych lub utrwalonych komórkach przy użyciu substratów SNAP przenikających lub nieprzenikających przez komórki. W komórkach U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 białko fuzyjne lokalizuje się w otocze jądrowej w postaci charakterystycznych dla kompleksów porów jądrowych punktów. Ponieważ znakowanie odbywa się w endogenicznym locus, stechiometria i architektura NPC są minimalnie zaburzone, co sprawia, że model ten nadaje się do ilościowej mikroskopii superrozdzielczej, śledzenia pojedynczych cząsteczek oraz analiz kinetycznych montażu i obrotu NPC.

Ta linia komórkowa stanowi solidną platformę do badania transportu jądrowego, dynamiki transportu jądrowo-cytoplazmatycznego, biogenezy NPC podczas interfazy i ponownego montażu jądra po mitozie oraz organizacji strukturalnej kompleksu Y w szkieletie porów. Tło U2OS oferuje płaską morfologię i duże jądra, ułatwiając obrazowanie w wysokiej rozdzielczości. Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 są szczególnie dobrze dostosowane do eksperymentów znakowania metodą pulse-chase, korelacyjnej mikroskopii świetlnej i elektronowej oraz wielobarwnego obrazowania w połączeniu z dodatkowymi endogenicznie znakowanymi nukleoporinami lub czynnikami transportowymi.

**Organism** Człowiek**Tissue** Kość**Disease** Mięsak kościopochodny**Metastatic site** Miejsce występowania guza pierwotnego (kość)**Applications** Biologia kompleksu porów jądrowych (NPC); architektura kompleksu Nup133/Y; biogeneza NPC; transport jądrowo-cytoplazmatyczny; mikroskopia superrozdzielcza (STORM/PALM/STED); śledzenie pojedynczych cząstek; znakowanie SNAP metodą pulse-chase; korelacyjna mikroskopia świetlna i elektronowa; ilościowa stechiometria NPC**Charakterystyka****Age** 15 lat**Gender** Kobieta

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

<b>Ethnicity</b>	Kaukaski
<b>Morphology</b>	Podobny do nabłonka
<b>Cell type</b>	Komórki nabłonkowe (osteosarcoma)
<b>Growth properties</b>	Adherent

**Dane regulacyjne**

<b>Citation</b>	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (numer katalogowy Cytion 300666)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>CellosaurusAccession</b>	Nieprzypisane (odmiana komórek U2OS zmodyfikowana metodą CRISPR; komórki macierzyste U2OS CVCL_0042)
<b>Depositor</b>	Laboratorium Ellenberg (EMBL)
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: Ta ludzka linia komórek kostniakomięsaka (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) zawiera wprowadzoną przez CRISPR fuzję SNAPf-Nup133, umożliwiającą fluorescencyjne znakowanie nukleoporyny Nup133. Wstawka jest stabilnie obecna. Ta klasyfikacja ma zastosowanie tylko w Niemczech i może się różnić w innych krajach.

**Dane biomolekularne**

<b>Protein expression</b>	Nup133, SNAPf-tag
---------------------------	-------------------

**Obsługa**

<b>Culture Medium</b>	McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukozy, w: stabilna glutamina, w: 2,0 mM pirogronianu sodu, w: 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> (numer artykułu Cytion 820200a)
<b>Supplements</b>	Uzupełnić pożywkę o 10% FBS, 3,0 g/l glukozy, stabilną glutaminę, 2,0 mM pirogronianu sodu, 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 1% NEAA
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase

**Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666****Doubling time** ok. 24–36 godzin**Subculturing** Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.**Split ratio** od 1 do 3**Seeding density** od 1 do  $3 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>**Fluid renewal** 2 do 3 razy w tygodniu**Freeze medium** Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

**Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666****Thawing and  
Culturing Cells**

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej  $-150^{\circ}\text{C}$ , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością  $300 \times g$  przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawieszonych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

**Incubation  
Atmosphere**

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , nawilżona atmosfera.

**Flask Coating**

Brak

**Freezing  
Procedure**

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około  $-78^{\circ}\text{C}$  przez czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

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

### Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około  $-78^{\circ}\text{C}$  przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

### Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od  $-150$  do  $-196^{\circ}\text{C}$ . Przechowywanie w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

## Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA

### Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.