

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

### Informações gerais

#### Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 é uma linha celular de osteossarcoma humano geneticamente modificada, derivada do fundo parental U2OS, na qual o locus NUP133 endógeno foi modificado usando edição do genoma mediada por CRISPR/Cas9 para codificar uma etiqueta SNAPf C-terminal. O NUP133 é um componente central do complexo Y (complexo NUP107-160), um subcomplexo estrutural essencial para a montagem e manutenção do complexo de poros nucleares (NPC). Ao introduzir a sequência de codificação SNAPf no locus endógeno, a proteína de fusão é expressa sob controle regulatório nativo, preservando os níveis de expressão fisiológica e a localização subcelular.

A etiqueta SNAPf é uma variante de marcação rápida da etiqueta SNAP, uma O6-alquilguanina-DNA alquiltransferase projetada que reage covalentemente com substratos conjugados com benzilguanina. Isso permite a marcação fluorescente altamente específica e versátil de Nup133 em células vivas ou fixas usando substratos SNAP permeáveis ou impermeáveis às células. Nas células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, a proteína de fusão localiza-se no envelope nuclear num padrão pontilhado característico dos complexos de poros nucleares. Como a marcação ocorre no locus endógeno, a estequiometria e a arquitetura do NPC são minimamente perturbadas, tornando este modelo adequado para microscopia quantitativa de super-resolução, rastreamento de moléculas únicas e análises cinéticas da montagem e renovação do NPC.

Esta linha celular fornece uma plataforma robusta para o estudo do transporte nuclear, da dinâmica do tráfego nucleocitoplasmático, da biogênese do NPC durante a interfase e a remontagem nuclear pós-mitótica e da organização estrutural do complexo Y dentro da estrutura do poro. O fundo U2OS oferece morfologia plana e núcleos grandes, facilitando a imagem de alta resolução. As células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 são particularmente adequadas para experiências de marcação pulse-chase, microscopia correlativa de luz e eletrônica e abordagens de imagem multicolorida em combinação com nucleoporinas ou fatores de transporte endógenos marcados adicionalmente.

**Organism** Humano

**Tissue** Osso

**Disease** Osteossarcoma

### Caraterísticas

**Age** 15 anos

**Gender** Feminino

**Ethnicity** Caucasiano

**Morphology** De tipo epitelial

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

**Growth properties** Aderente

**Dados regulamentares**

**Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (número de catálogo Cytion 300666)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**Depositor** O Laboratório Ellenberg (EMBL)

**GMO Status** GMO-S1: Esta linha celular de osteossarcoma humano (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) contém uma fusão SNAPf-Nup133 introduzida por CRISPR, que permite a marcação fluorescente da nucleoporina Nup133. A inserção está presente de forma estável. Esta classificação aplica-se apenas na Alemanha e pode diferir noutros países.

**Dados biomoleculares**

**Protein expression** Nup133, SNAPf-tag

**Manuseamento**

**Culture Medium** McCoys 5a, com: 3,0 g/L de glucose, com: glutamina estável, com: 2,0 mM de piruvato de sódio, com: 2,2 g/L de NaHCO<sub>3</sub> (número de artigo Cytion 820200a)

**Supplements** Suplementar o meio com 10% de FBS, 3,0 g/L de glucose, glutamina estável, 2,0 mM de piruvato de sódio, 2,2 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 1% de NEAA

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Retirar o meio antigo das células aderentes e lavá-las com PBS sem cálcio e magnésio. Nos frascos T25, utilizar 3-5 ml de PBS e, nos frascos T75, 5-10 ml. Em seguida, cobrir completamente as células com Accutase, utilizando 1-2 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75. Deixar as células incubar à temperatura ambiente durante 8-10 minutos para as destacar. Após a incubação, misturar suavemente as células com 10 ml de meio para as ressuspender e, em seguida, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Deitar fora o sobrenadante, ressuspender as células em meio fresco e transferi-las para novos frascos que já contenham meio fresco.

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

### Freeze medium

Como meio de criopreservação, utilizamos um meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% DMSO para uma viabilidade pós-descongelamento adequada, ou CM-1 (número de catálogo Cytion 800100), que inclui osmoprotectores otimizados e estabilizadores metabólicos para melhorar a recuperação e reduzir o stress induzido pela crio.

### Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que o frasco permanece profundamente congelado aquando da entrega, uma vez que as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após a receção, armazenar o frasco criogénico imediatamente a temperaturas inferiores a -150°C para garantir a preservação da integridade celular, ou avançar para o passo 3 se for necessária uma cultura imediata.
3. Para uma cultura imediata, descongelar rapidamente o frasco imergindo-o num banho de água a 37°C com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos até ficar um pequeno aglomerado de gelo.
4. Efetuar todos os passos subsequentes em condições estéreis numa capela de fluxo, desinfectando o frasco criogénico com etanol a 70% antes de o abrir.
5. Abrir cuidadosamente o frasco desinfectado e transferir a suspensão de células para um tubo de centrifugação de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando suavemente.
6. Centrifugar a mistura a 300 x g durante 3 minutos para separar as células e eliminar cuidadosamente o sobrenadante que contém o meio de congelação residual.
7. Ressuspender suavemente o pellet de células em 10 ml de meio de cultura fresco. No caso de células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; no caso de culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 para promover uma interação e um crescimento eficazes das células.
8. Cumprir os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento e manutenção contínuos da linha celular, garantindo resultados experimentais fiáveis.

### Incubation Atmosphere

37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , atmosfera humidificada.

### Flask Coating

Nenhum

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

### Freezing Procedure

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

### Shipping Conditions

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

### Storage Conditions

Para conservação a longo prazo, colocar os frascos em azoto líquido em fase de vapor a uma temperatura entre -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como um curto passo intermédio antes da transferência para azoto líquido.

## Controlo de qualidade / Perfil genético / HLA

### Sterility

A contaminação por micoplasma é excluída utilizando ensaios baseados em PCR e métodos de deteção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não há contaminação bacteriana, fúngica ou de leveduras, as culturas de células são sujeitas a inspeções visuais diárias.