

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

## Informații generale

## Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 este o linie celulară de osteosarcom uman modificată genetic, derivată din fondul parental U2OS, în care locusul endogen NUP133 a fost modificat folosind editarea genomului mediată de CRISPR/Cas9 pentru a codifica o etichetă SNAPf C-terminală. NUP133 este o componentă centrală a complexului Y (complexul NUP107-160), un subcomplex structural esențial pentru asamblarea și întreținerea complexului porilor nucleari (NPC). Prin introducerea secvenței de codificare SNAPf în cadrul locusului endogen, proteina de fuziune este exprimată sub controlul regulator nativ, păstrând nivelurile de expresie fiziologică și localizarea subcelulară.

Eticheta SNAPf este o variantă de marcare rapidă a etichetei SNAP, o alchiltransferază O6-alchilguanină-ADN modificată genetic care reacționează covalent cu substraturi conjugate cu benzilguanină. Acest lucru permite marcarea fluorescentă foarte specifică și versatilă a Nup133 în celule vii sau fixate, utilizând substraturi SNAP permeabile sau impermeabile pentru celule. În celulele U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, proteina de fuziune se localizează în învelișul nuclear într-un model punctiform caracteristic complexelor de pori nucleari. Deoarece etichetarea are loc la locusul endogen, stoichiometria și arhitectura NPC sunt perturbate minim, ceea ce face ca acest model să fie potrivit pentru microscopie cuantitativă de super-rezoluție, urmărirea unei singure molecule și analize cinetice ale asamblării și rotației NPC.

Această linie celulară oferă o platformă robustă pentru studierea transportului nuclear, a dinamicii traficului nucleocitoplasmatic, a biogenezei NPC în timpul interfazei și reasamblării nucleare postmitotice, precum și a organizării structurale a complexului Y în cadrul scheletului porilor. Fundalul U2OS oferă o morfologie plată și nuclee mari, facilitând imagistica de înaltă rezoluție. Celulele U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sunt deosebit de potrivite pentru experimente de marcare cu puls-urmărire, microscopie corelativă cu lumină și electroni și abordări de imagistică multicoloră în combinație cu nucleoporine sau factori de transport marcați endogen suplimentari.

**Organism** Om

**Tissue** Os

**Disease** Osteosarcom

## Caracteristici

**Age** 15 ani

**Gender** Femei

**Ethnicity** Caucazian

**Morphology** De tip epitelial

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

**Growth properties** Aderent

## Date de reglementare

**Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (număr de catalog Cytion 300666)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**Depositor** Laboratorul Ellenberg (EMBL)

**GMO Status** OMG-S1: Această linie celulară de osteosarcom uman (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) conține o fuziune SNAPf-Nup133 introdusă prin CRISPR, care permite marcarea fluorescență a nucleoporinei Nup133. Inserția este prezentă în mod stabil. Această clasificare se aplică numai în Germania și poate diferi în alte țări.

## Date biomoleculare

**Protein expression** Nup133, SNAPf-tag

## Manipulare

**Culture Medium** McCoys 5a, cu: 3,0 g/L glucoză, cu: glutamină stabilă, cu: 2,0 mM piruvat de sodiu, cu: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (numărul articolului Cytion 820200a)

**Supplements** Suplimentați mediul cu 10% FBS, 3,0 g/L glucoză, glutamină stabilă, 2,0 mM piruvat de sodiu, 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1% NEAA

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Îndepărtați mediul vechi de pe celulele aderente și spălați-le cu PBS care nu conține calciu și magneziu. Pentru flacoanele T25, se utilizează 3-5 ml de PBS, iar pentru flacoanele T75, 5-10 ml. Apoi, se acoperă celulele complet cu Accutase, folosind 1-2 ml pentru flacoanele T25 și 2,5 ml pentru flacoanele T75. Lăsați celulele la incubare la temperatura camerei timp de 8-10 minute pentru a le detașa. După incubare, amestecați ușor celulele cu 10 ml de mediu pentru a le resuspenda, apoi centrifugați la 300xg timp de 3 minute. Aruncați supernatantul, resuspendați celulele în mediu proaspăt și transferați-le în flacoane noi care conțin deja mediu proaspăt.

**Freeze medium** Ca mediu de crioconservare, folosim mediu de creștere complet (inclusiv FBS) + 10% DMSO pentru o viabilitate adecvată după dezghețare sau CM-1 (număr de catalog Cytion 800100), care include osmoprotectanți optimizați și stabilizatori metabolici pentru a spori recuperarea și a reduce stresul indus de criogenie.

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

1. Confirmați că flaconul rămâne profund înghețat la livrare, deoarece celulele sunt expediate pe gheață carbonică pentru a menține temperaturi optime în timpul transportului.
2. La primire, fie depozitați crioviola imediat la temperaturi sub -150 °C pentru a asigura păstrarea integrității celulare, fie treceți la etapa 3 dacă este necesară cultivarea imediată.
3. Pentru cultivarea imediată, dezghețați rapid flaconul prin scufundarea acestuia într-o baie de apă la 37 °C cu apă curată și un agent antimicrobian, agitându-l ușor timp de 40-60 de secunde până când rămâne o mică aglomerare de gheață.
4. Se efectuează toate etapele ulterioare în condiții sterile, într-o hotă cu flux, dezinfectând crioviola cu etanol 70% înainte de deschidere.
5. Se deschide cu grijă flaconul dezinfectat și se transferă suspensia celulară într-un tub de centrifugare de 15 ml care conține 8 ml de mediu de cultură la temperatura camerei, amestecând ușor.
6. Se centrifughează amestecul la 300 x g timp de 3 minute pentru a separa celulele și se aruncă cu grijă supernatantul care conține mediul de congelare rezidual.
7. Se resuspendă ușor peletul celular în 10 ml de mediu de cultură proaspăt. Pentru celulele aderente, împărțiți suspensia între două flacoane de cultură T25; pentru culturile în suspensie, transferați tot mediul într-un flacon T25 pentru a promova interacțiunea și creșterea celulară eficientă.
8. Respectați protocoalele de subcultură stabilite pentru creșterea și menținerea continuă a liniei celulare, asigurând rezultate experimentale fiabile.

**Incubation  
Atmosphere**

37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , atmosferă umidificată.

**Flask Coating**

Niciuna

**Freezing  
Procedure**

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

**Shipping  
Conditions**

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

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

### Storage Conditions

Pentru conservarea pe termen lung, flacoanele se plasează în azot lichid în fază de vapori la o temperatură cuprinsă între -150 și -196 °C. Păstrarea la -80 °C este acceptabilă doar ca o scurtă etapă intermediară înainte de transferul în azot lichid.

## Controlul calității / Profil genetic / HLA

### Sterility

Contaminarea cu micoplasmă este exclusă utilizând atât teste bazate pe PCR, cât și metode de detectare a micoplasmei bazate pe luminescență.

Pentru a se asigura că nu există contaminare bacteriană, fungică sau de drojdie, culturile celulare sunt supuse unor inspecții vizuale zilnice.