

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

## Allmän information

## Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 är en genetiskt modifierad human osteosarkomcellinje som härstammar från den ursprungliga U2OS-bakgrunden, där den endogena NUP133-lokuset har modifierats med hjälp av CRISPR/Cas9-medierad genomredigering för att koda en C-terminal SNAPf-tag. NUP133 är en kärnkomponent i Y-komplexet (NUP107-160-komplexet), ett strukturellt subkomplex som är viktigt för montering och underhåll av kärnporekomplexet (NPC). Genom att införa SNAPf-kodningssekvensen in-frame vid den endogena lokuset uttrycks fusionsproteinet under naturlig regulatorisk kontroll, vilket bevarar fysiologiska expressionsnivåer och subcellulär lokalisering.

SNAPf-taggen är en snabbmärkande variant av SNAP-taggen, en konstruerad O6-alkylguanin-DNA-alkyltransferas som reagerar kovalent med bensylguaninkonjugerade substrat. Detta möjliggör högspecifik och mångsidig fluorescerande märkning av Nup133 i levande eller fixerade celler med hjälp av cellpermeabla eller impermeabla SNAP-substrat. I U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler lokaliserar fusionsproteinet till kärnmembranet i ett punktformat mönster som är karakteristiskt för kärnporekomplex. Eftersom märkningen sker vid den endogena lokuset störs NPC-stökiometrin och arkitekturen minimalt, vilket gör denna modell lämplig för kvantitativ superupplösningsmikroskopi, spårning av enskilda molekyler och kinetiska analyser av NPC-montering och omsättning.

Denna cellinje utgör en robust plattform för studier av kärntransport, nukleocytoplasmatisk transportdynamik, NPC-biogenes under interfase och postmitotisk kärnåteruppbyggnad samt strukturell organisation av Y-komplexet inom porstommen. U2OS-bakgrunden erbjuder en platt morfologi och stora kärnor, vilket underlättar högupplöst avbildning. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133-celler är särskilt väl lämpade för puls-chase-märkningsexperiment, korrelativ ljus- och elektronmikroskopi samt flerfärgsabbildningsmetoder i kombination med ytterligare endogent märkta nukleoporiner eller transportfaktorer.

**Organism** Människan

**Tissue** Ben

**Disease** Osteosarkom

## Egenskaper

**Age** 15 år

**Gender** Kvinna

**Ethnicity** Kaukasisk

**Morphology** Epitelliknande

**Growth properties** Följsam

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

## Lagstadgade uppgifter

<b>Citation</b>	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (Cytion katalognummer 300666)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>Depositor</b>	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: Denna mänskliga osteosarkomcellinje (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) innehåller en CRISPR-introducerad SNAPf-Nup133-fusion, vilket möjliggör fluorescerande märkning av nukleoporinet Nup133. Insatsen är stabilt närvarande. Denna klassificering gäller endast i Tyskland och kan skilja sig åt i andra länder.

## Biomolekylära data

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

## Hantering

<b>Culture Medium</b>	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glukos, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> (Cytion artikelnummer 820200a)
<b>Supplements</b>	Komplettera med 10% FBS, 3,0 g/L glukos, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 1% NEAA
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Subculturing</b>	Ta bort det gamla mediet från de adherenta cellerna och tvätta dem med PBS som saknar kalcium och magnesium. Använd 3-5 ml PBS för T25-kolvar och 5-10 ml för T75-kolvar. Täck sedan cellerna helt med Accutase, använd 1-2 ml för T25-kolvar och 2,5 ml för T75-kolvar. Låt cellerna inkubera i rumstemperatur i 8-10 minuter så att de lossnar. Efter inkubationen, blanda cellerna försiktigt med 10 ml medium för att resuspendera dem och centrifugera sedan vid 300xg i 3 minuter. Kassera supernatanten, resuspendera cellerna i färskt medium och överför dem till nya kolvar som redan innehåller färskt medium.
<b>Freeze medium</b>	Som kryokonserveringsmedium använder vi komplett tillväxtmedium (inklusive FBS) + 10% DMSO för adekvat viabilitet efter upptining, eller CM-1 (Cytion katalognummer 800100), som innehåller optimerade osmoprotektanter och metaboliska stabilisatorer för att förbättra återhämtningen och minska kryoinducerad stress.

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

### Thawing and Culturing Cells

1. Bekräfta att flaskan är djupfryst vid leverans, eftersom cellerna skickas på torris för att bibehålla optimala temperaturer under transporten.
2. Vid mottagandet ska du antingen förvara kryovialen omedelbart vid temperaturer under  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  för att säkerställa att cellernas integritet bevaras, eller gå vidare till steg 3 om omedelbar odling krävs.
3. Vid omedelbar odling ska injektionsflaskan snabbt tinas genom att den sänks ned i ett  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  vattenbad med rent vatten och ett antimikrobiellt medel och omrörs försiktigt i 40-60 sekunder tills en liten isklump återstår.
4. Utför alla efterföljande steg under sterila förhållanden i en flödeshuv och desinficera kryovialerna med 70 % etanol innan de öppnas.
5. Öppna försiktigt den desinficerade flaskan och överför cellsuspensionen till ett 15 ml centrifugrör som innehåller 8 ml rumstempererat odlingsmedium och blanda försiktigt.
6. Centrifugera blandningen vid  $300 \times g$  i 3 minuter för att separera cellerna och kassera försiktigt supernatanten som innehåller resterande frysmedium.
7. Resuspendera försiktigt cellpelleten i 10 ml färskt odlingsmedium. För adherenta celler, fördela suspensionen mellan två T25-kulturkolv; för suspensionskulturer, överför allt medium till en T25-kolv för att främja effektiv cellinteraktion och tillväxt.
8. Följ fastställda subkulturprotokoll för fortsatt tillväxt och underhåll av cellinjen, vilket säkerställer tillförlitliga experimentella resultat.

### Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , befuktad atmosfär.

### Flask Coating

Ingen

### Freezing Procedure

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

### Shipping Conditions

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

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

### Storage Conditions

För långtidsförvaring, placera flaskorna i flytande kväve i ångfas vid ca -150 till -196 °C. Förvaring vid -80 °C är acceptabelt endast som ett kort mellanliggande steg innan överföring till flytande kväve.

## Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

### Sterility

Mykoplasmakontaminering utesluts med hjälp av både PCR-baserade analyser och luminiscensbaserade metoder för mykoplasmadiagnostik.

För att säkerställa att det inte finns någon kontaminering av bakterier, svamp eller jäst utsätts cellkulturerna för dagliga visuella inspektioner.