U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133

300666

GENERAL INFORMATION

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 est une lignée cellulaire d'ostéosarcome humain génétiquement modifiée, dérivée de la lignée parentale U2OS, dans laquelle le locus endogène NUP133 a été modifié à l'aide de l'édition génomique par CRISPR/Cas9 afin de coder pour une étiquette SNAPf C-terminale. NUP133 est un composant essentiel du complexe Y (complexe NUP107-160), un sous-complexe structurel indispensable à l'assemblage et au maintien du complexe des pores nucléaires (NPC). En introduisant la séquence codante de SNAPf en phase de lecture au niveau du locus endogène, la protéine de fusion est exprimée sous le contrôle régulateur natif, ce qui préserve les niveaux d'expression physiologiques et la localisation subcellulaire.
Le marqueur SNAPf est une variante à marquage rapide du marqueur SNAP, une O6-alkylguanine-ADN-alkyltransférase modifiée qui réagit de manière covalente avec des substrats conjugués à la benzylguanine. Cela permet un marquage fluorescent hautement spécifique et polyvalent de la protéine Nup133 dans des cellules vivantes ou fixées, à l'aide de substrats SNAP perméables ou imperméables aux cellules. Dans les cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, la protéine de fusion se localise sur l'enveloppe nucléaire selon un motif ponctuel caractéristique des complexes de pores nucléaires. Comme le marquage se produit au niveau du locus endogène, la stœchiométrie et l'architecture des NPC ne sont que très peu perturbées, ce qui rend ce modèle adapté à la microscopie quantitative à super-résolution, au suivi de molécules individuelles et aux analyses cinétiques de l'assemblage et du renouvellement des NPC.
Cette lignée cellulaire constitue une plateforme robuste pour l'étude du transport nucléaire, de la dynamique du trafic nucléocytoplasmique, de la biogenèse des NPC pendant l'interphase et du réassemblage nucléaire post-mitotique, ainsi que de l'organisation structurelle du complexe Y au sein de la charpente des pores. La lignée U2OS présente une morphologie plate et de grands noyaux, ce qui facilite l'imagerie à haute résolution. Les cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sont particulièrement bien adaptées aux expériences de marquage par impulsion-poursuite, à la microscopie corrélative optique et électronique, ainsi qu'aux approches d'imagerie multicolore en combinaison avec d'autres nucléoporines ou facteurs de transport marqués de manière endogène.

Tissue	Os
Disease	Ostéosarcome
Metastatic site	Site de la tumeur primaire (os)

Applications

Biologie du complexe des pores nucléaires (NPC); architecture du complexe Nup133/Y; biogenèse du NPC; transport nucléocytoplasmique; microscopie à super-résolution (STORM/PALM/STED); suivi de particules individuelles; marquage SNAP par impulsion-poursuite; microscopie corrélative optique et électronique; stœchiométrie quantitative du NPC

CLASSIFICATION

Organism	Human
Sex	Female
Growth properties	Adherent
GMO status	GMO-S1

GMO status details

GMO-S1: This human osteosarcoma cell line (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) contains a CRISPR-introduced SNAPf-Nup133 fusion, enabling fluorescent tagging of the Nup133 nucleoporin. The insert is stably present. This classification applies only within Germany and may differ elsewhere.

Biosafety level	1

Cytion GmbH
Nikola-Tesla-Str. 3
69124 Heidelberg
Tel: +49 (0)6221 405780
info@cytion.com
cytion.com

Registered office Heidelberg
VAT ID: DE283292917
Local court Mannheim - HRB 714394
CEO / Geschäftsführer: Jonathan Steubing

Banking information
Sparkasse Heidelberg
IBAN: DE35 6725 0020 0009 2076 86
BIC: SOLADES1HDB

CHARACTERISTICS

Morphology	De type épithélial
Cell type	Cellules épithéliales (ostéosarcome)
Doubling time	environ 24 à 36 heures

IDENTIFIERS

Citation

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (numéro de catalogue Cytion 300666)

NCBI TaxID	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Depositor	Le laboratoire Ellenberg (EMBL)

EXPRESSION AND SUSCEPTIBILITY

Protein expression

Nup133, SNAPf-tag

HANDLING AND CULTURE

Culture medium

McCoys 5a, w : 3,0 g/L de glucose, w : stable; glutamine, w : 2,0 mM de pyruvate de sodium, w : 2,2 g/L de $NaHCO_3$ (référence Cytion 820200a)

Incubation atmosphere	37 °C, 5 % de CO_2, atmosphère humidifiée.

Supplements

Ajouter au milieu 10 % de FBS, 3,0 g/L de glucose, de la glutamine stable, 2,0 mM de pyruvate de sodium, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ et 1 % de NEAA.

Dissociation reagent	Accutase

Subculturing

Retirez l'ancien milieu des cellules adhérentes et lavez-les avec du PBS sans calcium ni magnésium. Pour les flacons T25, utilisez 3 à 5 ml de PBS, et pour les flacons T75, utilisez 5 à 10 ml. Ensuite, recouvrez complètement les cellules d'Accutase, en utilisant 1 à 2 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75. Laissez les cellules incuber à température ambiante pendant 8 à 10 minutes afin de les détacher. Après l'incubation, mélangez délicatement les cellules avec 10 ml de milieu pour les remettre en suspension, puis centrifugez à 300 x g pendant 3 minutes. Éliminez le surnageant, remettez les cellules en suspension dans du milieu frais, puis transférez-les dans de nouveaux flacons contenant déjà du milieu frais.

Split ratio	1 à 3
Seeding density	de 1 à 3 × 10^4 cellules/cm^2
Fluid renewal	2 à 3 fois par semaine

Thawing and culturing

Confirm that the vial remains deeply frozen upon delivery, as cells are shipped on dry ice to maintain optimal temperatures during transit.
Upon receipt, either store the cryovial immediately at temperatures below -150°C to ensure the preservation of cellular integrity, or proceed to step 3 if immediate culturing is required.
For immediate culturing, swiftly thaw the vial by immersing it in a 37°C water bath with clean water and an antimicrobial agent, agitating gently for 40-60 seconds until a small ice clump remains.
Perform all subsequent steps under sterile conditions in a flow hood, disinfecting the cryovial with 70% ethanol before opening.
Carefully open the disinfected vial and transfer the cell suspension into a 15 ml centrifuge tube containing 8 ml of room-temperature culture medium, mixing gently.
Centrifuge the mixture at 300 x g for 3 minutes to separate the cells and carefully discard the supernatant containing residual freezing medium.
Gently resuspend the cell pellet in 10 ml of fresh culture medium. For adherent cells, divide the suspension between two T25 culture flasks; for suspension cultures, transfer all the medium into one T25 flask to promote effective cell interaction and growth.
Adhere to established subculture protocols for continued growth and maintenance of the cell line, ensuring reliable experimental outcomes.

QUALITY CONTROL AND CRYOPRESERVATION

Sterility

La contamination par les mycoplasmes est exclue à l'aide de tests basés sur la PCR et de méthodes de détection des mycoplasmes par luminescence.
Afin de s’assurer qu’il n’y a aucune contamination bactérienne, fongique ou par des levures, les cultures cellulaires font l’objet d’inspections visuelles quotidiennes.

Freeze medium	Comme milieu de cryoconservation, nous utilisons un milieu de croissance complet (contenant du sérum fœtal bovin) + 10 % de DMSO pour assurer une viabilité adéquate après décongélation, ou du CM-1 (référence Cytion 800100), qui contient des osmoprotecteurs et des stabilisateurs métaboliques optimisés pour améliorer la récupération et réduire le stress induit par la cryoconservation.

Storage conditions

Pour une conservation à long terme, placez les flacons dans de l’azote liquide en phase vapeur à une température comprise entre environ −150 et −196 °C. L’entreposage à −80 °C n’est acceptable qu’à titre d’étape intermédiaire de courte durée avant le transfert dans l’azote liquide.

Shipping conditions

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées dans de la glace sèche, dans un emballage isotherme validé contenant suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d’environ −78 °C pendant tout le transport. À la réception, inspectez immédiatement le conteneur et transférez sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

DONOR

Donor age	15 ans
Ethnicity	caucasien

LEGAL AND SAFETY

Safety precautions

Lorsqu’on prévoit entreposer un cryotube dans de l’azote liquide en vue d’une décongélation ultérieure, il est impératif de respecter des mesures de sécurité rigoureuses. Le port de gants et de vêtements de protection appropriés est essentiel, et l’utilisation d’un masque facial ou de lunettes de protection est obligatoire lors du transfert d’échantillons congelés vers ou depuis le réservoir d’azote liquide. Cette précaution vise à réduire le risque de blessure causé par d’éventuelles explosions de cryotubes lors de leur retrait, pouvant entraîner la projection de fragments coupants.

Warranty

Chez Cytion, nous garantissons la qualité et la viabilité de nos produits.
Nous garantissons que nos cellules seront viables au début de la culture pendant 60 jours à compter de leur expédition depuis nos installations.
Nous assurons que tous les matériaux sont conformes aux spécifications décrites dans le certificat d'analyse et/ou la fiche technique du produit.
Pour plus de détails, veuillez consulter notre déclaration de garantie.

Third-party agreements apply	Yes

Cytion GmbH
Nikola-Tesla-Str. 3
69124 Heidelberg
Tel: +49 (0)6221 405780
info@cytion.com
cytion.com

Registered office Heidelberg
VAT ID: DE283292917
Local court Mannheim - HRB 714394
CEO / Geschäftsführer: Jonathan Steubing

Banking information
Sparkasse Heidelberg
IBAN: DE35 6725 0020 0009 2076 86
BIC: SOLADES1HDB