U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133

300666

GENERAL INFORMATION

Description

A U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 é uma linhagem celular de osteossarcoma humano geneticamente modificada, derivada da linhagem parental U2OS, na qual o locus endógeno NUP133 foi modificado por meio da edição do genoma mediada por CRISPR/Cas9 para codificar uma etiqueta SNAPf no extremo C-terminal. A 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 codificadora da SNAPf em fase no locus endógeno, a proteína de fusão é expressa sob controle regulatório nativo, preservando os níveis fisiológicos de expressão e a localização subcelular.
A etiqueta SNAPf é uma variante de marcação rápida da etiqueta SNAP, uma O6-alquilguanina-DNA-alquiltransferase modificada que reage covalentemente com substratos conjugados à benzilguanina. Isso permite a marcação fluorescente altamente específica e versátil da Nup133 em células vivas ou fixadas, utilizando substratos SNAP permeáveis ou impermeáveis às células. Nas células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133, a proteína de fusão se localiza no envelope nuclear em um padrão pontilhado característico dos complexos de poros nucleares. Como a marcação ocorre no locus endógeno, a estequiometria e a arquitetura dos complexos de poros nucleares (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 dos NPCs.
Essa linhagem celular oferece uma plataforma robusta para o estudo do transporte nuclear, da dinâmica do tráfego nucleocitoplasmático, da biogênese dos NPCs durante a interfase e da remontagem nuclear pós-mitótica, bem como da organização estrutural do complexo Y dentro da estrutura dos poros. A linhagem U2OS apresenta morfologia plana e núcleos grandes, facilitando a obtenção de imagens de alta resolução. As células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 são particularmente adequadas para experimentos de marcação do tipo “pulse-chase”, microscopia correlativa de luz e eletrônica, e abordagens de imagem multicolorida em combinação com nucleoporinas ou fatores de transporte adicionalmente marcados de forma endógena.

Tissue	Osso
Disease	Osteossarcoma
Metastatic site	Localização do tumor primário (osso)

Applications

Biologia do complexo de poros nucleares (NPC); Arquitetura do complexo Nup133/Y; biogênese do NPC; transporte nucleocitoplasmático; microscopia de super-resolução (STORM/PALM/STED); rastreamento de partículas individuais; marcação SNAP por pulso-perseguição; microscopia correlativa de luz e eletrônica; estequiometria quantitativa do 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 tipo epitelial
Cell type	Células epiteliais (osteossarcoma)
Doubling time	aproximadamente 24 a 36 horas

IDENTIFIERS

Citation

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

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

EXPRESSION AND SUSCEPTIBILITY

Protein expression

Nup133, SNAPf-tag

HANDLING AND CULTURE

Culture medium

McCoys 5a, p: 3,0 g/L de glicose, p: glutamina estável, p: 2,0 mM de piruvato de sódio, p: 2,2 g/L de $NaHCO_3$ (número de artigo da Cytion 820200a)

Incubation atmosphere	37 °C, 5% de CO_2, atmosfera umidificada.

Supplements

Adicione ao meio 10% de FBS, 3,0 g/L de glicose, glutamina estável, 2,0 mM de piruvato de sódio, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 1% de NEAA

Dissociation reagent	Accutase

Subculturing

Remova o meio antigo das células aderentes e lave-as com PBS sem cálcio nem magnésio. Para frascos T25, use 3 a 5 ml de PBS; para frascos T75, use 5 a 10 ml. Em seguida, cubra as células completamente com Accutase, utilizando 1 a 2 ml para frascos T25 e 2,5 ml para frascos T75. Deixe as células incubarem à temperatura ambiente por 8 a 10 minutos para que se desprendam. Após a incubação, misture delicadamente as células com 10 ml de meio para ressuspender, depois centrifugue a 300xg por 3 minutos. Descarte o sobrenadante, ressuspenda as células em meio fresco e transfira-as para novos frascos que já contenham meio fresco.

Split ratio	1 a 3
Seeding density	1 a 3 × 10^4 células/cm^2
Fluid renewal	2 a 3 vezes por semana

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

A contaminação por micoplasma é descartada por meio de ensaios baseados em PCR e de métodos de detecção de micoplasma baseados em luminescência.
Para garantir que não haja contaminação por bactérias, fungos ou leveduras, as culturas celulares são submetidas a inspeções visuais diárias.

Freeze medium	Como meio de criopreservação, utilizamos meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% de DMSO para garantir viabilidade adequada após o descongelamento, ou CM-1 (número de catálogo da Cytion 800100), que inclui osmoprotetores e estabilizadores metabólicos otimizados para melhorar a recuperação e reduzir o estresse induzido pela criopreservação.

Storage conditions

Para preservação a longo prazo, coloque os frascos em nitrogênio líquido em fase de vapor a uma temperatura entre aproximadamente −150 e −196 °C. O armazenamento a −80 °C é aceitável apenas como uma etapa intermediária de curta duração antes da transferência para o nitrogênio líquido.

Shipping conditions

As linhagens celulares criopreservadas são enviadas em gelo seco, em embalagens isoladas e validadas, com refrigerante suficiente para manter a temperatura em aproximadamente −78 °C durante todo o transporte. Ao receber a remessa, inspecione o recipiente imediatamente e transfira os frascos sem demora para o local de armazenamento adequado.

DONOR

Donor age	15 anos
Ethnicity	caucasiano

LEGAL AND SAFETY

Safety precautions

Ao planejar o armazenamento de um criotubo em nitrogênio líquido para descongelamento futuro, é obrigatório seguir medidas de segurança rigorosas. É essencial o uso de luvas e roupas de proteção adequadas, além do uso obrigatório de máscara facial ou óculos de proteção durante a transferência de amostras congeladas para dentro ou para fora do tanque de nitrogênio líquido. Isso visa mitigar o risco de ferimentos decorrentes de possíveis explosões dos criotubos durante a remoção, o que pode resultar na projeção de fragmentos pontiagudos.

Warranty

Na Cytion, garantimos a qualidade e a viabilidade de nossos produtos.
Garantimos que nossas células permanecerão viáveis no início da cultura por
60 dias após o envio de nossas instalações.
Asseguramos que todos os materiais estão em conformidade com as especificações descritas no
Certificado de Análise e/ou na Ficha Técnica do Produto.
Para obter todos os detalhes, consulte nossa
Declaração de Garantia.

Third-party agreements apply	Yes