

## Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663

## Обща информация

## Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 е геномно редактирана човешка остеосаркомна клетъчна линия, получена от U2OS клетки, в които ендогенният локус RANBP2 (известен също като NUP358) е модифициран чрез CRISPR/Cas9, за да кодира SNAPf таг в рамката на естествения протеин. Nup358/RanBP2 е голям нуклеопорин, локализиран в цитоплазмените филаменти на ядрения порен комплекс (NPC) и играе критична роля в нуклеоцитоплазмения транспорт, SUMOилирането и митотичните процеси. Ендогенното маркиране гарантира, че SNAPf-Nup358 се експресира под физиологичен промотор, поддържайки естествените нива на експресия и минимизирайки артефактите, свързани с системите за свръхекспресия.

SNAPf тагът е вариант на SNAP-тага за бързо маркиране, който ковалентно се свързва с бензилгуанин-конюгирани субстрати, позволявайки селективно и стабилно флуоресцентно маркиране на Nup358 в живи или фиксирани клетки. В клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, фузионният протеин се локализира в ядрената мембрана в характерна за цитоплазмените NPC филаменти точкова дистрибуция. Тази конфигурация поддържа флуоресцентно изображение с висока разделителна способност, микроскопия със суперразделителна способност, маркиране с импулсно проследяване и подходи за проследяване на единични молекули за изучаване на архитектурата и динамиката на NPC. Плоската морфология и големите ядра на U2OS клетките допълнително улесняват количественото изображение на структурите на ядрената мембрана.

Този модел позволява изследване на специфичните роли на Nup358 в CRM1/експортин-зависимия ядрен експорт, регулацията на цикъла на Ran GTPase и пространствената организация на цитоплазмените транспортни платформи. Предвид участието на Nup358 в сглобяването на митотичния шпиндел и функцията на кинетохора, клетъчната линия е подходяща и за изучаване на зависимата от клетъчния цикъл преразпределение на нуклеопорини и разглобяване/сглобяване на NPC по време на митоза. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 предоставя физиологично релевантна платформа за анализиране на структурните и функционалните аспекти на цитоплазмената повърхност на ядрения порен комплекс в човешките клетки.

<b>Organism</b>	Човек
<b>Tissue</b>	Вопе
<b>Disease</b>	Остеосарком

## Характеристики

<b>Age</b>	15 години
<b>Gender</b>	Жена
<b>Ethnicity</b>	Кавказки
<b>Morphology</b>	Подобни на епител

## Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663

**Growth properties** Придържачи се

## Регулаторни данни

**Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (каталожен номер 300663 на Cytion)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**Depositor** Лабораторията на Елнбърг (EMBL)

**GMO Status** GMO-S1: Тази човешка клетъчна линия на остеосарком (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) съдържа CRISPR-инженерен синтез SNAPf-Nup358/RanBP2, който позволява прецизно маркиране на цитоплазмените фибрили на ядрената пора. Модификацията е стабилно интегрирана. Тази класификация се прилага само в Германия и може да се различава в други страни.

## Биомолекуларни данни

**Protein expression** Nup358/RanBP2, SNAPf-tag

## Работа с

**Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/L глюкоза, w: стабилен glutамин, w: 2,0 mM натриев пируват, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (номер на статията в Cytion 820200a)

**Supplements** Допълнете средата с 10% FBS, 3,0 g/L глюкоза, стабилен glutамин, 2,0 mM натриев пируват, 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1% NEAA

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Отстранете старата среда от адхезивните клетки и ги промийте с PBS, която не съдържа калций и магнезий. За колби T25 използвайте 3-5 ml PBS, а за колби T75 - 5-10 ml. След това покрийте клетките изцяло с Accutase, като използвате 1-2 ml за колби T25 и 2,5 ml за колби T75. Оставете клетките да се инкубират на стайна температура за 8-10 минути, за да се отделят. След инкубацията внимателно разбъркайте клетките с 10 ml среда, за да ги ресуспендирате, след което центрофугирайте при 300xg за 3 минути. Изхвърлете супернатантата, ресуспендирайте клетките в прясна среда и ги прехвърлете в нови колби, които вече съдържат прясна среда.

**Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663****Freeze medium**

Като среда за криоконсервация използваме пълна среда за растеж (включително FBS) + 10% DMSO за адекватна жизнеспособност след размразяване или CM-1 (каталожен номер 800100 на Cytion), която включва оптимизирани осмопротектори и метаболитни стабилизатори за подобряване на възстановяването и намаляване на криоиндуцирания стрес.

**Thawing and Culturing Cells**

1. Уверете се, че флаконът остава дълбоко замразен при доставката, тъй като клетките се транспортират със сух лед, за да се поддържат оптимални температури по време на транспортирането.
2. При получаване или съхранявайте незабавно криовиолата при температури под  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , за да осигурите запазване на клетъчната цялост, или преминете към стъпка 3, ако е необходимо незабавно култивиране.
3. За незабавно култивиране бързо размразете флакона, като го потопите във водна баня с чиста вода и антимикуробен агент с температура  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , като разбърквате внимателно в продължение на 40-60 секунди, докато остане малка ледена бучка.
4. Извършвайте всички следващи стъпки при стерилни условия в аспиратор, като преди отваряне дезинфекцирате криовиолата със 70% етанол.
5. Внимателно отворете дезинфекцирания флакон и прехвърлете клетъчната суспензия в 15 ml центрофужна епруветка, съдържаща 8 ml хранителна среда със стайна температура, като разбърквате внимателно.
6. Центрофугирайте сместа при  $300 \times g$  в продължение на 3 минути, за да отделите клетките, и внимателно изхвърлете супернатантата, съдържаща остатъчна замразяваща среда.
7. Внимателно ресуспендирайте клетъчната пелета в 10 ml прясна хранителна среда. За адхезивни клетки разделете суспензията между две колби T25; за суспензионни култури прехвърлете цялата среда в една колба T25, за да стимулирате ефективното взаимодействие и растеж на клетките.
8. Придържайте се към установените протоколи за субкултивиране за непрекъснат растеж и поддържане на клетъчната линия, като гарантирате надеждни експериментални резултати.

**Incubation Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , овлажнена атмосфера.

**Flask Coating**

Няма

## Клетки U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663

### Freezing Procedure

Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително  $-78^{\circ}\text{C}$  по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.

### Shipping Conditions

Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително  $-78^{\circ}\text{C}$  по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.

### Storage Conditions

За дълготрайно съхранение поставете флаконите в течен азот в парна фаза при температура около  $-150$  до  $-196^{\circ}\text{C}$ . Съхранението при  $-80^{\circ}\text{C}$  е приемливо само като кратък междинен етап преди прехвърлянето в течен азот.

## Контрол на качеството / Генетичен профил / HLA

### Sterility

Замърсяването с микоплазма се изключва както чрез PCR-базирани анализи, така и чрез луминесцентни методи за откриване на микоплазма.

За да се гарантира, че няма бактериално, гъбично или дрождево замърсяване, клетъчните култури се подлагат на ежедневни визуални проверки.