

Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Obecné informace****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 je genomově upravená lidská osteosarkomová buněčná linie odvozená z buněk U2OS, ve které byl endogenní lokus RANBP2 (známý také jako NUP358) modifikován pomocí CRISPR/Cas9 tak, aby kódoval značku SNAPf v rámci nativního proteinu. Nup358/RanBP2 je velký nukleoporin lokalizovaný v cytoplazmatických vláknech jaderného pórového komplexu (NPC) a hraje klíčovou roli v nukleocytoplazmatickém transportu, SUMOylaci a mitotických procesech. Endogenní značení zajišťuje, že SNAPf-Nup358 je exprimován pod fyziologickou kontrolou promotoru, čímž se udržují nativní úrovně exprese a minimalizují artefakty spojené s overexpresními systémy.

Značka SNAPf je variantou značky SNAP s rychlým značením, která se kovalentně váže na substráty konjugované s benzyloguaninem, což umožňuje selektivní a stabilní fluorescenční značení Nup358 v živých nebo fixovaných buňkách. V buňkách U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 se fúzní protein lokalizuje do jaderné obálky v bodovém rozložení charakteristickém pro cytoplazmatická NPC filamenta. Tato konfigurace podporuje fluorescenční zobrazování s vysokým rozlišením, superrozlišovací mikroskopii, značení pulzním pronásledováním a sledování jednotlivých molekul pro studium architektury a dynamiky NPC. Plochá morfologie a velká jádra buněk U2OS dále usnadňují kvantitativní zobrazování struktur jaderné obálky.

Tento model umožňuje zkoumání specifických rolí Nup358 v CRM1/exportin-dependentním jaderném exportu, regulaci cyklu Ran GTPázy a prostorové organizaci cytoplazmatických transportních platforem. Vzhledem k účasti Nup358 na sestavování mitotického vřetena a funkci kinetochoru je tato buněčná linie také vhodná pro studium redistribuce nukleoporinů závislé na buněčném cyklu a rozebírání/znovu sestavování NPC během mitózy. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 poskytuje fyziologicky relevantní platformu pro rozbor strukturálních a funkčních aspektů cytoplazmatické strany komplexu jaderných pórů v lidských buňkách.

Organism	Člověk
Tissue	Kost
Disease	Osteosarkom

Charakteristika

Age	15 let
Gender	Ženy
Ethnicity	Kavkazský
Morphology	Epitelu podobné
Growth properties	Adherentní

Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Regulační údaje**

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (katalogové číslo Cytion 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenbergova laboratoř (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Tato lidská buněčná linie osteosarkomu (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) obsahuje fúzi SNAPf-Nup358/RanBP2 vytvořenou pomocí CRISPR, která umožňuje přesné značení cytoplazmatických vláken jaderného póru. Modifikace je stabilně integrovaná. Tato klasifikace platí pouze v Německu a jinde se může lišit.

Biomolekulární data

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

Zpracování

Culture Medium	McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilní glutamin, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO ₃ (číslo článku Cytion 820200a)
Supplements	Doplňte médium o 10% FBS, 3,0 g/l glukózy, stabilní glutamin, 2,0 mM pyruvát sodný, 2,2 g/l NaHCO ₃ , 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstředte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpustte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.
Freeze medium	Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryem.

Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Thawing and
Culturing Cells**

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkumavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředujte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělte suspenzi mezi dvě kultivační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkultivační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žádný

**Freezing
Procedure**

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

**Shipping
Conditions**

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663

Storage Conditions

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuálním kontrolám.