

Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666**Obecné informace****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 je geneticky modifikovaná lidská osteosarkomová buněčná linie odvozená z rodičovského pozadí U2OS, ve které byl endogenní lokus NUP133 modifikován pomocí editace genomu zprostředkované CRISPR/Cas9 tak, aby kódoval C-terminální značku SNAPf. NUP133 je základní složkou Y-komplexu (komplex NUP107-160), strukturálního subkomplexu nezbytného pro sestavení a udržování jaderného pórového komplexu (NPC). Zavedením kódující sekvence SNAPf do endogenního lokusu se fúzní protein exprimuje pod přirozenou regulační kontrolou, čímž se zachovávají fyziologické úrovně exprese a subcelulární lokalizace.

Značka SNAPf je variantou značky SNAP, která umožňuje rychlé značení. Jedná se o uměle vytvořenou O6-alkylguanin-DNA alkyltransferázu, která kovalentně reaguje se substráty konjugovanými s benzyloguaninem. To umožňuje vysoce specifické a univerzální fluorescenční značení Nup133 v živých nebo fixovaných buňkách pomocí buněčně propustných nebo nepropustných substrátů SNAP. V buňkách U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 se fúzní protein lokalizuje do jaderné obálky v bodkovitém vzoru charakteristickém pro jaderné pórové komplexy. Protože značení probíhá na endogenním lokusu, stechiometrie a architektura NPC jsou minimálně narušeny, což činí tento model vhodným pro kvantitativní superrozlišovací mikroskopii, sledování jednotlivých molekul a kinetické analýzy sestavování a obratu NPC.

Tato buněčná linie poskytuje robustní platformu pro studium jaderného transportu, dynamiky nukleocytoplazmatického transportu, biogeneze NPC během interfáze a postmitotické jaderné reasemblace a strukturální organizace Y-komplexu v rámci pórové kostry. Pozadí U2OS nabízí plochou morfologii a velká jádra, což usnadňuje zobrazování ve vysokém rozlišení. Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 jsou zvláště vhodné pro experimenty s pulzním značením, korelační světelnou a elektronovou mikroskopii a multibarevné zobrazovací přístupy v kombinaci s dalšími endogenně značenými nukleoporiny nebo transportními faktory.

Organism Člověk**Tissue** Kost**Disease** Osteosarkom**Charakteristika****Age** 15 let**Gender** Ženy**Ethnicity** Kavkazský**Morphology** Epitelu podobné**Growth properties** Adherentní

Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666**Regulační údaje**

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (katalogové číslo Cytion 300666)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenbergova laboratoř (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Tato lidská buněčná linie osteosarkomu (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) obsahuje CRISPR-introdukovanou fúzi SNAPf-Nup133, která umožňuje fluorescenční značení nukleoporinu Nup133. Vložka je stabilně přítomná. Tato klasifikace platí pouze v Německu a může se lišit v jiných zemích.

Biomolekulární data

Protein expression	Nup133, 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 kryo.

Buňky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666**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-Nup133 | 300666

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.