

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

Allgemeine Informationen

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 ist eine genomeditierte humane Osteosarkom-Zelllinie, die aus U2OS-Zellen stammt, in denen der endogene RANBP2-Locus (auch bekannt als NUP358) durch CRISPR/Cas9 modifiziert wurde, um ein SNAPf-Tag in Frame mit dem nativen Protein zu kodieren. Nup358/RanBP2 ist ein großes Nukleoporin, das in den zytoplasmatischen Filamenten des Kernporenkomplexes (NPC) lokalisiert ist und eine wichtige Rolle beim nukleozytoplasmatischen Transport, der SUMOylierung und mitotischen Prozessen spielt. Die endogene Markierung stellt sicher, dass SNAPf-Nup358 unter physiologischer Promotorsteuerung exprimiert wird, wodurch die nativen Expressionsniveaus aufrechterhalten und Artefakte im Zusammenhang mit Überexpressionssystemen minimiert werden.

Das SNAPf-Tag ist eine schnell markierende Variante des SNAP-Tags, das kovalent an Benzylguanin-konjugierte Substrate bindet und eine selektive und stabile Fluoreszenzmarkierung von Nup358 in lebenden oder fixierten Zellen ermöglicht. In U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-Zellen lokalisiert sich das Fusionsprotein in einer punktförmigen Verteilung, die für zytoplasmatische NPC-Filamente charakteristisch ist, an der Kernhülle. Diese Konfiguration unterstützt hochauflösende Fluoreszenzbildgebung, Superauflösungsmikroskopie, Pulse-Chase-Markierung und Einzelmolekül-Tracking-Ansätze zur Untersuchung der NPC-Architektur und -Dynamik. Die flache Morphologie und die großen Kerne der U2OS-Zellen erleichtern zusätzlich die quantitative Bildgebung von Kernhüllenstrukturen.

Dieses Modell ermöglicht die Untersuchung der spezifischen Rollen von Nup358 beim CRM1/Exportin-abhängigen Kern-Export, der Ran-GTPase-Zyklusregulation und der räumlichen Organisation zytoplasmatischer Transportplattformen. Angesichts der Beteiligung von Nup358 am Aufbau der Mitosespindel und der Kinetochorfunktion eignet sich die Zelllinie auch für die Untersuchung der zellzyklusabhängigen Umverteilung von Nukleoporinen und der NPC-Demontage/Remontage während der Mitose. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 bietet eine physiologisch relevante Plattform für die Analyse struktureller und funktioneller Aspekte der zytoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes in menschlichen Zellen.

Organism Menschen

Tissue Knochen

Disease Osteosarkom

Metastatic site Primärtumorlokalisation (Knochen)

Applications Biologie der zytoplasmatischen Filamente des Kernporenkomplexes; Nup358/RanBP2 beim CRM1-vermittelten Kernexport; Ran-GTPase-Zyklus; SUMO-Signalweg; Aufbau der Mitosespindel; Einzelpartikel-Tracking; Superauflösungsmikroskopie; SNAP-Pulse-Chase-Markierung; Architektur der zytoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes

Merkmale

Age 15 Jahre

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

Gender Weiblich

Ethnicity Kaukasisch

Morphology Epithelähnlich

Cell type Epithelzellen (Osteosarkom)

Growth properties Adhärent

Regulatorische Daten

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytion Katalognummer 300663)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession Nicht zugeordnet (CRISPR-modifiziertes U2OS-Derivat; Elternzelllinie U2OS CVCL_0042)

Depositor Das Ellenberg-Labor (EMBL)

GMO Status GVO-S1: Diese menschliche Osteosarkom-Zelllinie (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) enthält eine mit CRISPR modifizierte SNAPf-Nup358/RanBP2-Fusion, die eine präzise Markierung der zytoplasmatischen Fibrillen der Kernpore ermöglicht. Die Modifikation ist stabil integriert. Diese Klassifizierung gilt nur innerhalb Deutschlands und kann in anderen Ländern abweichen.

Biomolekulare Daten

Protein expression Nup358/RanBP2, SNAPf-Tag

Handhabung

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucose, w: stabiles Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (Cytion-Artikelnummer 820200a)

Supplements Ergänzen Sie das Medium mit 10% FBS, 3,0 g/L Glucose, stabilem Glutamin, 2,0 mM Natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO₃, 1% NEAA

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

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time ca. 24 bis 36 Stunden

Subculturing Entfernen Sie das alte Medium von den adhären Zellen und waschen Sie sie mit PBS, das kein Kalzium und Magnesium enthält. Für T25-Kolben 3-5 ml PBS und für T75-Kolben 5-10 ml verwenden. Anschließend werden die Zellen vollständig mit Accutase bedeckt, wobei 1-2 ml für T25-Kolben und 2,5 ml für T75-Kolben verwendet werden. Lassen Sie die Zellen 8-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, um sie abzulösen. Nach der Inkubation mischen Sie die Zellen vorsichtig mit 10 ml Medium, um sie zu resuspendieren, und zentrifugieren sie dann 3 Minuten lang bei 300xg. Den Überstand verwerfen, die Zellen in frischem Medium resuspendieren und in neue Kolben überführen, die bereits frisches Medium enthalten.

Split ratio 1 bis 3

Seeding density 1 bis 3×10^4 Zellen/cm²

Fluid renewal 2 bis 3 Mal pro Woche

Freeze medium Als Kryokonservierungsmedium verwenden wir komplettes Wachstumsmedium (einschließlich FBS) + 10 % DMSO für eine angemessene Lebensfähigkeit nach dem Auftauen oder CM-1 (Cytion Katalognummer 800100), das optimierte Osmoprotektoren und Stoffwechselstabilisatoren enthält, um die Erholung zu verbessern und kryoinduzierten Stress zu reduzieren.

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

Thawing and Culturing Cells

1. Vergewissern Sie sich, dass das Fläschchen bei der Lieferung tiefgefroren ist, da die Zellen auf Trockeneis versandt werden, um während des Transports optimale Temperaturen zu erhalten.
2. Lagern Sie das Kryofläschchen nach Erhalt entweder sofort bei Temperaturen unter $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, um die Unversehrtheit der Zellen zu gewährleisten, oder fahren Sie mit Schritt 3 fort, wenn eine sofortige Kultivierung erforderlich ist.
3. Für eine sofortige Kultivierung tauen Sie das Fläschchen schnell auf, indem Sie es in ein 37°C warmes Wasserbad mit sauberem Wasser und einem antimikrobiellen Mittel eintauchen und 40-60 Sekunden lang vorsichtig schütteln, bis ein kleiner Eisklumpen zurückbleibt.
4. Führen Sie alle weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen in einer Abzugshaube durch und desinfizieren Sie das Kryo-Fläschchen vor dem Öffnen mit 70%igem Ethanol.
5. Das desinfizierte Fläschchen vorsichtig öffnen und die Zellsuspension unter vorsichtigem Mischen in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 8 ml Kulturmedium bei Raumtemperatur überführen.
6. Zentrifugieren Sie das Gemisch 3 Minuten lang bei $300 \times g$, um die Zellen abzutrennen, und werfen Sie den Überstand mit dem restlichen Gefriermedium vorsichtig.
7. Das Zellpellet vorsichtig in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendieren. Bei adhärennten Zellen die Suspension auf zwei T25-Kulturflaschen aufteilen; bei Suspensionskulturen das gesamte Medium in eine T25-Flasche überführen, um eine effektive Zellinteraktion und ein effektives Wachstum zu fördern.
8. Halten Sie sich an die festgelegten Subkulturprotokolle, um ein kontinuierliches Wachstum und die Aufrechterhaltung der Zelllinie zu gewährleisten und zuverlässige Versuchsergebnisse zu erzielen.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , befeuchtete Atmosphäre.

Flask Coating

Keine

Freezing Procedure

Kryokonservierte Zelllinien werden auf Trockeneis in einer validierten, isolierten Verpackung mit ausreichend Kühlmittel versandt, um während des gesamten Transports eine Temperatur von etwa $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufrechtzuerhalten. Prüfen Sie den Behälter bei Erhalt sofort und bringen Sie die Fläschchen unverzüglich in ein geeignetes Lager.

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

Shipping Conditions

Kryokonservierte Zelllinien werden auf Trockeneis in einer validierten, isolierten Verpackung mit ausreichend Kühlmittel versandt, um während des gesamten Transports eine Temperatur von etwa -78 °C aufrechtzuerhalten. Prüfen Sie den Behälter bei Erhalt sofort und bringen Sie die Fläschchen unverzüglich in ein geeignetes Lager.

Storage Conditions

Zur Langzeitkonservierung werden die Fläschchen in flüssigem Stickstoff bei etwa -150 bis -196 °C gelagert. Eine Lagerung bei -80 °C ist nur als kurzer Zwischenschritt vor der Überführung in flüssigen Stickstoff akzeptabel.

Qualitätskontrolle / Genetisches Profil / HLA

Sterility

Eine Kontamination mit Mykoplasmen wird sowohl durch PCR-basierte Assays als auch durch lumineszenzbasierte Mykoplasmen-Nachweisverfahren ausgeschlossen.

Um sicherzustellen, dass keine Kontamination mit Bakterien, Pilzen oder Hefen vorliegt, werden die Zellkulturen täglich visuell überprüft.