

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

## Γενικές πληροφορίες

## Description

Το U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 είναι μια γενετικά τροποποιημένη ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος που προέρχεται από κύτταρα U2OS, στα οποία ο ενδογενής τύπος RANBP2 (γνωστός και ως NUP358) έχει τροποποιηθεί με CRISPR/Cas9 για να κωδικοποιεί μια ετικέτα SNAPf σε πλαίσιο με την φυσική πρωτεΐνη. Το Nup358/RanBP2 είναι μια μεγάλη νουκλεοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στα κυτταροπλασματικά νημάτια του πυρηνικού πόρου (NPC) και παίζει κρίσιμο ρόλο στη μεταφορά νουκλεοκυτταροπλασματικών, στη SUMOylation και στις μιτωτικές διεργασίες. Η ενδογενής σήμανση εξασφαλίζει ότι το SNAPf-Nup358 εκφράζεται υπό φυσιολογικό έλεγχο προαγωγού, διατηρώντας τα φυσικά επίπεδα έκφρασης και ελαχιστοποιώντας τα τεχνητά στοιχεία που σχετίζονται με τα συστήματα υπερέκφρασης.

Η ετικέτα SNAPf είναι μια παραλλαγή ταχείας επισήμανσης της ετικέτας SNAP που συνδέεται ομοιοπολικά με υποστρώματα συζευγμένα με βενζυλογουανίνη, επιτρέποντας την επιλεκτική και σταθερή φθορίζουσα επισήμανση του Nup358 σε ζωντανά ή σταθερά κύτταρα. Στα κύτταρα U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, η πρωτεΐνη σύντηξης εντοπίζεται στο πυρηνικό περιβάλλον με μια χαρακτηριστική διάταξη σε σημεία που είναι χαρακτηριστική των κυτταροπλασματικών νημάτων NPC. Αυτή η διαμόρφωση υποστηρίζει απεικόνιση φθορισμού υψηλής ανάλυσης, μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης, σήμανση pulse-chase και μεθόδους παρακολούθησης μονομοριακών μορίων για τη μελέτη της αρχιτεκτονικής και της δυναμικής των NPC. Η επίπεδη μορφολογία και οι μεγάλοι πυρήνες των κυττάρων U2OS διευκολύνουν περαιτέρω την ποσοτική απεικόνιση των δομών του πυρηνικού περιβλήματος.

Αυτό το μοντέλο επιτρέπει τη διερεύνηση των ειδικών ρόλων του Nup358 στην εξαρτώμενη από CRM1/εξπορτίνη πυρηνική εξαγωγή, στη ρύθμιση του κύκλου Ran GTPase και στην χωρική οργάνωση των κυτταροπλασματικών πλατφορμών μεταφοράς. Δεδομένης της συμμετοχής του Nup358 στη συναρμολόγηση του μιτωτικού άξονα και στη λειτουργία του κινητοχώρα, η κυτταρική σειρά είναι επίσης κατάλληλη για τη μελέτη της εξαρτώμενης από τον κυτταρικό κύκλο ανακατανομής των νουκλεοποριών και της αποσυναρμολόγησης/επανασυναρμολόγησης του NPC κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Το U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 παρέχει μια φυσιολογικά σχετική πλατφόρμα για την ανάλυση των δομικών και λειτουργικών πτυχών της κυτταροπλασματικής όψης του συμπλέγματος πυρηνικών πόρων σε ανθρώπινα κύτταρα.

<b>Organism</b>	Ανθρώπινο
<b>Tissue</b>	Οστά
<b>Disease</b>	Οστεοσάρκωμα

## Χαρακτηριστικά

<b>Age</b>	15 χρόνια
<b>Gender</b>	Γυναίκα
<b>Ethnicity</b>	Καυκάσιος
<b>Morphology</b>	Επιθηλιοειδής

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

**Growth properties** Προσκολλημένο

## Ρυθμιστικά δεδομένα

**Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (αριθμός καταλόγου Cytion 300663)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**Depositor** Εργαστήριο Ellenberg (EMBL)

**GMO Status** ΓΤΟ-S1: Αυτή η ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) περιέχει μια CRISPR-σχεδιασμένη σύντηξη SNAPf-Nup358/RanBP2 που επιτρέπει την ακριβή επισήμανση των κυτταροπλασματικών ινιδίων του πυρηνικού πόρου. Η τροποποίηση ενσωματώνεται σταθερά. Αυτή η ταξινόμηση ισχύει μόνο εντός της Γερμανίας και ενδέχεται να διαφέρει αλλού.

## Βιομοριακά δεδομένα

**Protein expression** Nup358/RanBP2, ετικέτα SNAPf

## Χειρισμός

**Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/L γλυκόζη, w: σταθερή γλουταμίνη, w: 2,0 mM πυρρυνικό νάτριο, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (αριθμός άρθρου Cytion 820200a)

**Supplements** Συμπληρώστε το μέσο με 10% FBS, 3,0 g/L γλυκόζη, σταθερή γλουταμίνη, 2,0 mM πυρρυνικό νάτριο, 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1% NEAA

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Αφαιρέστε το παλιό μέσο από τα προσκολλημένα κύτταρα και πλύντε τα με PBS που δεν περιέχει ασβέστιο και μαγνήσιο. Για φιάλες T25, χρησιμοποιήστε 3-5 ml PBS και για φιάλες T75, χρησιμοποιήστε 5-10 ml. Στη συνέχεια, καλύψτε πλήρως τα κύτταρα με Accutase, χρησιμοποιώντας 1-2 ml για φιάλες T25 και 2,5 ml για φιάλες T75. Αφήστε τα κύτταρα να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 8-10 λεπτά για να αποκολληθούν. Μετά την επώαση, αναμείξτε απαλά τα κύτταρα με 10 ml μέσου για να ανασυσταθούν και, στη συνέχεια, φυγοκεντρίστε στα 300xg για 3 λεπτά. Απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό, ανασυστάστε τα κύτταρα σε φρέσκο μέσο και μεταφέρετέ τα σε νέες φιάλες που περιέχουν ήδη φρέσκο μέσο.

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

Ως μέσο κρυοσυντήρησης, χρησιμοποιούμε πλήρες μέσο ανάπτυξης (συμπεριλαμβανομένου του FBS) + 10% DMSO για επαρκή βιωσιμότητα μετά την απόψυξη, ή CM-1 (αριθμός καταλόγου Cytion 800100), το οποίο περιλαμβάνει βελτιστοποιημένα ωσμοπροστατευτικά και μεταβολικούς σταθεροποιητές για την ενίσχυση της ανάκαμψης και τη μείωση του στρες που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση.

**Thawing and Culturing Cells**

1. Επιβεβαιώστε ότι το φιαλίδιο παραμένει βαθιά παγωμένο κατά την παράδοση, καθώς τα κύτταρα αποστέλλονται σε ξηρό πάγο για να διατηρούνται οι βέλτιστες θερμοκρασίες κατά τη μεταφορά.
2. Κατά την παραλαβή, είτε αποθηκεύστε το κρυοφιαλίδιο αμέσως σε θερμοκρασίες κάτω των  $-150^{\circ}\text{C}$  για να διασφαλίσετε τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας, είτε προχωρήστε στο βήμα 3 εάν απαιτείται άμεση καλλιέργεια.
3. Για άμεση καλλιέργεια, αποψύξτε γρήγορα το φιαλίδιο βυθίζοντάς το σε υδατόλουτρο  $37^{\circ}\text{C}$  με καθαρό νερό και αντιμικροβιακό παράγοντα, αναδεύοντας απαλά για 40-60 δευτερόλεπτα μέχρι να παραμείνει ένα μικρό σβόλο πάγου.
4. Εκτελέστε όλα τα επόμενα βήματα υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε απορροφητήρα ροής, απολυμαίνοντας το κρυοφιαλίδιο με 70% αιθανόλη πριν από το άνοιγμα.
5. Ανοίξτε προσεκτικά το απολυμασμένο φιαλίδιο και μεταφέρετε το εναιώρημα των κυττάρων σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης των 15 ml που περιέχει 8 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε θερμοκρασία δωματίου, αναμειγνύοντας απαλά.
6. Φυγοκεντρίστε το μείγμα στα  $300 \times g$  για 3 λεπτά για να διαχωριστούν τα κύτταρα και απορρίψτε προσεκτικά το υπερκείμενο που περιέχει το υπόλοιπο μέσο κατάψυξης.
7. Επανασυσσωματώστε απαλά το κυτταρικό σφαιρίδιο σε 10 ml φρέσκου μέσου καλλιέργειας. Για προσκολλημένα κύτταρα, μοιράστε το εναιώρημα σε δύο φιάλες καλλιέργειας T25- για καλλιέργειες εναιωρήματος, μεταφέρετε όλο το μέσο σε μία φιάλη T25 για να προωθήσετε την αποτελεσματική αλληλεπίδραση και ανάπτυξη των κυττάρων.
8. Τηρείτε τα καθιερωμένα πρωτόκολλα υποκαλλιέργειας για τη συνεχή ανάπτυξη και διατήρηση της κυτταρικής σειράς, εξασφαλίζοντας αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα.

**Incubation Atmosphere**

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , υγραποιημένη ατμόσφαιρα.

**Flask Coating**

Κανένα

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

### Freezing Procedure

Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των  $-78^{\circ}\text{C}$  καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

### Shipping Conditions

Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των  $-78^{\circ}\text{C}$  καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

### Storage Conditions

Για μακροχρόνια συντήρηση, τοποθετήστε τα φιαλίδια σε υγρό άζωτο σε φάση ατμών σε θερμοκρασία περίπου  $-150$  έως  $-196^{\circ}\text{C}$ . Η αποθήκευση στους  $-80^{\circ}\text{C}$  είναι αποδεκτή μόνο ως σύντομο ενδιάμεσο βήμα πριν από τη μεταφορά σε υγρό άζωτο.

## Ποιοτικός έλεγχος / Γενετικό προφίλ / HLA

### Sterility

Η μόλυνση από μυκόπλασμα αποκλείεται με τη χρήση τόσο των δοκιμασιών που βασίζονται στην PCR όσο και των μεθόδων ανίχνευσης μυκοπλάσματος με βάση τη φωταύγεια.

Για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει μόλυνση από βακτήρια, μύκητες ή ζύμες, οι κυτταροκαλλιέργειες υποβάλλονται σε καθημερινές οπτικές επιθεωρήσεις.