Product sheet

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 τόπος 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 περίβλημα με μια χαρακτηριστική διάταξη σε σημεία που είναι χαρακτηριστική των κυτταροπλασματικών νηματίων 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 νουκλεοπορινών 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.
Organism	Ανθρώπινο
Tissue	Οστά
Disease	Οστεοσάρκωμα
Metastatic site	Θέση πρωτογενούς όγκου (οστό)
Applications	Βιολογία των κυτταροπλασματικών νηματίων του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων· Nup358/RanBP2 στην πυρηνική εξαγωγή που μεσολαβείται από το CRM1· κύκλος της GTPάσης Ran· οδός SUMO· συναρμολόγηση του μιτωτικού άξονα· παρακολούθηση μεμονωμένων σωματιδίων· μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης· σήμανση SNAP με τη μέθοδο «pulse-chase»· αρχιτεκτονική της κυτταροπλασματικής όψης του NPC

Χαρακτηριστικά

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

Age	15 χρόνια
Gender	Γυναίκα
Ethnicity	Καυκάσιος
Morphology	Επιθηλιοειδής
Cell type	Επιθηλιακά κύτταρα (οστεοσάρκωμα)
Growth properties	Προσκολλημένο

Ρυθμιστικά δεδομένα

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (αριθμός καταλόγου Cytion 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Δεν έχει αποδοθεί (παράγωγο U2OS τροποποιημένο με CRISPR· γονικό U2OS CVCL_0042)
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 πυρουβικό νάτριο, w: 2,2 g/L NaHCO3 (αριθμός άρθρου Cytion 820200a)

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

Supplements	Συμπληρώστε το μέσο με 10% FBS, 3,0 g/L γλυκόζη, σταθερή γλουταμίνη, 2,0 mM πυρουβικό νάτριο, 2,2 g/L NaHCO3, 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	περίπου 24 έως 36 ώρες
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.
Split ratio	1 έως 3
Seeding density	1 έως 3 × 10^4 κύτταρα/cm^2
Fluid renewal	2 έως 3 φορές την εβδομάδα
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.

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

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°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°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 x 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°C, 5%$_{CO2}$, υγροποιημένη ατμόσφαιρα.
Flask Coating	Κανένα
Freezing Procedure	Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78 °C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

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

Shipping Conditions	Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78 °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 °C. Η αποθήκευση στους -80 °C είναι αποδεκτή μόνο ως σύντομο ενδιάμεσο βήμα πριν από τη μεταφορά σε υγρό άζωτο.

Έλεγχος ποιότητας και μοριακή ανάλυση

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.