

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

Información general

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 es una línea celular de osteosarcoma humano editada genómicamente derivada de células U2OS en la que el locus endógeno RANBP2 (también conocido como NUP358) ha sido modificado por CRISPR/Cas9 para codificar una etiqueta SNAPf en marco con la proteína nativa. Nup358/RanBP2 es una nucleoporina grande localizada en los filamentos citoplasmáticos del complejo de poros nucleares (NPC) y desempeña un papel fundamental en el transporte nucleocitoplasmático, la SUMOilación y los procesos mitóticos. El etiquetado endógeno garantiza que SNAPf-Nup358 se exprese bajo el control fisiológico del promotor, manteniendo los niveles de expresión nativos y minimizando los artefactos asociados a los sistemas de sobreexpresión.

La etiqueta SNAPf es una variante de etiquetado rápido de la etiqueta SNAP que se une covalentemente a sustratos conjugados con bencilguanina, lo que permite el etiquetado fluorescente selectivo y estable de Nup358 en células vivas o fijadas. En las células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, la proteína de fusión se localiza en la envoltura nuclear con una distribución punteada característica de los filamentos NPC citoplasmáticos. Esta configuración permite realizar imágenes de fluorescencia de alta resolución, microscopía de superresolución, etiquetado por pulso-persecución y seguimiento de moléculas individuales para estudiar la arquitectura y la dinámica de los NPC. La morfología plana y los núcleos grandes de las células U2OS facilitan aún más la obtención de imágenes cuantitativas de las estructuras de la envoltura nuclear.

Este modelo permite investigar las funciones específicas de Nup358 en la exportación nuclear dependiente de CRM1/exportina, la regulación del ciclo de la GTPasa Ran y la organización espacial de las plataformas de transporte citoplasmático. Dada la participación de Nup358 en el ensamblaje del huso mitótico y la función del cinetocoro, la línea celular también es adecuada para estudiar la redistribución dependiente del ciclo celular de las nucleoporinas y el desensamblaje/reasamblaje del NPC durante la mitosis. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 proporciona una plataforma fisiológicamente relevante para diseccionar los aspectos estructurales y funcionales de la cara citoplasmática del complejo de poros nucleares en las células humanas.

Organism Humano

Tissue Hueso

Disease Osteosarcoma

Metastatic site Localización del tumor primario (hueso)

Applications Biología de los filamentos citoplasmáticos del complejo de poros nucleares; Nup358/RanBP2 en la exportación nuclear mediada por CRM1; ciclo de la GTPasa Ran; vía SUMO; ensamblaje del huso mitótico; seguimiento de partículas individuales; microscopía de superresolución; marcaje SNAP por pulso-persecución; arquitectura de la cara citoplasmática del NPC

Características

Age 15 años

Células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Gender** Mujer**Ethnicity** Caucásico**Morphology** De tipo epitelial**Cell type** Células epiteliales (osteosarcoma)**Growth properties** Adherente**Datos reglamentarios****Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (número de catálogo de Cytion 300663)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Sin asignar (derivado de U2OS modificado con CRISPR; U2OS parental CVCL_0042)**Depositor** Laboratorio Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Esta línea celular de osteosarcoma humano (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) contiene una fusión SNAPf-Nup358/RanBP2 manipulada mediante CRISPR que permite el marcaje preciso de las fibrillas citoplasmáticas del poro nuclear. La modificación está integrada de forma estable. Esta clasificación sólo se aplica en Alemania y puede diferir en otros países.**Datos biomoleculares****Protein expression** Nup358/RanBP2, SNAPf-tag**Manejo de****Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucosa, w: Glutamina estable, w: 2,0 mM Piruvato sódico, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (número de artículo de Cytion 820200a)**Supplements** Suplementar el medio con 10% FBS, 3,0 g/L de Glucosa, Glutamina estable, 2,0 mM de Piruvato sódico, 2,2 g/L de NaHCO₃, 1% de NEAA

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

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time entre 24 y 36 horas, aproximadamente

Subculturing Retire el medio antiguo de las células adheridas y lávelas con PBS que carezca de calcio y magnesio. Para matraces T25, utilice 3-5 ml de PBS, y para matraces T75, utilice 5-10 ml. A continuación, cubra completamente las células con Accutase, utilizando 1-2 ml para matraces T25 y 2,5 ml para matraces T75. Deje incubar las células a temperatura ambiente durante 8-10 minutos para desprenderlas. Tras la incubación, mezclar suavemente las células con 10 ml de medio para resuspenderlas y, a continuación, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Desechar el sobrenadante, resuspender las células en medio fresco y transferirlas a nuevos matraces que ya contengan medio fresco.

Split ratio Del 1 al 3

Seeding density De 1 a 3×10^4 células/cm²

Fluid renewal de 2 a 3 veces por semana

Freeze medium Como medio de criopreservación, utilizamos el medio de crecimiento completo (incluido FBS) + 10% DMSO para una viabilidad adecuada tras la descongelación, o CM-1 (número de catálogo 800100 de Cytion), que incluye osmoprotectores optimizados y estabilizadores metabólicos para mejorar la recuperación y reducir el estrés crioinducido.

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

Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que el vial permanece profundamente congelado en el momento de la entrega, ya que las células se envían en hielo seco para mantener temperaturas óptimas durante el transporte.
2. Tras la recepción, almacene el criovial inmediatamente a temperaturas inferiores a -150°C para garantizar la conservación de la integridad celular, o proceda al paso 3 si se requiere el cultivo inmediato.
3. Para el cultivo inmediato, descongele rápidamente el vial sumergiéndolo en un baño de agua a 37°C con agua limpia y un agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos hasta que quede un pequeño grumo de hielo.
4. Realice todos los pasos siguientes en condiciones estériles en una campana de flujo, desinfectando el criovial con etanol al 70% antes de abrirlo.
5. Abrir con cuidado el vial desinfectado y transferir la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15 ml que contenga 8 ml de medio de cultivo a temperatura ambiente, mezclando suavemente.
6. Centrifugar la mezcla a $300 \times g$ durante 3 minutos para separar las células y desechar cuidadosamente el sobrenadante que contiene medio de congelación residual.
7. Resuspender suavemente el sedimento celular en 10 ml de medio de cultivo fresco. Para las células adherentes, dividir la suspensión entre dos matraces de cultivo T25; para los cultivos en suspensión, transferir todo el medio a un matraz T25 para promover la interacción y el crecimiento celular efectivos.
8. Siga los protocolos de subcultivo establecidos para el crecimiento y mantenimiento continuos de la línea celular, garantizando resultados experimentales fiables.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , atmósfera humidificada.

Flask Coating

Ninguno

Freezing Procedure

Las líneas celulares crioconservadas se envían en hielo seco en envases validados y aislados con suficiente refrigerante para mantener aproximadamente -78°C durante el tránsito. A la recepción, inspeccione el envase inmediatamente y transfiera los viales sin demora al almacenamiento adecuado.

Shipping Conditions

Las líneas celulares crioconservadas se envían en hielo seco en envases validados y aislados con suficiente refrigerante para mantener aproximadamente -78°C durante el tránsito. A la recepción, inspeccione el envase inmediatamente y transfiera los viales sin demora al almacenamiento adecuado.

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

Storage Conditions

Para la conservación a largo plazo, coloque los viales en nitrógeno líquido en fase vapor a una temperatura aproximada de -150 a -196 °C. El almacenamiento a -80 °C sólo es aceptable como breve paso intermedio antes de la transferencia al nitrógeno líquido.

Control de calidad / Perfil genético / HLA

Sterility

La contaminación por micoplasma se excluye utilizando tanto ensayos basados en la PCR como métodos de detección de micoplasma basados en la luminiscencia.

Para garantizar la ausencia de contaminación bacteriana, fúngica o por levaduras, los cultivos celulares se someten a inspecciones visuales diarias.