

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

Üldine teave

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 on genoomi redigeeritud inimese osteosarkoomi rakuliin, mis on saadud U2OS rakkudest, milles endogeenne RANBP2 (tuntud ka kui NUP358) lokus on modifitseeritud CRISPR/Cas9 abil, et kodeerida SNAPf-märgistust raami sees koos loodusliku valguga. Nup358/RanBP2 on suur nukleoporiin, mis asub tuumapoorikompleksi (NPC) tsütoplasmaatilistes filamentides ja mängib olulist rolli nukleotsütoplasmaatilises transportis, SUMOülatsioonis ja mitootilistes protsessides. Endogeenne märgistamine tagab, et SNAPf-Nup358 ekspresseerub füsioloogilise promootori kontrolli all, säilitades loomuliku ekspresioonitaseme ja minimeerides üleekspressioonisüsteemidega seotud artefakte.

SNAPf-märgis on SNAP-märgise kiire märgistamise variant, mis seondub kovalentselt bentsüülguaniiniga konjugeeritud substraatidega, võimaldades Nup358 selektiivset ja stabiilset fluorestsentsmärgistamist elusates või fikseeritud rakkudes. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 rakkudes lokaliseerub fusioonivalk tuumaümbrise punktilise jaotumisega, mis on iseloomulik tsütoplasmaatilistele NPC filamentidele. See konfiguratsioon toetab kõrge resolutsiooniga fluorestsentskujutist, superresolutsioonilist mikroskoopi, impulss-jälgimise märgistamist ja ühe molekuli jälgimise meetodeid NPC arhitektuuri ja dünaamika uurimiseks. U2OS rakkude lame morfoloogia ja suured tuumad hõlbustavad veelgi tuumaümbrise struktuuride kvantitatiivset kujutamist.

See mudel võimaldab uurida Nup358-spetsiifilisi rolle CRM1/eksportiinist sõltuvas tuuma ekspordis, Ran GTPase tsükli regulatsioonis ja tsütoplasmaatiliste transpordialuste ruumilises korralduses. Arvestades Nup358 osalemist mitootilise varda kokkupanekus ja kinetokoordine funktsioonis, sobib rakuliin ka mitootilise tsükli sõltuva nukleoporiinide ümberjaotumise ja NPC lahtimonteerimise/taasmonteerimise uurimiseks mitootilise tsükli ajal. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 pakub füsioloogiliselt asjakohast platvormi inimrakkude tuumapoorikompleksi tsütoplasmaatilise pinna struktuuriliste ja funktsionaalsete aspektide analüüsimiseks.

Organism Inimene

Tissue Bone

Disease Osteosarkoom

Metastatic site Esmane kasvaja asukoht (luu)

Applications Tuumapoorikompleksi tsütoplasmaatiliste filamentide bioloogia; Nup358/RanBP2 CRM1-vahendatud tuumaekspordis; Ran GTPaasi tsükkel; SUMO-signaalitee; mitootilise varda moodustumine; üksikpartikli jälgimine; ülirezolutsiooniline mikroskoopia; SNAP-impulss-jälgimis-märgistamine; NPC tsütoplasmaatilise pinna arhitektuur

Omadused

Age 15 aastat

Gender Naised

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

Ethnicity	Kaukaasia
Morphology	Epiteelilaadsed
Cell type	Epiteelrakud (osteosarkoom)
Growth properties	Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytioni katalooginumber 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Määramata (CRISPR-ga modifitseeritud U2OS-derivaat; algne U2OS CVCL_0042)
Depositor	Ellenbergi labor (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: See inimese osteosarkoomi rakuliin (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) sisaldab CRISPR-i abil loodud SNAPf-Nup358/RanBP2 fusiooni, mis võimaldab tuumapooride tsütoplasmafibrillide täpset märgistamist. Modifikatsioon on stabiilselt integreeritud. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

Biomolekulaarsed andmed

Protein expression	Nup358/RanBP2, SNAPf-tag
---------------------------	--------------------------

Töötlemine

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L glükoos, w: stabiilne glutamiin, w: 2,0 mM naatriumpüruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytioni artikli number 820200a)
Supplements	Täiendada söötme 10% FBS, 3,0 g/L glükoosi, stabiilse glutamiini, 2,0 mM naatriumpüruvaadi, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1% NEAaga
Dissociation Reagent	Accutase

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

Doubling time umbes 24–36 tundi

Subculturing Eemaldage kleepunud rakkudelt vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspenseerida, seejärel tsentrifugeerige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.

Split ratio 1-3

Seeding density $1-3 \times 10^4$ rakku/cm²

Fluid renewal 2 kuni 3 korda nädalas

Freeze medium Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumbriga 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 rakud | 300663**Thawing and
Culturing Cells**

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viali kiiresti, kastes selle $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud viali ettevaatlikult ja viige raku suspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu $300 \times g$ juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

**Incubation
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , niisutatud atmosfäär.

Flask Coating

Puudub

**Freezing
Procedure**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

**Shipping
Conditions**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

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

Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA

Sterility

Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminestsentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.