

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

## Yleisiä tietoja

## Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 on genomini muokattu ihmisen osteosarkoomasolulinja, joka on peräisin U2OS-soluista, joissa endogeeninen RANBP2-lokus (tunnetaan myös nimellä NUP358) on muokattu CRISPR/Cas9:llä koodaamaan SNAPf-tunnisteen natiiviproteiinin kanssa samassa kehyksessä. Nup358/RanBP2 on suuri nukleoporiini, joka sijaitsee tumaporekompleksin (NPC) sytoplasmassa ja jolla on tärkeä rooli tumasoluliman kuljetuksessa, SUMOylaatiassa ja mitoottisissa prosesseissa. Endogeeninen merkintä varmistaa, että SNAPf-Nup358 ilmenee fysiologisen promoottorin ohjauksessa, säilyttäen natiivin ilmentymistason ja minimoiden yli-ilmentymisjärjestelmään liittyvät artefaktit.

SNAPf-tag on SNAP-tagin nopeasti leimautuva variantti, joka sitoutuu kovalenttisesti bentsyyliguaninikonjugoitujen substraattien kanssa, mikä mahdollistaa Nup358:n selektiivisen ja stabiilin fluoresoivan leimautumisen elävissä tai kiinnitetyissä soluissa. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-soluissa fuusioproteiini lokalisoituu tumakoteloon pisteittäisenä jakautumana, joka on tyypillistä sytoplasmisten NPC-filamenttien jakautumiselle. Tämä konfiguraatio tukee korkean resoluution fluoresenssikuvantamista, superresoluutiomikroskopiaa, pulssin-jahdin merkintää ja yksittäisten molekyylien seuranta NPC:n arkkitehtuurin ja dynamiikan tutkimiseksi. U2OS-solujen tasainen morfologia ja suuret tumat helpottavat edelleen tumakalvon rakenteiden kvantitatiivista kuvantamista.

Tämä malli mahdollistaa Nup358:n spesifisten roolien tutkimisen CRM1/eksportiiniriippuvaisessa ydintuonnissa, Ran GTPase -syklin säätelyssä ja sytoplasmisten kuljetusalustojen spatiaalisessa organisoinnissa. Koska Nup358 osallistuu mitoosikierukan kokoonpanoon ja kinetokoorin toimintaan, solulinja soveltuu myös solusyklistä riippuvan nukleoporiinien uudelleenjakautumisen ja NPC:n purkamisen/uudelleenrakentamisen tutkimiseen mitoosissa. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 tarjoaa fysiologisesti merkityksellisen alustan ihmisen solujen ydinporikompleksin sytoplasmisen pinnan rakenteellisten ja toiminnallisten näkökohtien tutkimiseen.

**Organism** Ihminen

**Tissue** Luu

**Disease** Osteosarkooma

## Ominaisuudet

**Age** 15 vuotta

**Gender** Nainen

**Ethnicity** Kaukasialainen

**Morphology** Epiteelin kaltainen

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

**Growth properties** Tarttuva

## Säätelytiedot

**Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytionin luettelonumero 300663)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**Depositor** Ellenbergin laboratorio (EMBL)

**GMO Status** GMO-S1: Tämä ihmisen osteosarkoomasolulinja (U2OS-CRISPR-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) sisältää CRISPR-tekniikalla muunnetun SNAPf-Nup358/RanBP2-fuusion, joka mahdollistaa ydinporin sytoplasman fibrillien tarkan merkitsemisen. Muunnos on vakaasti integroitu. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

## Biomolekyyli tiedot

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

## Käsittely

**Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukoosia, w: vakaa glutamiini, w: 2,0 mM natriumpyruvaattia, w: 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub> (Cytionin artikkelinumero 820200a)

**Supplements** Täydennetään elatusainetta 10 % FBS:llä, 3,0 g/l glukoosilla, stabiililla glutamiinilla, 2,0 mM natriumpyruvaatilla, 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>:lla, 1 % NEAA:lla

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreessa väliaineessa ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

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

Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotectantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

**Thawing and Culturing Cells**

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanotettaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja antimikrobista ainetta, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisellä etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvia, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

**Incubation Atmosphere**

37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , kostutettu ilmakehä.

**Flask Coating**

Ei mitään

**Freezing Procedure**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

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

### Shipping Conditions

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäässä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

### Storage Conditions

Pitkäaikaisäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

## Laadunvalvonta / Geneettinen profiili / HLA

### Sterility

Mykoplasmakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrityksillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.