

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**Metastatic site** Ensijainen kasvaimen sijainti (luu)**Applications** Ydinporikompleksin sytoplasmisten filamenttien biologia; Nup358/RanBP2 CRM1-välitteisessä ydinpoistossa; Ran-GTPaasi-sykli; SUMO-reitti; mitoottisen spindelin muodostuminen; yksittäisen partikkelin seuranta; superresoluutiomikroskopia; SNAP-pulse-chase-leimaus; NPC:n sytoplasmisen pinnan rakenne**Ominaisuudet****Age** 15 vuotta**Gender** Nainen

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

Ethnicity	Kaukasialainen
Morphology	Epiteelin kaltainen
Cell type	Epiteelisolut (osteosarkooma)
Growth properties	Tarttuva

Säätelytiedot

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytionin luettelonumero 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Ei määritelty (CRISPR-muunnettu U2OS-johdannainen; emokanta U2OS CVCL_0042)
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 sytoplasmian fibrillien tarkan merkitsemisen. Muunnos on vakaasti integroitu. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

Biomolekyyli tiedot

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

Käsittely

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukoosia, w: vakaa glutamiini, w: 2,0 mM natriumpyruvaattia, w: 2,2 g/l NaHCO ₃ (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 ₃ :lla, 1 % NEAA:lla
Dissociation Reagent	Accutase

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

Doubling time noin 24–36 tuntia

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.

Split ratio 1–3

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

Fluid renewal 2-3 kertaa viikossa

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.

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

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäässä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanottaessa 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 jäästä 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 % CO_2 , kostutettu ilmakehä.

Flask Coating

Ei mitään

**Freezing
Procedure**

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.

**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.

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

Storage Conditions

Pitkäaikaissäilytystä 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 määrittelyillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

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