

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

Általános információk

Description

Az U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 egy genomszerkesztett humán osteosarcoma sejtvonal, amely U2OS sejtekből származik, és amelyben az endogén RANBP2 (más néven NUP358) lókuszt CRISPR/Cas9 segítségével módosításra került, hogy a natív fehérjével in-frame SNAPf tagot kódoljon. A Nup358/RanBP2 egy nagy nukleoporin, amely a nukleáris pórus komplex (NPC) citoplazmatikus filamentumaiban lokalizálódik, és kritikus szerepet játszik a nukleocitoplazmatikus transzportban, a SUMOylációban és a mitotikus folyamatokban. Az endogén címkézés biztosítja, hogy a SNAPf-Nup358 fiziológiai promóter kontroll alatt expresszáldjon, fenntartva a natív expressziós szinteket és minimalizálva a túlzott expressziós rendszerekkel kapcsolatos artefaktokat.

A SNAPf tag a SNAP-tag gyors jelölő változata, amely kovalens kötéssel kapcsolódik a benzilguanin-konjugált szubsztrátokhoz, lehetővé téve a Nup358 szelektív és stabil fluoreszcens jelölését élő vagy fixált sejtekben. Az U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 sejtekben a fúziós fehérje a citoplazmatikus NPC filamentumokra jellemző pontszerű eloszlásban lokalizálódik a sejtmag membránján. Ez a konfiguráció támogatja a nagy felbontású fluoreszcens képalkotást, a szuperfelbontású mikroszkópiát, a pulzus-üldözéssel jelölést és az egyedi molekulák nyomon követését az NPC architektúrájának és dinamikájának tanulmányozása érdekében. Az U2OS sejtek lapos morfológiája és nagy magjai tovább megkönnyítik a magmembrán struktúráinak kvantitatív képalkotását.

Ez a modell lehetővé teszi a Nup358-specifikus szerepek vizsgálatát a CRM1/exportin-függő nukleáris exportban, a Ran GTPáz ciklus szabályozásában és a citoplazmatikus transzportplatformok térbeli szerveződésében. Tekintettel a Nup358 részvételére a mitotikus orsó szerkezet összeállításában és a kinetokór funkciójában, a sejtvonal alkalmas a sejtciklus-függő nukleoporinek újraeloszlásának és az NPC szétszerelésének/újraösszeszerelésének vizsgálatára is a mitózis során. Az U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 fiziológiailag releváns platformot biztosít az emberi sejtekben található nukleáris pórus komplex citoplazmatikus felületének szerkezeti és funkcionális aspektusainak elemzéséhez.

Organism Emberi

Tissue Csont

Disease Osteosarcoma

Jellemzők

Age 15 év

Gender Női

Ethnicity Kaukázusi

Morphology Epithelszerű

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

Growth properties Adherent

Szabályozási adatok

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytion katalógusszám 300663)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Az Ellenberg Labor (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Ez a humán oszteoszarkóma sejtvonala (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) egy CRISPR által módosított SNAPf-Nup358/RanBP2 fúziót tartalmaz, amely lehetővé teszi a nukleáris pórus citoplazmatikus fibrillumok pontos jelölését. A módosítás stabilan integrálódik. Ez a besorolás csak Németországban érvényes, máshol ettől eltérhet.

Biomolekuláris adatok

Protein expression Nup358/RanBP2, SNAPf-tag

A kezelése

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/L glükóz, w: stabil glutamin, w: 2,0 mM nátrium-piruvát, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (Cytion cikkszám: 820200a)

Supplements A táptalajt egészítsük ki 10% FBS-szel, 3,0 g/L glükózzal, stabil glutaminnal, 2,0 mM nátrium-piruváttal, 2,2 g/L NaHCO₃-mal, 1% NEAA-val

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Távolítsa el a régi táptalajt a megtapadt sejtekről, és mossa őket kalcium- és magnéziummentes PBS-szel. T25-ös lombikokhoz 3-5 ml PBS-t, T75-ös lombikokhoz pedig 5-10 ml-t használjunk. Ezután fedjük be a sejteket teljesen Accutase-zal, T25 lombikok esetében 1-2 ml-t, T75 lombikok esetében 2,5 ml-t használva. A sejteket 8-10 percig hagyjuk szobahőmérsékleten inkubálni, hogy leváljanak. Az inkubálás után óvatosan keverjük össze a sejteket 10 ml tápfolyadékkal, hogy reszuszpendáljuk őket, majd centrifugáljuk 300xg-nél 3 percig. Dobja el a felülúszót, szuszpendálja újra a sejteket friss tápfolyadékban, és helyezze át őket új lombikokba, amelyek már friss tápfolyadékot tartalmaznak.

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

Krioprezerváló táptalajként teljes növekedési táptalajt (beleértve az FBS-t) + 10% DMSO-t használunk a megfelelő kiolvasztás utáni életképesség érdekében, vagy CM-1-et (Cytion katalógusszám: 800100), amely optimalizált ozmoprotektánsokat és metabolikus stabilizátorokat tartalmaz a regenerálódás fokozása és a krio-indukált stressz csökkentése érdekében.

Thawing and Culturing Cells

1. Ellenőrizze, hogy az injekciós üveg a szállításkor mélyhűtött marad-e, mivel a sejteket szárazjégen szállítják, hogy a szállítás során az optimális hőmérsékletet fenntartsák.
2. Átvételt követően vagy azonnal tárolja a krioampullát $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatti hőmérsékleten a sejtek integritásának megőrzése érdekében, vagy folytassa a 3. lépéssel, ha azonnali tenyésztésre van szükség.
3. Azonnali tenyésztés esetén gyorsan fel kell olvasztani az injekciós üveget úgy, hogy tiszta vízzel és antimikrobiális szerrel ellátott $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe merítjük, és 40-60 másodpercig óvatosan kevergetjük, amíg egy kis jégcsomó nem marad.
4. Az összes további lépést steril körülmények között, áramlásos elszívóban végezzük el, és nyitás előtt fertőtlenítsük a krioüveget 70%-os etanollal.
5. Óvatosan nyissa fel a fertőtlenített fiolát, és a sejtszuszpenziót óvatosan összekeverve helyezze át egy 15 ml-es centrifugacsőbe, amely 8 ml szobahőmérsékletű táptalajt tartalmaz.
6. Centrifugáljuk az elegyet $300 \times g$ -n 3 percig a sejtek szétválasztásához, és óvatosan dobjuk el a maradék fagyasztóközeget tartalmazó felülúszót.
7. Óvatosan szuszpendáljuk újra a sejtanyagot 10 ml friss táptalajban. Adhezív sejtek esetében ossza a szuszpenziót két T25-ös tenyésztőlombik között; szuszpenziós kultúrák esetében az összes tápfolyadékot tegye át egy T25-ös lombikba a hatékony sejt-kölcsönhatás és növekedés elősegítése érdekében.
8. A sejtvonal folyamatos növekedése és fenntartása érdekében tartsa be a megállapított szubkultúra protokollokat, biztosítva a megbízható kísérleti eredményeket.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , párasított légkör.

Flask Coating

Nincs

Freezing Procedure

A kriokonzervált sejtvonalakat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

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

Shipping Conditions

A kriokonzervált sejtvonalatokat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

Storage Conditions

Hosszú távú tartósítás céljából helyezze az üvegeket gőzfázisú folyékony nitrogénbe, körülbelül -150 és $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten. A $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolás csak rövid átmeneti lépésként fogadható el a folyékony nitrogénbe való átvitel előtt.

Minőségellenőrzés / Genetikai profil / HLA

Sterility

A mikoplazma-szennyeződést mind a PCR-alapú vizsgálatokkal, mind a lumineszcencia-alapú mikoplazma-kimutatási módszerekkel kizárják.

A bakteriális, gombás vagy élesztőgombás szennyeződés elkerülése érdekében a sejt kultúrákat napi vizuális ellenőrzésnek vetik alá.