

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

Informasi umum

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 adalah garis sel osteosarcoma manusia yang dimodifikasi genomnya, yang berasal dari sel U2OS, di mana lokus RANBP2 (juga dikenal sebagai NUP358) yang endogen telah dimodifikasi menggunakan CRISPR/Cas9 untuk mengkodekan tag SNAPf yang berada dalam bingkai dengan protein asli. Nup358/RanBP2 adalah nukleoporin besar yang berlokasi pada filamen sitoplasma kompleks pori nukleus (NPC) dan memainkan peran kritis dalam transportasi nukleositosoplasma, SUMOylasi, dan proses mitosis. Penandaan endogen memastikan bahwa SNAPf-Nup358 diekspresikan di bawah kendali promotor fisiologis, mempertahankan tingkat ekspresi asli dan meminimalkan artefak yang terkait dengan sistem overekspresi.

Tag SNAPf adalah varian penandaan cepat dari tag SNAP yang secara kovalen mengikat substrat yang dikonjugasi dengan benzylguanine, memungkinkan penandaan fluoresen selektif dan stabil pada Nup358 di sel hidup atau yang telah difiksasi. Pada sel U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, protein fusi ini berlokasi di selubung nukleus dengan distribusi bercak yang khas dari filamen NPC sitoplasmik. Konfigurasi ini mendukung pencitraan fluoresensi beresolusi tinggi, mikroskopi super-resolusi, penandaan pulse-chase, dan pendekatan pelacakan molekul tunggal untuk mempelajari arsitektur dan dinamika NPC. Morfologi datar dan nukleus besar sel U2OS lebih lanjut memudahkan pencitraan kuantitatif struktur selubung nukleus.

Model ini memungkinkan penyelidikan peran spesifik Nup358 dalam ekspor nuklear yang bergantung pada CRM1/exportin, regulasi siklus GTPase Ran, dan organisasi spasial platform transportasi sitoplasma. Mengingat keterlibatan Nup358 dalam perakitan spindel mitosis dan fungsi kinetokor, garis sel ini juga cocok untuk mempelajari redistribusi nukleoporin yang bergantung pada siklus sel dan perakitan/pembongkaran NPC selama mitosis. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 menyediakan platform yang relevan secara fisiologis untuk menganalisis aspek struktural dan fungsional dari sisi sitoplasma kompleks pori nukleus pada sel manusia.

Organism Manusia

Tissue Tulang

Disease Osteosarkoma

Karakteristik

Age 15 tahun

Gender Perempuan

Ethnicity Kaukasia

Morphology Seperti epitel

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

Growth properties Patuh

Data Peraturan

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

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Laboratorium Ellenberg (Ellenberg Lab) (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Garis sel osteosarkoma manusia ini (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) mengandung fusi SNAPf-Nup358/RanBP2 hasil rekayasa CRISPR yang memungkinkan pelabelan yang tepat untuk fibril sitoplasma pori-pori nuklir. Modifikasi ini terintegrasi secara stabil. Klasifikasi ini hanya berlaku di Jerman dan mungkin berbeda di tempat lain.

Data Biomolekuler

Protein expression Nup358/RanBP2, SNAPf-tag

Penanganan

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glukosa, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natrium piruvat, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (Nomor artikel Cytion 820200a)

Supplements Lengkapi media dengan 10% FBS, 3,0 g/L Glukosa, Glutamin stabil, 2,0 mM Natrium piruvat, 2,2 g/L NaHCO₃, 1% NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Buang media lama dari sel yang melekat dan cuci dengan PBS yang tidak mengandung kalsium dan magnesium. Untuk labu T25, gunakan 3-5 ml PBS, dan untuk labu T75, gunakan 5-10 ml. Kemudian, tutupi sel sepenuhnya dengan Accutase, menggunakan 1-2 ml untuk labu T25 dan 2,5 ml untuk labu T75. Biarkan sel diinkubasi pada suhu kamar selama 8-10 menit untuk melepaskannya. Setelah inkubasi, campurkan sel secara perlahan dengan 10 ml medium untuk meresuspensi sel, kemudian sentrifugasi pada 300xg selama 3 menit. Buang supernatan, resuspensi sel dalam medium segar, dan pindahkan ke dalam labu baru yang sudah berisi medium segar.

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

Sebagai media kriopreservasi, kami menggunakan media pertumbuhan lengkap (termasuk FBS) + 10% DMSO untuk viabilitas pasca-pencairan yang memadai, atau CM-1 (nomor katalog Cytion 800100), yang mencakup osmoprotektan yang dioptimalkan dan penstabil metabolisme untuk meningkatkan pemulihan dan mengurangi stres yang diinduksi kriopreservasi.

Thawing and Culturing Cells

1. Pastikan botol tetap dalam keadaan beku pada saat pengiriman, karena sel dikirim dengan es kering untuk mempertahankan suhu optimal selama perjalanan.
2. Setelah diterima, segera simpan cryovial pada suhu di bawah -150°C untuk memastikan pelestarian integritas sel, atau lanjutkan ke langkah 3 jika kultur segera diperlukan.
3. Untuk kultur segera, segera cairkan botol dengan merendamnya dalam penangas air bersuhu 37°C dengan air bersih dan agen antimikroba, aduk perlahan selama 40-60 detik hingga gumpalan es kecil tetap ada.
4. Lakukan semua langkah selanjutnya dalam kondisi steril di dalam tudung alir, desinfektan kriovial dengan etanol 70% sebelum dibuka.
5. Buka botol yang telah didesinfeksi dengan hati-hati dan pindahkan suspensi sel ke dalam tabung sentrifugasi 15 ml yang berisi 8 ml media kultur suhu kamar, aduk perlahan.
6. Sentrifus campuran pada $300 \times g$ selama 3 menit untuk memisahkan sel dan dengan hati-hati membuang supernatan yang mengandung sisa media pembekuan.
7. Resuspensi pelet sel dengan hati-hati dalam 10 ml medium kultur segar. Untuk sel yang melekat, bagi suspensi di antara dua labu kultur T25; untuk kultur suspensi, pindahkan semua media ke dalam satu labu T25 untuk mendorong interaksi dan pertumbuhan sel yang efektif.
8. Patuhi protokol subkultur yang telah ditetapkan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan garis sel yang berkelanjutan, memastikan hasil eksperimental yang andal.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , atmosfer yang dilembabkan.

Flask Coating

Tidak ada

Freezing Procedure

Lini sel kriopreservasi dikirim di atas es kering dalam kemasan terisolasi yang divalidasi dengan refrigeran yang cukup untuk mempertahankan suhu sekitar -78°C selama perjalanan. Setelah diterima, segera periksa wadah dan pindahkan botol tanpa penundaan ke tempat penyimpanan yang sesuai.

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

Shipping Conditions

Lini sel kriopreservasi dikirim di atas es kering dalam kemasan terisolasi yang divalidasi dengan refrigeran yang cukup untuk mempertahankan suhu sekitar -78°C selama perjalanan. Setelah diterima, segera periksa wadah dan pindahkan botol tanpa penundaan ke tempat penyimpanan yang sesuai.

Storage Conditions

Untuk pengawetan jangka panjang, tempatkan botol dalam nitrogen cair fase uap pada suhu sekitar -150 hingga -196°C . Penyimpanan pada suhu -80°C hanya dapat diterima sebagai langkah sementara sebelum dipindahkan ke nitrogen cair.

Kontrol kualitas / Profil genetik / HLA

Sterility

Kontaminasi mikoplasma disingkirkan dengan menggunakan tes berbasis PCR dan metode deteksi mikoplasma berbasis pendaran.

Untuk memastikan tidak ada kontaminasi bakteri, jamur, atau ragi, kultur sel menjalani inspeksi visual setiap hari.