

Cellule U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Informazioni generali****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 è una linea cellulare di osteosarcoma umano modificata genomicamente derivata dalle cellule U2OS in cui il locus endogeno RANBP2 (noto anche come NUP358) è stato modificato da CRISPR/Cas9 per codificare un tag SNAPf in frame con la proteina nativa. Nup358/RanBP2 è una grande nucleoporina localizzata nei filamenti citoplasmatici del complesso dei pori nucleari (NPC) e svolge un ruolo fondamentale nel trasporto nucleocitoplasmatico, nella SUMOilazione e nei processi mitotici. Il tagging endogeno assicura che SNAPf-Nup358 sia espresso sotto il controllo fisiologico del promotore, mantenendo i livelli di espressione nativi e riducendo al minimo gli artefatti associati ai sistemi di sovraespressione.

Il tag SNAPf è una variante a marcatura rapida del tag SNAP che si lega in modo covalente ai substrati coniugati con benzilguanina, consentendo una marcatura fluorescente selettiva e stabile di Nup358 in cellule vive o fissate. Nelle cellule U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, la proteina di fusione si localizza nell'involucro nucleare con una distribuzione puntiforme caratteristica dei filamenti NPC citoplasmatici. Questa configurazione supporta l'imaging a fluorescenza ad alta risoluzione, la microscopia a super risoluzione, l'etichettatura pulse-chase e gli approcci di tracciamento di singole molecole per studiare l'architettura e la dinamica dell'NPC. La morfologia piatta e i nuclei di grandi dimensioni delle cellule U2OS facilitano ulteriormente l'imaging quantitativo delle strutture dell'involucro nucleare.

Questo modello consente di studiare i ruoli specifici di Nup358 nell'esportazione nucleare dipendente da CRM1/esportina, nella regolazione del ciclo della GTPasi Ran e nell'organizzazione spaziale delle piattaforme di trasporto citoplasmatico. Data la partecipazione di Nup358 nell'assemblaggio del fuso mitotico e nella funzione del cinetocoro, la linea cellulare è adatta anche allo studio della redistribuzione delle nucleoporine dipendente dal ciclo cellulare e del disassemblaggio/riassemblaggio dell'NPC durante la mitosi. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 fornisce una piattaforma fisiologicamente rilevante per analizzare gli aspetti strutturali e funzionali della faccia citoplasmatica del complesso dei pori nucleari nelle cellule umane.

Organism Umano**Tissue** Osso**Disease** Osteosarcoma**Caratteristiche****Age** 15 anni**Gender** Donna**Ethnicity** Caucasico**Morphology** Simile all'epitelio

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

Growth properties Aderente

Dati normativi

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

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Il laboratorio Ellenberg (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Questa linea cellulare di osteosarcoma umano (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) contiene una fusione SNAPf-Nup358/RanBP2 ingegnerizzata con CRISPR che consente un'etichettatura precisa delle fibrille citoplasmatiche del poro nucleare. La modifica è integrata in modo stabile. Questa classificazione si applica solo in Germania e può differire altrove.

Dati biomolecolari

Protein expression Nup358/RanBP2, etichetta SNAPf

Manipolazione

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucosio, w: Glutammina stabile, w: 2,0 mM Sodio piruvato, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (articolo Cytion numero 820200a)

Supplements Integrare il terreno di coltura con 10% FBS, 3,0 g/L di glucosio, Glutammina stabile, 2,0 mM di piruvato di sodio, 2,2 g/L di NaHCO₃, 1% di NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Rimuovere il vecchio terreno dalle cellule aderenti e lavarle con PBS privo di calcio e magnesio. Per le fiasche T25, utilizzare 3-5 ml di PBS e per le fiasche T75, 5-10 ml. Quindi, coprire completamente le cellule con Accutase, utilizzando 1-2 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75. Lasciare incubare le cellule a temperatura ambiente per 8-10 minuti per staccarle. Dopo l'incubazione, mescolare delicatamente le cellule con 10 ml di terreno per risospenderle, quindi centrifugare a 300xg per 3 minuti. Scartare il surnatante, risospendere le cellule in terreno fresco e trasferirle in nuove fiasche contenenti terreno fresco.

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

Freeze medium

Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo (incluso FBS) + 10% DMSO per un'adeguata vitalità post-scongelamento, o CM-1 (numero di catalogo Cytion 800100), che include osmoprotettori e stabilizzatori metabolici ottimizzati per migliorare il recupero e ridurre lo stress crio-indotto.

Thawing and Culturing Cells

1. Verificare che la fiala rimanga profondamente congelata al momento della consegna, poiché le cellule vengono spedite con ghiaccio secco per mantenere le temperature ottimali durante il trasporto.
2. Al ricevimento, conservare immediatamente la criovial a temperature inferiori a -150°C per garantire la conservazione dell'integrità cellulare, oppure procedere al punto 3 se è necessaria una coltura immediata.
3. Per la coltura immediata, scongelare rapidamente la fiala immergendola in un bagno d'acqua a 37°C con acqua pulita e un agente antimicrobico, agitando delicatamente per 40-60 secondi finché non rimane un piccolo grumo di ghiaccio.
4. Eseguire tutte le fasi successive in condizioni di sterilità in una cappa a flusso, disinfettando la criovial con etanolo al 70% prima dell'apertura.
5. Aprire con cautela la fiala disinfettata e trasferire la sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente 8 ml di terreno di coltura a temperatura ambiente, mescolando delicatamente.
6. Centrifugare la miscela a 300 x g per 3 minuti per separare le cellule e scartare con cura il surnatante contenente il terreno di coltura residuo.
7. Risospendere delicatamente il pellet cellulare in 10 ml di terreno di coltura fresco. Per le cellule aderenti, dividere la sospensione tra due fiasche di coltura T25; per le colture in sospensione, trasferire tutto il terreno in una fiasca T25 per promuovere l'interazione e la crescita delle cellule.
8. Attenersi ai protocolli di subcoltura stabiliti per la crescita e il mantenimento continui della linea cellulare, garantendo risultati sperimentali affidabili.

Incubation Atmosphere

37°C, 5%_{CO2}, atmosfera umidificata.

Flask Coating

Nessuno

Freezing Procedure

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

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

Shipping Conditions

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Storage Conditions

Per la conservazione a lungo termine, porre le fiale in azoto liquido in fase vapore a una temperatura compresa tra -150 e -196 °C circa. La conservazione a -80 °C è accettabile solo come breve fase intermedia prima del trasferimento in azoto liquido.

Controllo di qualità / Profilo genetico / HLA

Sterility

La contaminazione da micoplasma viene esclusa utilizzando sia saggi basati sulla PCR sia metodi di rilevamento del micoplasma basati sulla luminescenza.

Per garantire l'assenza di contaminazione batterica, fungina o da lieviti, le colture cellulari sono sottoposte a ispezioni visive quotidiane.