

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

Bendra informacija

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 yra genomo redaguota žmogaus osteosarkomos ląstelių linija, gauta iš U2OS ląstelių, kuriose endogeninis RANBP2 (taip pat žinomas kaip NUP358) lokusas buvo modifikuotas CRISPR/Cas9, kad koduotų SNAPf žymę, suderintą su natūraliu baltymu. Nup358/RanBP2 yra didelis nukleoporinas, lokalizuotas branduolinio porų komplekso (NPC) citoplazminiuose filamentuose ir atliekantis svarbų vaidmenį branduolinio-citoplazminio transporte, SUMOiliacijoje ir mitozės procesuose. Endogeninis žymėjimas užtikrina, kad SNAPf-Nup358 būtų ekspresuojamas fiziologinio promotoriaus kontrole, išlaikant natūralius ekspresijos lygius ir sumažinant artefaktus, susijusius su pernelyg didelės ekspresijos sistemomis.

SNAPf žymė yra greito žymėjimo SNAP žymės variantas, kuris kovalentiškai jungiasi su benzylguano konjuguotais substratais, leidžiantis selektyviai ir stabiliai fluorescenciniu būdu žymėti Nup358 gyvose arba fiksuotose ląstelėse. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 ląstelėse jungtinis baltymas lokalizuojasi branduolinėje apvalkale, būdingoje citoplazminių NPC filamentų punktualiai pasiskirstymui. Ši konfigūracija palaiko aukštos skiriamosios gebos fluorescencinį vaizdavimą, super skiriamosios gebos mikroskopiją, impulsų-persekiojimo žymėjimą ir vienos molekulės sekimo metodus, skirtus NPC architektūros ir dinamikos tyrimams. Plokščia morfologija ir dideli U2OS ląstelių branduoliai dar labiau palengvina branduolinės apvalkalo struktūrų kiekybinį vaizdavimą.

Šis modelis leidžia tirti Nup358 specifines funkcijas CRM1/eksportino priklausomame branduolinio eksporto procese, Ran GTPazės ciklo reguliacijoje ir citoplazminių transporto platformų erdvinėje organizacijoje. Atsižvelgiant į Nup358 dalyvavimą mitozinio verpstės surinkime ir kinetochoro funkcionavime, ląstelių linija taip pat tinka tirti ląstelių ciklo priklausomą nukleoporinų perskirstymą ir NPC išardymą/surinkimą mitozės metu. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 suteikia fiziologiškai reikšmingą platformą žmogaus ląstelių branduolinio porų komplekso citoplazminės pusės struktūrinių ir funkcinių aspektų analizei.

Organism Žmogus

Tissue Kaulas

Disease Osteosarkoma

Metastatic site Pirminio naviko lokalizacija (kaulai)

Applications Branduolinio porų komplekso citoplazminių gijų biologija; Nup358/RanBP2 CRM1 reguliuojamame branduolinio eksporto procese; Ran GTPazės ciklas; SUMO kelias; mitozinio verpstės susidarymas; vienos dalelės sekimas; superrezoliucijos mikroskopija; SNAP „pulse-chase“ žymėjimas; NPC citoplazminės pusės architektūra

Charakteristikos

Age 15 metų

Gender Moteris

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

Ethnicity	Kaukaziėčių
Morphology	Į epitelį panašus
Cell type	Epitelio ląstelės (osteosarkoma)
Growth properties	Priglundęs

Reguliavimo duomenys

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytion katalogo numeris 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Nepaskirtas (CRISPR modifikuotas U2OS darinys; pirminis U2OS CVCL_0042)
Depositor	Ellenbergo laboratorija (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: šioje žmogaus osteosarkomos ląstelių linijoje (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) yra CRISPR sukurta SNAPf-Nup358/RanBP2 sintezė, leidžianti tiksliai žymėti branduolio poros citoplazmos skaidulas. Modifikacija yra stabiliai integruota. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir gali skirtis kitose šalyse.

Biomolekuliniai duomenys

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

Tvarkymas

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/l gliukozės, w: stabilus glutaminas, w: 2,0 mM natrio piruvatas, w: 2,2 g/l NaHCO ₃ (Cytion gaminio numeris 820200a)
Supplements	Papildykite terpę 10 % FBS, 3,0 g/l gliukozės, stabilium glutaminu, 2,0 mM natrio piruvato, 2,2 g/l NaHCO ₃ , 1 % NEAA
Dissociation Reagent	Accutase

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

Doubling time maždaug nuo 24 iki 36 valandų

Subculturing Pašalinkite seną terpę nuo prilipusių ląstelių ir nuplaukite jas PBS, kuriame nėra kalcio ir magnio. T25 kolboms naudokite 3-5 ml PBS, o T75 kolboms - 5-10 ml. Tuomet visiškai užpilkite ląsteles "Accutase", naudodami 1-2 ml T25 kolboms ir 2,5 ml T75 kolboms. Leiskite ląstelėms inkubuotis kambario temperatūroje 8-10 minučių, kad jos atsiskirtų. Po inkubacijos atsargiai sumaišykite ląsteles su 10 ml terpės, kad jos vėl suspenduotų, tada 3 minutes centrifuguokite 300xg greičiu. Išmeskite supernatantą, vėl sutirpinkite ląsteles šviežioje terpėje ir perkeltite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.

Split ratio 1-3

Seeding density nuo 1 iki 3×10^4 ląstelių/cm²

Fluid renewal 2-3 kartus per savaitę

Freeze medium Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę (įskaitant FBS) + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo, arba CM-1 (Cytion katalogo numeris 800100), kurioje yra optimizuotų osmoprotektorių ir medžiagų apykaitos stabilizatorių, kad būtų pagerintas atsigavimas ir sumažintas kriokonservavimo sukeltas stresas.

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

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei -150°C temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į 37°C temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 300 x g greičiu 3 minutes, kad atsiskirtų ląstelės, ir atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpės likučiais.
7. Švelniai resuspenduokite ląstelių granules 10 ml šviežios mitybinės terpės. Jei ląstelės yra prigludusios, suspensiją padalykite į dvi T25 kolbas; jei tai suspensinės kultūros, visą terpę perkelti į vieną T25 kolbą, kad paskatintumėte veiksmingą ląstelių sąveiką ir augimą.
8. Laikykitės nustatytų subkultūrų protokolų, kad ląstelių linija nuolat augtų ir būtų palaikoma, taip užtikrinant patikimus eksperimentų rezultatus.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5 % CO_2 , drėkintoje atmosferoje.

Flask Coating

Nėra

**Freezing
Procedure**

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug -78°C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

**Shipping
Conditions**

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug -78°C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

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

Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug -150-196 °C temperatūroje. Laikymas -80 °C temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeliant į skystą azotą.

Kokybės kontrolė / Genetinis profilis / HLA

Sterility

Mikoplazmos užterštumas atmetamas taikant PGR pagrįstus tyrimus ir liuminescencinius mikoplazmos aptikimo metodus.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų užteršimo bakterijomis, grybeliais ar mielėmis, ląstelių kultūros kasdien vizualiai tikrinamos.