

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

Vispārīga informācija

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 ir genomā rediģēta cilvēka osteosarkomas šūnu līnija, kas iegūta no U2OS šūnām, kurās endogēnais RANBP2 (pazīstams arī kā NUP358) lokuss ir modificēts ar CRISPR/Cas9, lai kodētu SNAPf marķieri in-frame ar dabisko proteīnu. Nup358/RanBP2 ir liels nukleoporīns, kas lokalizēts kodola poru kompleksa (NPC) citoplazmatiskajos filamentos un spēlē svarīgu lomu nukleocitoplazmatiskajā transportā, SUMOilācijā un mitotiskajos procesos. Endogēnā marķēšana nodrošina, ka SNAPf-Nup358 tiek ekspresēts fizioloģiskā promotora kontrolē, saglabājot dabisko ekspresijas līmeni un minimizējot artefaktus, kas saistīti ar pārekspresijas sistēmām.

SNAPf tag ir ātrs SNAP-tag marķēšanas variants, kas kovalenti saistās ar benzilguanīna konjugātiem substrātiem, nodrošinot selektīvu un stabilu Nup358 fluorescēto marķēšanu dzīvos vai fiksētos šūnos. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 šūnās fūzijas proteīns lokalizējas kodola apvalkā punktveida izkliedes veidā, kas raksturīga citoplazmatiskajiem NPC filamentiem. Šī konfigurācija atbalsta augstas izšķirtspējas fluorescences attēlveidošanu, superizšķirtspējas mikroskopiju, impulsu-pārklājuma marķēšanu un vienmolekulu izsekošanas pieejas, lai pētītu NPC arhitektūru un dinamiku. U2OS šūnu plakana morfoloģija un lieli kodoli vēl vairāk atvieglo kodola apvalka struktūru kvantitatīvo attēlveidošanu.

Šis modelis ļauj pētīt Nup358 specifiskās lomas CRM1/eksportīna atkarīgajā kodola eksportā, Ran GTPāzes cikla regulācijā un citoplazmatisko transporta platformu telpiskajā organizācijā. Ņemot vērā Nup358 līdzdalību mitotiskā vārpstas montāžā un kinetohoras funkcijā, šī šūnu līnija ir piemērota arī šūnu cikla atkarīgās nukleoporīnu pārdales un NPC demontāžas/remontāžas pētīšanai mitozes laikā. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 nodrošina fizioloģiski atbilstošu platformu cilvēka šūnu kodola poru kompleksa citoplazmatiskās virsmas strukturālo un funkcionālo aspektu izpētei.

Organism Cilvēks

Tissue Bone

Disease Osteosarkoma

Metastatic site Primārā audzēja lokalizācija (kauls)

Applications Kodola poru kompleksa citoplazmatisko filamentu bioloģija; Nup358/RanBP2 CRM1-mediētā kodola eksportā; Ran GTPāzes cikls; SUMO ceļš; mitotiskā vārpstiņa veidošanās; atsevišķu daļiņu izsekošana; superizšķirtspējas mikroskopija; SNAP „pulse-chase” marķēšana; NPC citoplazmatiskās virsmas arhitektūra

Raksturojums

Age 15 gadi

Gender Sievietes

Ethnicity Kaukāzietis

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

Morphology Epitēlijveidīgs

Cell type Epitelio šūnas (osteosarkoma)

Growth properties Adherent

Normatīvie dati

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

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession Nav piešķirts (CRISPR modificēts U2OS atvasinājums; sākotnējais U2OS CVCL_0042)

Depositor Ellenberga laboratorija (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Šī cilvēka osteosarkomas šūnu līnija (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) satur CRISPR inženierijas SNAPf-Nup358/RanBP2 sintēzi, kas ļauj precīzi marķēt kodola poru citoplazmas šķiedras. Modifikācija ir stabili integrēta. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un var atšķirties citur.

Biomolekulārie dati

Protein expression Nup358/RanBP2, SNAPf-tag

Darbs ar

Culture Medium McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glikoze, w: stabils glutamīns, w: 2,0 mM nātrija piruvāts, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (Cytion izstrādājuma numurs 820200a)

Supplements Papildināt barotni ar 10% FBS, 3,0 g/l glikozes, stabila glutamīnu, 2,0 mM nātrija piruvāta, 2,2 g/l NaHCO₃, 1% NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time aptuveni 24 līdz 36 stundas

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

Subculturing Noņemt veco barotni no pielipušajām šūnām un mazgāt tās ar PBS, kurā nav kalcija un magnija. T25 kolbām izmantojiet 3-5 ml PBS, bet T75 kolbām - 5-10 ml. Pēc tam pilnībā pārklājiet šūnas ar Accutase, izmantojot 1-2 ml T25 kolbām un 2,5 ml T75 kolbām. Ļaujiet šūnām inkubēties istabas temperatūrā 8-10 minūtes, lai tās atdalītos. Pēc inkubācijas uzmanīgi samaisiet šūnas ar 10 ml barotnes, lai tās atkārtoti suspendētu, pēc tam centrifugējiet 3 minūtes ar 300xg. Izmetiet supernatantu, atkārtoti suspendējiet šūnas svaigā barotnē un pārvietojiet tās jaunās kolbās, kurās jau ir svaiga barotne.

Split ratio no 1 līdz 3

Seeding density 1 līdz 3×10^4 šūnas/cm²

Fluid renewal 2 līdz 3 reizes nedēļā

Freeze medium Kā kriokonservēšanas barotni mēs izmantojam pilnvērtīgu augšanas barotni (ieskaitot FBS) + 10 % DMSO, lai nodrošinātu pietiekamu dzīvotspēju pēc atkausēšanas, vai CM-1 (Cytion kataloga numurs 800100), kas ietver optimizētus osmoprotektorus un metaboliskos stabilizatorus, lai uzlabotu atveseļošanos un samazinātu krioinducēto stresu.

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

1. Pārliecinieties, ka pēc piegādes flakons paliek dziļi sasaldēts, jo šūnas tiek sūtītas uz sausā ledus, lai pārvadāšanas laikā saglabātu optimālu temperatūru.
2. Pēc saņemšanas vai nu nekavējoties uzglabāt kriovialu temperatūrā, kas zemāka par -150 °C, lai nodrošinātu šūnu integritātes saglabāšanu, vai arī turpināt 3. posmu, ja nepieciešama tūlītēja kultivēšana.
3. Tūlītējas kultivēšanas gadījumā ātri atkausējiet flakonu, iegremdējot to 37°C ūdens vannā ar tīru ūdeni un antibakteriālu līdzekli, viegli maisot 40-60 sekundes, līdz paliek neliels ledus gabaliņš.
4. Visas turpmākās darbības veiciet sterilos apstākļos plūsmas nosūcējā, pirms atvēršanas dezinficējot kriovialu ar 70% etanolu.
5. Uzmanīgi atveriet dezinficēto flakonu un pārnesiet šūnu suspensiju 15 ml centrifūgas mēģenē, kurā ir 8 ml istabas temperatūras barotnes, uzmanīgi samaisot.
6. Centrifugējiet maisījumu ar 300 x g 3 minūtes, lai atdalītu šūnas, un uzmanīgi izmetiet virskārtu, kas satur saldēšanas barotnes atlikumus.
7. Viegli resuspendēt šūnu granulas 10 ml svaigas barotnes. Adhēzijas šūnu gadījumā suspensiju sadalīt divās T25 kolbās; suspensijas kultūrām visu barotni pārnest vienā T25 kolbā, lai veicinātu efektīvu šūnu mijiedarbību un augšanu.
8. Ievērojiet noteiktos subkultūru protokolus, lai nodrošinātu nepārtrauktu šūnu līnijas augšanu un uzturēšanu, tādējādi nodrošinot uzticamus eksperimentu rezultātus.

**Incubation
Atmosphere**

37°C, 5% CO_2 , mitrināta atmosfēra.

Flask Coating

Neviens

**Freezing
Procedure**

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

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

Shipping Conditions

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

Storage Conditions

Ilgstošai uzglabāšanai flakonus ievietojiet šķidrā slāpekļī ar tvaika fāzi aptuveni -150 līdz -196 °C temperatūrā. Uzglabāšana -80 °C temperatūrā ir pieļaujama tikai kā īss starposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

Kvalitātes kontrole / Ģenētiskais profils / HLA

Sterility

Mikoplazmas piesārņojums tiek izslēgts, izmantojot gan uz PCR balstītus testus, gan uz luminiscenci balstītas mikoplazmas noteikšanas metodes.

Lai pārliecinātos, ka nav baktēriju, sēnīšu vai rauga piesārņojuma, šūnu kultūras katru dienu vizuāli pārbauda.