

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

Algemene informatie

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 is een genoom-bewerkte menselijke osteosarcoomcellijn afgeleid van U2OS-cellen waarin de endogene RANBP2-locus (ook bekend als NUP358) is gemodificeerd door CRISPR/Cas9 om een SNAPf-tag in-frame met het natuurlijke eiwit te coderen. Nup358/RanBP2 is een groot nucleoporine dat zich bevindt in de cytoplasmatische filamenten van het nucleaire poriecomplex (NPC) en een cruciale rol speelt in nucleocytoplasmatisch transport, SUMOylatie en mitotische processen. Endogene tagging zorgt ervoor dat SNAPf-Nup358 wordt uitgedrukt onder fysiologische promotorcontrole, waardoor de natuurlijke expressieniveaus behouden blijven en artefacten die verband houden met overexpressiesystemen tot een minimum worden beperkt.

De SNAPf-tag is een snel labelende variant van de SNAP-tag die covalent bindt aan benzyguanine-geconjugeerde substraten, waardoor selectieve en stabiele fluorescerende labeling van Nup358 in levende of gefixeerde cellen mogelijk is. In U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-cellen lokaliseert het fusie-eiwit zich in de kernmembraan in een puntvormige verdeling die kenmerkend is voor cytoplasmatische NPC-filamenten. Deze configuratie ondersteunt hoge-resolutie fluorescentiebeeldvorming, superresolutiemicroscopie, pulse-chase-labeling en single-molecule tracking-benaderingen om de architectuur en dynamica van NPC te bestuderen. De vlakke morfologie en grote kernen van U2OS-cellen vergemakkelijken bovendien kwantitatieve beeldvorming van kernmembraanstructuren.

Dit model maakt onderzoek mogelijk naar Nup358-specifieke rollen in CRM1/exportine-afhankelijke nucleaire export, Ran GTPase-cyclusregulatie en de ruimtelijke organisatie van cytoplasmatische transportplatforms. Gezien de betrokkenheid van Nup358 bij de assemblage van mitotische spindels en de kinetochorefunctie, is de cellijn ook geschikt voor het bestuderen van celcyclusafhankelijke herverdeling van nucleoporines en NPC-demontage/herassemblage tijdens mitose. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 biedt een fysiologisch relevant platform voor het ontleden van structurele en functionele aspecten van de cytoplasmatische zijde van het nucleaire poriecomplex in menselijke cellen.

Organism Mens

Tissue Bot

Disease Osteosarcoom

Kenmerken

Age 15 jaar

Gender Vrouw

Ethnicity Kaukasisch

Morphology Epitheelachtig

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

Growth properties Aanhangend

Regelgevende gegevens

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

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Het Ellenberg Lab (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Deze menselijke osteosarcomcellijn (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) bevat een CRISPR-ingeboorde SNAPf-Nup358/RanBP2-fusie die nauwkeurige labeling van cytoplasmatische fibrillen van de nucleaire porie mogelijk maakt. De modificatie is stabiel geïntegreerd. Deze classificatie is alleen van toepassing binnen Duitsland en kan elders afwijken.

Biomoleculaire gegevens

Protein expression Nup358/RanBP2, SNAPf-tag

Omgaan met

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucose, w: stabiel Glutamine, w: 2,0 mM Natriumpyruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (Cytion artikelnummer 820200a)

Supplements Vul het medium aan met 10% FBS, 3,0 g/L Glucose, stabiele Glutamine, 2,0 mM Natriumpyruvaat, 2,2 g/L NaHCO₃, 1% NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Verwijder het oude medium van de adherente cellen en was ze met PBS zonder calcium en magnesium. Gebruik voor T25-flesjes 3-5 ml PBS en voor T75-flesjes 5-10 ml. Bedek de cellen vervolgens volledig met Accutase, met 1-2 ml voor T25-flesjes en 2,5 ml voor T75-flesjes. Laat de cellen gedurende 8-10 minuten bij kamertemperatuur incuberen om ze los te maken. Na incubatie de cellen voorzichtig mengen met 10 ml medium om ze te resuspenden en vervolgens centrifugeren bij 300xg gedurende 3 minuten. Gooi het supernatant weg, resuspendeer de cellen in vers medium en breng ze over in nieuwe kolven die al vers medium bevatten.

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

Freeze medium

Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimeidium (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij $300 \times g$ om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , bevochtigde atmosfeer.

Flask Coating

Geen

Freezing Procedure

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

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

Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer -78 °C te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Kwaliteitscontrole / Genetisch profiel / HLA

Sterility

Mycoplasma-verontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasma-detectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.